

The autoreactive B cell response in myasthenia gravis

Citation for published version (APA):

Vrolix, K. (2011). *The autoreactive B cell response in myasthenia gravis*. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20111007kv>

Document status and date:

Published: 01/01/2011

DOI:

[10.26481/dis.20111007kv](https://doi.org/10.26481/dis.20111007kv)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary and general discussion

In this thesis we focused on B cells and autoantibodies in MG patients to obtain better insights into their precise role in the disease pathology. We first developed a method to efficiently produce human monoclonal antibodies and then applied this method to investigate the antibody repertoire produced by thymic B cells of MG patients. Moreover, we searched for the yet unknown pathogenic autoantibodies in iMG patients, and finally, we tested a new treatment possibility for MG to target plasma cells.

Chapter 1 reviews the autoantibodies that have been reported in MG patients thus far. Even though MG is a prototypic organ-specific autoimmune disorder, multiple antigens are targeted by autoantibodies. Anti-AChR and anti-MuSK antibodies are considered the main autoantibodies in AChR-MG and MuSK-MG patients, respectively. Both autoantibodies exert pathogenic effects by disturbing the neuromuscular transmission and cause skeletal muscle weakness. Besides these well characterized autoantibodies, various autoantibodies associated with thymic abnormalities have been reported in MG patients, as well as many non-MG-specific autoantibodies. A general dysfunction of the immune system might explain the increased co-occurrence of different autoimmune diseases and the simultaneous presence of distinct autoantibodies in MG patients. These autoantibodies do not necessarily exert pathological effects in MG patients, but their exact role remains poorly understood. This review underscores that in autoimmune patients antibodies against a whole array of antigens are present, rather than against a single pathophysiological target.

In **Chapter 2**, the effector functions of anti-AChR and anti-MuSK antibodies in MG patients are explained in more detail. In AChR-MG patients, pro-inflammatory antibodies of the IgG1 and IgG3 subclass modulate the AChR, cause complement activation and decrease the levels of AChR and AChR-associated proteins and reduce postsynaptic folding at the NMJ. In patients with anti-MuSK antibodies, there is a less pronounced loss of AChR density and no evidence for a loss of junctional folds. Anti-MuSK antibodies are predominantly of the IgG4 subclass, which functionally differs from other IgG subclasses in its anti-inflammatory activity. Moreover, IgG4 undergoes a post-translational modification termed Fab arm exchange that prevents cross-linking of antigens. These findings suggest that MuSK-MG probably differs in its etiological and pathological mechanisms from AChR-MG. Understanding the effector functions of autoantibodies on NMJ structure and function might lead to the development of antigen-specific therapies.

Chapter 3 describes an improved B cell immortalization method to produce human monoclonal antibodies. Compared to other antibody-production techniques, the major advantage of B cell immortalization is the generation of fully human antibodies from the human B cell repertoire that truly reflect both the specificity and diversity of the human

immune response, without the need for specific immunization. Since the existing B cell immortalization methods resulted in low reproducibility in our hands, we aimed at developing a novel B cell immortalization procedure with high efficiency and reproducibility when seeding low B cell numbers per well, and that could be easily adopted for the production of antibodies from patients with autoimmune diseases. We developed a reproducible B cell immortalization method with an efficiency of up to 83% for fast IgG production from CD22⁺IgG⁺ peripheral blood B cells, by simultaneous B cell stimulation using CpG2006 and B cell infection by EBV followed by an additional stimulus of CpG2006 and Il-2. In addition, the clonality analysis showed monoclonality in almost 90% of the immortalized B cell lines, eliminating the need for further subcloning. We concluded that this B cell immortalization method can be applied to characterize the antibodies from patients with an autoimmune disease.

In **Chapter 4**, we used our B cell immortalization method to immortalize thymic B cells from AChR-MG patients. Autoreactive B cells have been found in the human thymus, but their contribution to autoimmune diseases is unknown. To study the B cell repertoire in the autoimmune thymus, we focused on AChR-MG, because thymic B cells have been implicated in its pathophysiology. We successfully immortalized thymic B cells with reactivity against striated muscle proteins. In addition, we isolated a full-size monoclonal antibody (P90-131) directed against the gamma subunit of the fetal AChR. P90-131 is the first anti-gamma AChR antibody to be described to exert pathogenic effects when gamma-subunit containing AChRs are present by inducing AChR internalization *in vitro*. The fact that the fetal AChR has been described as a specific marker of human rhabdomyosarcoma (RMS) indicates that P90-131 could potentially be used as a cytotoxic treatment for these RMS patients. Most importantly, the isolation of representative striational and anti-AChR antibodies from the thymus of AChR-MG patients led to the conclusion that our EBV immortalization technique is suitable to study the B cell repertoire in the autoimmune thymus.

Chapter 5 describes an in-depth characterization of the antibody repertoire produced by thymic B cells. Although thymic B cells play an important role in the pathology of AChR-MG, the antibody repertoire produced by thymic B cells of AChR-MG patients has never been directly compared to that of healthy individuals. We used the B cell immortalization method to investigate our hypothesis that the thymic B cell and antibody repertoire of AChR-MG patients displays important intrinsic differences compared to that of controls. The results showed more and phenotypically different B cells in the thymus of AChR-MG patients. In addition, more B cells of the AChR-MG thymus displayed reactivity against striated muscle proteins compared to those of the

control thymus. Despite these differences, sequence analysis of the IgV_H gene showed remarkable similarities, concerning VH family gene distribution, mutation frequency and CDR3 composition, between thymic B cells of controls and AChR-MG patients. However, we found more clonally expanded B cells clones in the thymus of AChR-MG patients and noticed that specific anti-AChR antibodies displayed significantly higher mutation frequencies compared to non anti-AChR IgG⁺ antibodies.

Chapter 6 focuses on the autoantigen in idiopathic MG (iMG) patients. In approximately 5% of MG patients, no antibodies against AChR, MuSK or Lrp4 are detected and the autoantigen remains unknown. Besides AChR, MuSK and Lrp4, ErbB proteins are also located at the postsynaptic membrane of the NMJ and they influence the AChR density. When antibodies target ErbB proteins, the AChR density might be disturbed, which could potentially lead to myasthenic symptoms. We investigated whether iMG patients have antibodies against ErbB proteins. We found indications for an altered ErbB expression in the thymus of iMG patients compared to non-MG patients, which could act as a risk factor in breaking tolerance to this protein. However, the antibody tests for ErbB in the sera of iMG patients were all negative. The results do not support a role for ErbB receptors as autoantigens in iMG patients.

In **Chapter 7**, we investigated the potential of a new therapeutic approach to treat MG patients. As in many B cell mediated autoimmune diseases, also in MG the long-lived plasma cells are responsible for the production of the pathogenic autoantibodies. However, long-lived plasma cells are resistant to most therapies, including immunosuppressive drugs and anti-CD20 antibodies that are aimed to inhibit the activation and proliferation of all or certain lymphocytes. Thus, the resistance of MG patients to available therapies might be due to the persistent long-lived plasma cells that continue to produce autoantibodies notwithstanding immunosuppressive treatment. Since the drug bortezomib has been reported to deplete long-lived plasma cells and autoantibody titers in mice suffering from lupus-like disease, we tested whether bortezomib is effective for alleviating the symptoms in the experimental autoimmune rat model for myasthenia gravis (EAMG). We found that bortezomib induced apoptosis in bone marrow cells and reduced the amount of plasma cells in the bone marrow by up to 80%. In the EAMG animals, bortezomib efficiently reduced the rise of anti-AChR antibody titers, prevented ultrastructural damage of the postsynaptic membrane, improved neuromuscular transmission, and decreased myasthenic symptoms. This study thus emphasizes the potential therapeutic use of bortezomib to target plasma cells in MG and other antibody-mediated autoimmune diseases.

The fact that B cells play a pathological role in MG is nowadays widely accepted. They produce anti-AChR or anti-MuSK antibodies, which in turn cause damage at the NMJ, leading to a disturbed neuromuscular transmission and muscle weakness. Moreover, therapies specifically targeting B cells led to clinical improvement in MG patients. However, much more research is needed to fully understand the pathological mechanisms in MG. In this thesis, we further investigated the role of thymic B cells and their autoantibodies in the pathology of MG by using B cell immortalizations. We have shown that our improved B cell immortalization is a valuable technique to characterize the B cell repertoire in the thymus of AChR-MG patients. Similar immortalization experiments can also be applied on different B cell subsets or on B cells isolated from different lymphoid tissues to analyze their relative contributions to the MG pathology. Since the thymus plays an important role in the induction and maintenance of immune tolerance, further characterization of the role of thymic B cells will enhance our knowledge on general pathological mechanisms involved in autoimmune diseases. Our B cell immortalization method also led to the development of full-size human monoclonal antibodies. The generation of such antibodies offers good opportunities to study their role in autoimmune diseases. In addition, full-size human monoclonal antibodies have the potential to be further analyzed and modified to be used as internal standards in diagnostic assays or for the design of therapeutic competitor antibodies. Interestingly, our B cell immortalization method can also be applied on MuSK-MG, since the generation of anti-MuSK antibodies from MuSK-MG patients is essential to analyze the pathological effects of anti-MuSK antibodies on target tissue. Human anti-MuSK antibodies can also be used to create better animal models for MuSK-MG. Moreover, the immortalization of B cells from iMG patients can lead to the identification of novel disease relevant autoantigens, which has direct relevance for the diagnosis of the disease. Indeed, this B cell immortalization method has also led to the identification of auto-antigens in MS patients in the research group of Prof. Somers and Prof. Stinissen (J. Fraussen, Hasselt University, Diepenbeek, Belgium). Thus, our results indicate that better insights in the pathogenic role of B cells in MG can be obtained by using our B cell immortalization method. This technique is also applicable to other antibody-mediated autoimmune diseases and will ultimately lead to improved therapies for autoimmune patients.

In this thesis, we also searched for better therapies for MG by targeting long-lived plasma cells. The fact that bortezomib improved the clinical outcome of EAMG animals emphasizes the therapeutic value of proteasome inhibitors to target plasma cells in antibody-mediated autoimmune diseases. Bortezomib can induce a faster remission in antibody titer and, therefore, might be useful to complement classical

immunosuppressive drugs for the treatment of MG. However, more research is needed to diminish the occurrence of peripheral neuropathy, which is the main side-effect seen in patients treated with bortezomib. The investigation of other proteasome inhibitors which do not induce these side effects could also make the treatment with proteasome inhibitors safer.

Much research, including that described in this thesis, has thus focused on B cells as producers of pathogenic autoantibodies in order to be able to explain the pathology of MG. However, B cells may also contribute to MG by exerting additional functions, such as antigen presentation, T cell activation, regulation of antigen expression in the thymus, cytokine production or the negative regulation of immune responses. Different subsets of B cells may exert different effector functions and probably many B cell subsets and functions still need to be discovered. Therefore, future studies should also focus on other effector functions to complete our B cell picture and to determine whether all B cell subsets equally contribute to the MG pathology. Only when the roles of B cells as mediators of autoimmune diseases are fully understood, more precise and antigen-specific therapies targeting pathogenic B cell subsets can be developed, sparing non-disease related B cells.

MG itself only occurs rarely, but it is one of the best understood autoimmune diseases, mainly because the major autoantigens are well characterized, and it serves as a prototypic B-cell mediated autoimmune disease. Studying the pathological mechanisms of B cells in MG has consequently contributed to a better understanding of autoimmunity in general. However, since B cells do not act alone but strongly interact with other immune cells, one can not draw conclusions about autoimmune pathologies only based on data obtained from B cells. It is important to realize that probably all aspects of the immune system play a certain role. In addition, not only immunological, but also genetic, hormonal and environmental components are certainly involved in autoimmunity. This emphasizes that knowledge obtained from different disciplines should be combined to completely understand autoimmunity and autoimmune diseases.

In general, it is accepted that autoimmune diseases are caused by a failure of the mechanisms that maintain immune self-tolerance. These mechanisms normally prevent autoimmunity by maintaining a proper discrimination of self from non-self antigens. Central tolerance mechanisms, mainly occurring in the bone marrow and the thymus, are responsible for the elimination of self-reactive immature lymphocytes. Mechanisms of peripheral tolerance, being assisted by the innate immune system, complement these central tolerance mechanisms for antigens that are not expressed centrally to the

developing lymphocytes. In addition, lymphocytes can distinguish self from non-self antigens by a high and constant antigen concentration that provides signals to make lymphocytes tolerant. When autoreactive lymphocytes do escape some of the mechanisms that should have tolerized them, autoimmunity arises. Low levels of autoimmunity are needed for the normal physiology of the immune system, but when too many checkpoints are overcome, it will lead to autoimmune disease. Although the principle of self-tolerance in autoimmunity is well understood, the factors which cause a failure in self-tolerance mechanisms and thereby induce autoimmune diseases remain unknown. Probably, autoimmune diseases are not triggered by a hit and run event, but they may arise when cumulative events cross a crucial level or reach a breakthrough point. In this way, a 'multiple-hit hypothesis' model might be useful to study autoimmune diseases. Here, we applied the 'multiple-hit hypothesis' model to what is known for MG (Figure 1).

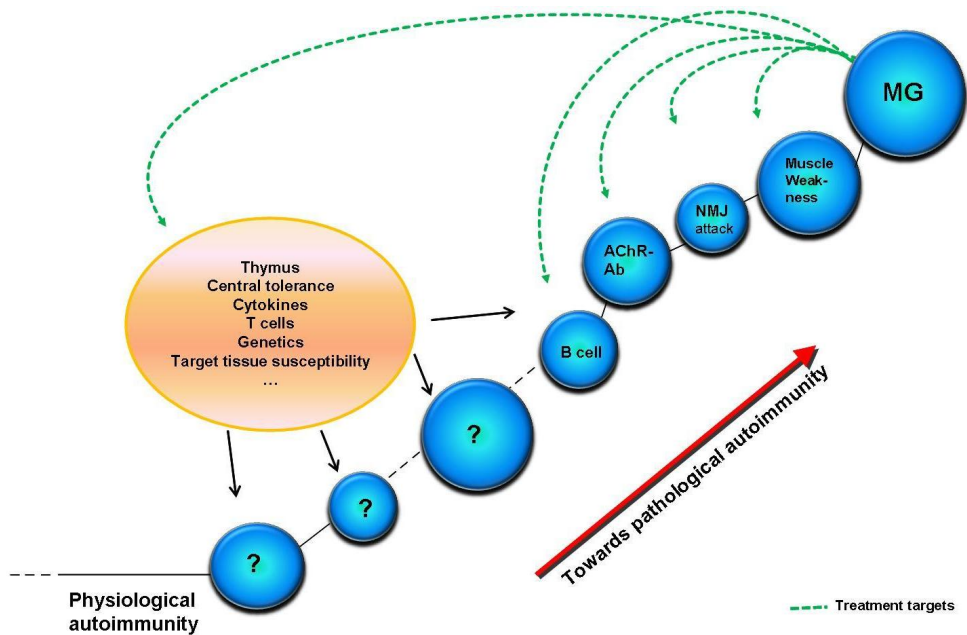


Figure 1. Multiple hit hypothesis for MG.

Since all studies performed on MG patients are unavoidably performed after the onset of their disease, it is very hard to discriminate between causes and consequences of the autoimmune response. It is assumed that ultimately B cells produce pathogenic antibodies which attack the NMJ and induce muscle weakness. Several other factors have also been associated with MG pathology, including cytokine dysregulation, thymic abnormalities, T cell functioning, skeletal muscle vulnerability, promiscuous antigen expression in the thymus, genetic make-up and many more, but their exact position on the 'multiple-hit hypothesis chain' is not clear yet. It is also still unknown whether some factors actually contribute less to the MG pathology, or whether they are simply less well studied. In addition, it is not understood whether some factors contribute to the induction of MG in particular or whether they contribute to autoimmune pathology in general. Even though the final factors on the 'multiple-hit hypothesis chain' of MG are relatively well clarified, much more research is needed to identify the importance and location of every link in the chain.

Using this 'multiple-hit hypothesis' model to study autoimmune diseases in general, many questions can still be asked. Will we find a point where the chain of physiological autoimmunity passes into the chain of pathological autoimmunity and might it be possible to prevent this? Will there be one factor that can be seen as the triggering event for all autoimmune diseases or is it a matter of assembling sufficient randomly occurring autoimmune hits? How many checkpoints can be broken down before autoimmune diseases occur? Do the chains of different autoimmune diseases diverge from an original trigger onwards or do they diverge at a later stage, depending on which other autoimmune hits have occurred? Is there a gray zone in which autoimmune hits accumulate but not necessarily lead to the passage towards autoimmune disease? What is the contribution of target organs in particular to autoimmune susceptibility? Might there even be a factor of chance involved?

The key to answering these questions may lie within reach, but more basic research is definitely needed since it might lead us to a 'cure' for autoimmune diseases. Many fundamental mechanisms may link the pathology of different autoimmune diseases and exploration of these common features will benefit all of the autoimmune diseases. Only when these questions are answered, we will finally be able to turn the chronic autoimmune disease into a condition where patients can get full recovery without the life-long need of treatment. In the meanwhile, we must make do with what we have and try to make myasthenia no longer gravis...

Samenvatting en algemene discussie

Het onderzoek dat in dit proefschrift beschreven wordt, richt zich op B-cellen en hun auto-antilichamen bij myasthenia gravis (MG) patiënten om zo hun precieze rol in het ziekteproces beter te begrijpen. Eerst hebben we een verbeterde B-cel immortalisatie methode ontwikkeld om op efficiënte wijze humane monoclonale antilichamen te produceren. Daarna hebben we deze methode gebruikt om het antilichaam repertoire dat geproduceerd wordt door B-cellen uit de thymus van MG patiënten uitgebreid te bestuderen. Vervolgens hebben we gezocht naar nieuwe pathogene auto-antilichamen bij idiopathische MG (iMG) patiënten. Tenslotte hebben we de mogelijkheid onderzocht om experimentele auto-immune MG (EAMG) te behandelen met een nieuw geneesmiddel dat plasmacellen doodt.

Hoofdstuk 1 geeft een samenvatting van alle auto-antilichamen die tot nu toe bij MG patiënten werden gevonden. Anti-AChR en anti-MuSK antilichamen worden beschouwd als de belangrijkste antilichamen in respectievelijk AChR-MG en MuSK-MG patiënten. Beide auto-antilichamen verstoren de neuromusculaire transmissie en veroorzaken daarmee spierzwakte in de skeletspieren. Naast deze auto-antilichamen kunnen ook auto-antilichamen gericht tegen andere extracellulaire epitopen aanwezig zijn in MG patiënten. Zo komen onder andere auto-antilichamen die geassocieerd zijn met afwijkingen aan de thymus vaak voor alsook auto-antilichamen die niet specifiek zijn voor MG. Een gegeneraliseerde afwijking aan het immuunsysteem zou kunnen verklaren waarom veel verschillende auto-antilichamen gelijktijdig aanwezig zijn bij MG patiënten of waarom meerdere auto-immuunziektes vaak samen optreden. Deze auto-antilichamen oefenen niet noodzakelijk een direct pathogeen effect uit, maar hun precieze rol in MG moet nog verder worden onderzocht. Deze literatuurstudie benadrukt dat auto-antilichamen in patiënten met een auto-immune aandoening vaak niet gericht zijn tegen slechts één antigen, maar tegen een brede waaier aan antigenen.

Hoofdstuk 2 geeft een overzicht van de effectorfuncties van anti-AChR en anti-MuSK antilichamen. Bij AChR-MG patiënten zijn hoofdzakelijk pro-inflammatoire antilichamen van de IgG1 en IgG3 subklasse aanwezig. Deze antilichamen moduleren de AChR, veroorzaken complement activatie, verlagen de hoeveelheid AChR en daarmee geassocieerde eiwitten en verminderen het aantal postsynaptische plooien in de NMJ. Bij MuSK-MG patiënten is de vermindering in densiteit van de AChR en in het aantal postsynaptische plooien minder uitgesproken. Anti-MuSK antilichamen behoren voornamelijk tot de IgG4 subklasse, die omwille van zijn anti-inflammatoire activiteit functioneel verschilt van andere IgG subklassen. Bovendien ondergaan IgG4 antilichamen een posttranslationele verandering, Fab arm uitwisseling genaamd, waardoor geen cross-linking van antigenen kan optreden. Deze veranderingen wijzen erop dat MuSK-MG

waarschijnlijk verschilt van AChR-MG wat betreft etiologische en pathologische mechanismen. Het is belangrijk dat de effectorfuncties van auto-antilichamen op de structuur en functie van de NMJ nog beter worden begrepen om zo antigen-specifieke therapieën te kunnen ontwikkelen.

Hoofdstuk 3 beschrijft hoe we een verbeterde B-cel immortalisatie methode ontwikkeld hebben om humane monoclonale antilichamen te produceren. In vergelijking met andere technieken waarmee antilichamen geproduceerd worden heeft B-cel immortalisatie als belangrijkste voordeel dat volledig humane antilichamen gekloneerd worden waarvan de specificiteit en diversiteit ook representatief zijn voor het humane antilichaamrepertoire, zonder dat hiervoor specifieke immunisatie nodig is. Aangezien de bestaande B-cel immortalisatie technieken bij ons resulteerden in een lage reproduceerbaarheid, was er behoefte aan een nieuwe methode met hoge efficiëntie en reproduceerbaarheid om lage B-cel aantallen te immortaliseren. Deze methode zou dan gemakkelijk aangepast kunnen worden om antilichamen te produceren van patiënten met een auto-immuunziekte. We hebben een verbeterde procedure ontwikkeld om snel IgG antilichamen aan te maken uit CD22⁺IgG⁺ B-cellen van het perifere bloed. Deze procedure bereikte een immortalisatie efficiëntie van 83%. Hierbij werden B-cellen gedurende 2 weken gelijktijdig gestimuleerd met CpG2006 en geïnfecteerd met EBV, gevolgd door een nieuwe stimulatie met CpG2006 en IL-2 gedurende een week. Bovendien werd met deze methode een percentage monoklonale B-cellijnen van bijna 90% behaald, waardoor subkloneren niet langer noodzakelijk is. Bijgevolg kan deze B-cel immortalisatiemethode toegepast worden om antilichamen van patiënten te karakteriseren.

In **hoofdstuk 4** hebben we de verbeterde B-cel immortalisatie methode toegepast op B cellen uit de thymus van MG patiënten. Autoreactive B-cellen werden reeds aangetoond in de humane thymus, maar hun bijdrage tot auto-immuunziekten is niet duidelijk. Om het B-cel repertoire in de auto-immune thymus te bestuderen, hebben we ons gericht op AChR-MG. In de thymus van MG patiënten is het aantal B-cellen fors toegenomen. We immortaliseerden thymus B-cellen, waarna hiervan ongeveer 25% antilichamen produceerden tegen eiwitten van gestreept spierweefsel (striationele eiwitten). Ook isoleerden we een monoklonaal antilichaam (P90-131) dat specifiek gericht is tegen het gamma-subunit van de foetale AChR. P90-131 is tevens het eerste anti-gamma AChR antilichaam dat ook pathogene effecten kan uitoefenen wanneer AChRs met gamma-subunits aanwezig zijn door in vitro de internalisatie van AChR te induceren. De foetale AChR is beschreven als een specifieke merker voor de kwaadaardige humane aandoening rhabdomyosarcoma (RMS), wat erop wijst dat P90-131 gebruikt zou kunnen

worden als cytotoxische behandeling bij RMS patiënten. De isolatie van representatieve antilichamen, gericht tegen dwarsgestreepte spieren en tegen de AChR, uit de thymus van AChR-MG patiënten geeft aan dat deze B cel immortalisatietechniek geschikt is om het B-cel- en antilichaamrepertoire van de auto-immune thymus in detail te bestuderen.

In **hoofdstuk 5** wordt het antilichaamrepertoire dat door B-cellen uit de thymus geproduceerd wordt in detail bestudeerd. B-cellen uit de thymus spelen een belangrijke rol in het ziekteproces van AChR-MG. Het antilichaamrepertoire van deze B-cellen is echter nooit rechtstreeks vergeleken met het repertoire van B-cellen uit gezond thymusweefsel. We hebben de B-cel immortalisatiemethode gebruikt om te testen of het B-cel- en antilichaamrepertoire van de thymus van AChR-MG patiënten belangrijke verschillen vertoont ten opzichte van dat van gezonde personen. De resultaten toonden een hoger percentage en fenotypisch verschillende B-cellen in de thymus van AChR-MG patiënten. Ook produceerden een hoger aantal B-cellen uit de AChR-MG thymus antistoffen tegen dwarsgestreept spierweefsel in vergelijking met B-cellen uit de controle thymus. Ondanks deze verschillen werden er geen verschillen gevonden in gensequenties van de zware keten van het variabele deel van immunoglobulines (IgV_H) tussen thymus B-cellen van controle personen en AChR-MG patiënten. Hierbij werd onder andere gekeken naar de verdeling van IgV_H genfamilies, mutatiefrequentie en samenstelling van de CDR3. Wel vonden we een hoger aantal klonaal geëxpandeerde B-cellen in de thymus van AChR-MG patiënten en zagen we dat anti-AChR antilichamen hogere mutatiefrequenties vertoonden in vergelijking met IgG antilichamen die niet tegen de AChR gericht waren. Deze resultaten tonen aan dat het B-cel- en antilichaamrepertoire uit de thymus verschilt tussen gezonde personen en AChR-MG patiënten, maar deze verschillen worden niet veroorzaakt door intrinsieke verschillen in de Ig gensequenties.

In **hoofdstuk 6** wordt gezocht naar nieuwe auto-antigenen bij idiopatische MG patiënten (iMG). Bij ongeveer 5% van de MG patiënten worden geen antilichamen tegen AChR, MuSK of Lrp4 gedetecteerd en blijft het auto-antigen onbekend. Naast AChR, MuSK en Lrp4 bevinden zich ook ErbB eiwitten op de postsynaptische membraan van de NMJ die de dichtheid van AChRs beïnvloeden. Wanneer antilichamen aan ErbB eiwitten zouden binden, zou dit de dichtheid van AChR moleculen kunnen verstoren en zo kunnen leiden tot stoornissen in de NMJ. In deze studie hebben we onderzocht of antilichamen tegen ErbB eiwitten aanwezig zijn bij iMG patiënten. Een veranderde expressie van ErbB werd waargenomen in de thymus van iMG patiënten ten opzichte van niet-MG patiënten. Deze veranderde expressie zou kunnen leiden tot een verstoorde immuuntolerantie tegen dit eiwit. Desondanks konden we geen ErbB antilichamen in iMG patiënten

aantonen. Deze resultaten wijzen dus niet op een rol voor ErbB receptoren als auto-antigen bij iMG patiënten.

In **hoofdstuk 7** hebben we onderzoek verricht naar een nieuwe behandelingsstrategie voor MG. Zoals bij veel B-cel gemedieerde auto-immuunziektes zijn ook bij MG de lang-levende plasmacellen verantwoordelijk voor de belangrijkste productie van pathogene auto-antilichamen. Helaas zijn lang-levende plasmacellen resistent tegen veel therapieën, inclusief immuunsuppressiva en anti-CD20 antilichamen. De resistentie van sommige MG patiënten tegen bestaande therapieën kan dus te wijten zijn aan het feit dat lang-levende plasma cellen auto-antilichamen blijven produceren ondanks de immuunsuppressieve behandelingen. Recent is aangetoond dat de proteasoominhibitor bortezomib het aantal lang-levende plasmacellen evenals de antilichaam titers significant doet afnemen bij muizen die lijden aan lupus. Daarom hebben wij nu getest of bortezomib ook de klinische symptomen kan verbeteren bij het experimentele autoimmune ratten model voor MG (i.e. EAMG). De resultaten toonden dat behandeling met bortezomib apoptose induceerde in beenmergcellen en het aantal plasmacellen in het beenmerg deed afnemen met 80%. Ook inhibeerde bortezomib in de EAMG ratten de anti-AChR antilichaam productie en zorgde het voor een preventie van ultrastructurele schade aan het postsynaptische membraan, een verbeterde neuromusculaire transmissie en voor afname van de klinische symptomen. Deze studie toont aan dat bortezomib de mogelijkheid biedt om plasmacellen te doden in MG en in andere antilichaam-gemedieerde auto-immuunziektes.

Het feit dat B cellen een pathologische rol spelen in MG wordt in de literatuur algemeen aanvaard. Ze produceren namelijk anti-AChR en anti-MuSK antilichamen die schade veroorzaken aan de NMJ, wat leidt tot een verstoorde neuromusculaire transmissie en spierzwakte. Bovendien leiden therapieën die gericht zijn tegen B cellen tot een klinische verbetering in MG patiënten. Toch is nog veel onderzoek nodig om de pathologische mechanismen in MG volledig te doorgronden. In deze thesis hebben we de rol van thymus B-cellen en hun auto-antilichamen in het ziekteproces van MG nader onderzocht door gebruik te maken van B-cel immortalisaties. We hebben aangetoond dat onze verbeterde B-cel immortalisatie zeer geschikt is om het B-cel repertoire uit de thymus van MG patiënten te karakteriseren. Gelijkaardige immortalisaties kunnen ook toegepast worden op verschillende soorten B-cellen of op B-cellen uit verschillende lymfoïde weefsels, om zo hun bijdrage aan de pathologie van MG te analyseren. Omdat de thymus een belangrijke rol speelt bij het induceren en onderhouden van immuuntolerantie zal een verdere karakterisatie van B-cellen uit de thymus leiden tot

betere kennis over de algemene pathologische mechanismen die betrokken zijn bij auto-immuunziektes. Onze B-cel immortalisatiemethode heeft ook geleid tot de ontwikkeling van volledig humane monoklonale antilichamen. Het aanmaken van zulke antilichamen biedt goede mogelijkheden om hun rol in auto-immuunziektes beter te bestuderen. Bovendien kunnen volledig humaan monoklonale antilichamen verder geanalyseerd worden of aangepast worden voor gebruik als interne standaard bij diagnostische tests of voor het ontwerpen van therapeutische competitor antilichamen. Ook kan de B-cel immortalisatie methode toegepast worden bij MuSK-MG, aangezien de aanmaak van anti-MuSK antilichamen van MuSK-MG patiënten essentieel is om de pathologische effecten van anti-MuSK antilichamen op het spierweefsel te kunnen bestuderen. Humane anti-MuSK antilichamen kunnen eveneens gebruikt worden om betere diermodellen voor MuSK-MG te maken. Verder kan het immortaliseren van B cellen van iMG patiënten leiden tot de identificatie van nieuwe ziekte-gerelateerde auto-antigenen, wat relevant zou zijn voor de diagnose van de ziekte. Deze B-cel immortalisatiemethode heeft inderdaad al geleid tot de identificatie van auto-antigenen bij multiple sclerose (MS) patiënten in de onderzoeksgroep van Prof. Somers en Prof. Stinissen (J. Fraussen, Universiteit Hasselt, Diepenbeek, België). Daarmee tonen we dus aan dat betere inzichten kunnen verkregen worden in de pathogene rol van B-cellen bij MG door gebruik te maken van onze B-cel immortalisatie methode. Deze techniek is bovendien ook toepasbaar op andere antilichaam-gemedieerde auto-immuunziektes en zal uiteindelijk leiden tot betere therapieën voor auto-immuun patiënten.

In deze thesis hebben we ook onderzoek verricht naar betere therapieën voor MG met lang-levende plasmacellen als doelwit. Bortezomib verbeterde de klinische symptomen bij EAMG dieren, wat suggereert dat proteasoominhibitoren gericht tegen plasmacellen een nieuwe therapie kunnen vormen voor antilichaam-gemedieerde auto-immuunziektes. Bortezomib kan een snelle remissie in auto-antilichaam titer induceren en kan daarom gebruikt worden als aanvulling bij klassieke immuunsuppressieve geneesmiddelen om MG te behandelen. Toch is nog meer onderzoek nodig om het voorkomen van perifere neuropathie, de belangrijkste nevenwerking van bortezomib, te verminderen. Onderzoek naar andere proteasoominhibitoren die deze nevenwerkingen niet veroorzaken zal er ook toe kunnen bijdragen dat de behandeling met proteasoominhibitoren veiliger wordt.

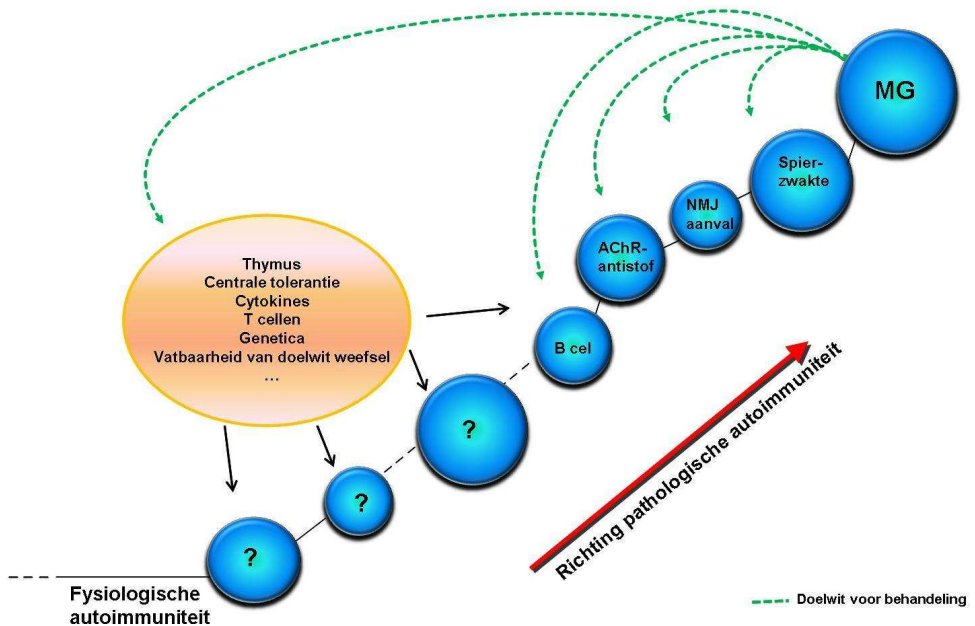
Veel onderzoek, inclusief datgeen beschreven in dit proefschrift, richt zich op B-cellen als zijnde producenten van pathogene auto-antilichamen om zo de pathologie van MG beter te kunnen verklaren. Toch kunnen B-cellen ook op een andere manier bijdragen

aan MG pathologie, via antigeenpresentatie, T cel activatie, regulatie van antigeenexpressie in de thymus, productie van cytokines of negatieve regulatie van immuunresponsen. Deze verschillende effectorfuncties worden waarschijnlijk uitgeoefend door verschillende subsets van B-cellen en ongetwijfeld zullen nog veel B-cel subsets en hun bijbehorende functies ontdekt worden. Daarom is het belangrijk dat verder onderzoek zich ook richt op andere effectorfuncties van B-cellen om zo het beeld van B-cellen te vervolledigen en om te kunnen bepalen of alle B-cel subsets elk een deel hebben aan de MG pathologie. Slechts wanneer alle functies van B-cellen als mediators van auto-immuunziekten volledig begrepen zijn, kunnen precieze en antigeen-specifieke behandelingen ontwikkeld worden die zich enkel richten tegen pathogene subsets van B-cellen.

Ondanks dat MG weinig voorkomt, is het toch een van de best begrepen auto-immuunziekten, voornamelijk omdat de belangrijkste auto-antigenen goed gekarakteriseerd zijn. Daarom is MG een prototype ziekte voor B-cel gemedieerde auto-immuunziekten en levert het bestuderen van de pathologische mechanismen van B-cellen in MG zeker bij tot betere kennis van auto-immuniteit in het algemeen. Toch moet beklemtoond worden dat B-cellen niet alléén handelen maar altijd interacties ondergaan met andere immuuncellen. Hierdoor kunnen geen conclusies getrokken worden omtrent autoimmune pathologieën wanneer resultaten verkregen zijn van B-cel onderzoek alléén. Hoogstwaarschijnlijk spelen alle aspecten van het immuunsysteem een bepaalde rol. Daarnaast spelen ook genetische, hormonale en omgevingsfactoren een rol bij autoimmuniteit. Dit benadrukt dat kennis van verschillende disciplines gecombineerd moet worden om een volledig beeld te kunnen vormen over autoimmuniteit en auto-immuunziekten.

In het algemeen wordt aangenomen dat auto-immuunziekten veroorzaakt worden door falende mechanismen die immuun zelftolerantie zouden moeten onderhouden. Normaal voorkómen deze mechanismen autoimmuniteit door een correct onderscheid tussen zelf en niet-zelf in stand te houden. Centrale tolerantie mechanismen, die vooral in het beenmerg en de thymus plaatsvinden, zorgen voor de eliminatie van zelf-reactive immature lymphocyten. Perifere tolerantie mechanismen, in samenspraak met het aangeboren immuunsysteem, vervolledigen de centrale tolerantie mechanismen voor antigenen die centraal niet zijn blootgesteld aan ontwikkelende lymphocyten. Bovendien kunnen lymphocyten een onderscheid maken tussen zelf en niet-zelf door een hoge en constante antigenconcentratie die de lymphocyten tolerant maakt. Wanneer autoreactieve lymphocyten toch ontsnappen aan de mechanismen die hen tolerant zouden gemaakt moeten hebben, ontstaat autoimmuniteit. Lage hoeveelheden aan

autoimmunitet zijn wel noodzakelijk voor het normaal functioneren van het immuunsysteem, maar wanneer teveel controlepunten overgeslagen worden kan dit leiden tot auto-immuunziektes. Ondanks dat het principe van zelf-tolerantie bij auto-immunitet duidelijk is, zijn de factoren die de tolerantiemechanismen verstoren en zo ziekte induceren niet gekend. Vermoedelijk ontstaan auto-immuunziektes niet door een 'hit and run' principe, maar door de opeenvolging van meerdere gebeurtenissen die een bepaald niveau of breekpunt overschrijden. Daarom kan een 'multiple-hit hypothese' model nuttig zijn om auto-immuunziektes beter te begrijpen. Hier passen we het multiple-hit hypothese model toe op wat tot nu toe gekend is over MG (Figuur 1).



Figuur 1. Multiple hit hypothese toegepast op MG.

Aangezien alle studies met MG patiënten onvermijdelijk pas na de aanvang van het ziekteproces zijn uitgevoerd, is het moeilijk een onderscheid te maken tussen oorzaken en gevolgen van de auto-immune respons. Er wordt aangenomen dat uiteindelijk B-cellen pathogene antilichamen produceren die de NMJ aanvallen en spierzwakte veroorzaken. Vele andere factoren zijn ook in verband gebracht met de pathologie van MG, zoals ontregelde cytokineproductie, afwijkingen aan de thymus, T cel functies, vatbaarheid van het skeletspierweefsel zelf, antigenexpressie in de thymus en genetische opbouw. Hun

exacte rol in MG en dus hun locatie op de ‘multiple-hit hypothese’ keten is echter nog niet duidelijk. Eveneens is niet bekend of bepaalde factoren effectief minder bijdragen tot de MG pathologie of dat ze gewoon minder goed bestudeerd zijn. Bovendien blijft het onduidelijk of sommige factoren specifiek bijdragen tot de inductie van MG of dat ze bijdragen tot de algemene pathologie van auto-immuunziektes. Ook al zijn de finale factoren van de multiple-hit hypothese keten van MG relatief goed gekend, toch is verder onderzoek noodzakelijk om het belang en de locatie van iedere link in de keten te kunnen identificeren.

Het gebruik van dit multiple hit hypothese model om auto-immuunziektes te bestuderen doet ook veel vragen ontstaan. Zullen we een punt vinden waar de keten van fysiologische autoimmunitet overgaat naar de keten van pathologische autoimmunitet en zal het mogelijk zijn om die overgang te voorkomen? Zal er één factor gevonden worden die beschouwd kan worden als de trigger voor alle auto-immuunziektes of is het eerder een kwestie van voldoende toevallige auto-immune hits te verzamelen? Hoeveel controlepunten moeten defect zijn voordat werkelijk een auto-immuunziekte optreedt? Divergeren de ketens van verschillende auto-immuunziektes vanaf het beginpunt of vanaf een later stadium, afhankelijk van welke andere auto-immune hits zich hebben opgestapeld? Is er een soort van grijze zone waarin auto-immune hits zich opstapelen maar niet noodzakelijk leiden tot de overgang naar ziekte? Wat is de bijdrage van de doelorganen zelf tot de vatbaarheid voor autoimmunitet? En in welke mate kan kans een rol spelen?

De sleutel tot de antwoorden op deze vragen ligt misschien binnen handbereik, maar meer basisonderzoek blijft noodzakelijk om tot een betere behandeling van auto-immuunziektes te komen. De pathologieën van verschillende auto-immuunziektes zouden gelinkt kunnen worden door gemeenschappelijke fundamentele mechanismen en onderzoek hiernaar zal voordelig zijn voor alle auto-immuunziektes. Enkel wanneer deze vragen zijn beantwoord, zullen we in staat zijn om de chronische auto-immune aandoening te kunnen omkeren naar een volledig herstel zonder de noodzaak van levenslange behandelingen. Ondertussen moeten we roeien met de riemen die we hebben en ervoor zorgen dat myasthenia niet langer zo gravis is...

