

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/41483> holds various files of this Leiden University dissertation

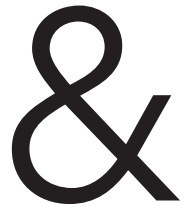
Author: Huijbers, Maartje

Title: The pathophysiology of MuSK myasthenia gravis

Issue Date: 2016-07-06

APPENDIX

English summary
Nederlandse samenvatting
List of publications
Curriculum Vitae
Dankwoord



ENGLISH SUMMARY

Muscle-specific kinase (MuSK) myasthenia gravis (MG) is a neuromuscular autoimmune disease that is hallmarked by fatigable muscle weakness of in particular the cranial and bulbar muscles and a high frequency of respiratory crises. MuSK regulates neuromuscular junction formation and maintenance by relaying the neuronal agrin-Lrp4 signal through binding with Lrp4 and activating intracellular signaling cascades facilitating acetylcholine receptor (AChR) clustering. The extracellular portion of MuSK consists of three Ig-like domains and a Frizzled-like (Fz) domain. Interaction with Lrp4 is facilitated through the Ig-like 1 domain, which also harbors the main immunogenic region (MIR) for MuSK auto-antibodies in MuSK MG. The other domains have been implicated in interactions with other proteins like ColQ and biglycan as well as a role as a trophic Wnt receptor.

Although the cause of the presence of the auto-antibodies is not known in MuSK MG, earlier studies have shown that auto-antibodies of the IgG4 subclass correlate with disease severity. In this thesis we have provided evidence for the pathogenicity of the IgG4 subclass antibodies by selectively purifying them from plasmapheresis material from patients and infusing them in NOD/SCID mice. These passive transfer experiments in mice lacking a functional innate and adaptive immune system, demonstrated progressive body weight loss and severe myasthenia. These effects could be attributed to declustering of the AChRs and dysregulation of neuromuscular transmission. Mice that received control IgG4 or IgG1,2,3 fractions from the same patients did not show these effects.

To further understand how the IgG4 auto-antibodies against MuSK cause myasthenia we tested the effects of these antibodies on the naturally occurring agrin-dependent MuSK-Lrp4 interaction *in vitro*. IgG4 MuSK patients' antibodies compete dose-dependently with the interaction between MuSK and Lrp4. Again, this was unique to the IgG4 subclass antibodies of patients only, and was not observed for the other antibody subclasses. Patient IgG4 antibodies did not cause inhibition of MuSK dimerization or MuSK internalization. As agrin-dependent MuSK-Lrp4 interaction is essential for maintaining the neuromuscular junction and its functionality, we concluded that loss of this interaction is the main pathomechanism by which the auto-antibodies cause myasthenia. This has now been confirmed by several independent studies.

As the different domains of MuSK have been implicated to support different roles in neuromuscular junction maintenance, and patients sometimes experience adverse effects of the first-line treatment of acetylcholine esterase inhibitors (AChEi), we studied how the immune response against MuSK patients changes over time and whether potential changes in the auto-immune repertoire may contribute to the AChEi hypersensitivity. Epitope mapping experiments showed a dominant response in all patients against the N-terminal Ig-like domain, which correlated tightly with disease severity both within and amongst patients. Epitopes outside this domain were identified in many patients, but epitope spreading was seen in only 19% of

the patients. Reactivity against other domains did not correlate with disease severity, nor did epitope specificity correlate to treatment responsiveness. These observations suggest that auto-antibodies against the first Ig-like domain are crucial determinants in the disease and support the idea that functional inhibition of MuSK-Lrp4 interaction is the predominant pathomechanism.

Because of the predominant bulbar weakness, MuSK patients can sometimes be misdiagnosed as amyotrophic lateral sclerosis (ALS) patients. We identified four patients that were initially diagnosed with having a bulbar form of ALS based on clinical examination, but later on were recognized to actually suffer from MuSK myasthenia. This misdiagnosis is rare as we did not find any other MuSK MG patients amongst a cohort of 256 ALS patients.

In addition to MuSK MG, 13 other neurological and non-neurological diseases have been identified to be associated predominantly with IgG4 auto-antibodies. From the diseases of which the pathomechanism has been studied, exciting parallels can be drawn to MuSK MG: (1) In all these diseases the antigens involve proteins responsible for maintaining cell-cell interaction and are often stabilizing essential receptors, and (2) the antibodies cause disease by interfering in protein-protein interaction, thereby inhibiting cell-cell interaction, resulting in severe disease. These observations suggest the presence of a specific sub-group in antibody-mediated auto-immune diseases. MuSK MG might therefore represent a promising model to study the cause and consequence of IgG4-mediated auto-immunity.

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Muscle-specific kinase (MuSK) myasthenia gravis (MG) is een neuromusculaire auto-immuunziekte die wordt gekenmerkt door vermoeibare spierzwakte van in het bijzonder de craniale en bulbair spieren en het vaak voorkomen van respiratoire crises. MuSK regelt de vorming en instandhouding van de neuromusculaire synaps door het doorgeven van het neuronale agrine-Lrp4 signaal. Door binding van Lrp4 aan MuSK activeren intracellulaire signalering cascades die acetylcholine receptor (AChR) clustering faciliteren. Het extracellulaire domein van MuSK bestaat uit drie Ig-achtige domeinen en een Frizzled-achtig (Fz) domein. Interactie met LRP4 wordt bewerkstelligt door het Ig1 domein, dat ook de belangrijkste immunogene regio (MIR) herbergt. De andere domeinen zijn betrokken bij interacties met andere eiwitten zoals ColQ en biglycan of heeft een rol als een trofisch Wnt receptor.

Hoewel de oorzaak van de aanwezigheid van auto-antilichamen in MuSK MG niet bekend is, heeft onderzoek aangetoond dat de auto-antilichamen van de IgG4 subklasse correleren met de ernst van de ziekte. In dit proefschrift hebben we de pathogeniteit van de IgG4 subklasse antilichamen onderzocht door ze selectief uit plasmaferese materiaal van patiënten te zuiveren en in NOD/SCID muizen te injecteren. Deze muizen, die een functioneel aangeboren en adaptief immuunsysteem missen, ontwikkelden gewichtsverlies en ernstige spierzwakte. Deze effecten werden veroorzaakt door het verlies van AChR clusters en de resulterende ontregeling van neuromusculaire transmissie. Muizen die IgG4 van gezonde controles of IgG1,2,3 fracties van dezelfde MuSK MG patiënten ontvingen ontwikkelden geen myasthenie.

Om beter te begrijpen hoe de IgG4 antistoffen tegen MuSK, myasthenie veroorzaken, hebben we de effecten van deze antilichamen op agrine-afhankelijke MuSK-Lrp4 interactie getest *in vitro*. IgG4 van MuSK MG patiënten veroorzaakte dosis-afhankelijke verlies van MuSK-Lrp4 interactie. Ook dit was uniek voor de IgG4 antilichamen van patiënten. De patiënt IgG4-antilichamen veroorzaakten geen inhibitie van MuSK dimerisatie of MuSK internalisatie. Aangezien agrine-afhankelijke MuSK-Lrp4 interactie essentieel is voor de stabiliteit en functionaliteit van de neuromusculaire junctie, hebben we geconcludeerd dat het verlies van deze interactie het belangrijkste mechanisme is waardoor de auto-antilichamen myasthenie veroorzaken. Dit is inmiddels bevestigd door verschillende andere onafhankelijke studies.

Omdat de diverse domeinen van MuSK verschillende functies hebben in de neuromusculaire junctie en patiënten soms nadelige effecten van de eerste lijnsbehandeling met acetylcholine-esterase-remmers (AChEi) ondervinden, hebben we onderzocht hoe de immuunrespons tegen MuSK varieert in de tijd en of een mogelijke verandering in het auto-immuun repertoire bijdraagt aan de AChEi overgevoeligheid. Epitop mapping experimenten toonden een dominante respons bij alle patiënten tegen het N-terminale Ig1 domein dat nauw correleert met de ernst van de ziekte binnen en tussen patiënten. Epitopen buiten dit domein komen voor bij veel patiënten, maar actieve epitop spreiding werd waargenomen

bij slechts 19% van de patiënten. Reactiviteit tegen de andere domeinen van MuSK correleert niet met de ernst van de ziekte noch correleert epitoopecificiteit met de response op AChEi. Deze waarnemingen suggereren dat auto-antilichamen tegen het eerste Ig domein van cruciaal belang zijn in de ziekte en het ondersteunt het idee dat de functionele remming van de MuSK-Lrp4 interactie de hoofdoorzaak van de myasthenie is.

Door de dominante bulbaire spierzwakte, worden MuSK MG patiënten soms verward met patiënten met amyotrofe laterale sclerose (ALS). We hebben vier patiënten geïdentificeerd waarbij een verkeerde diagnose gesteld werd. Deze patiënten werden primair gediagnostiseerd met een bulbaire vorm van ALS, terwijl ze eigenlijk MuSK MG hadden. Het stellen van een verkeerde diagnose is zeldzaam aangezien we geen andere MuSK MG patiënten hebben gevonden in een cohort van 256 ALS patiënten.

Naast MuSK MG zijn er tot nu toe 13 neurologische en niet-neurologische ziekten geïdentificeerd die worden geassocieerd met auto-antilichamen van het IgG4 subtype. Van de ziekten van wie het ziekte mechanisme is onderzocht, kunnen duidelijke parallellen worden getrokken met MuSK MG: 1) In al deze ziekten zijn de antigenen verantwoordelijk voor cel-cel interactie, en zijn ze vaak betrokken bij de stabilisatie van essentiële receptoren. 2) De auto-antilichamen remmen eiwit-eiwit interacties, waarbij cel-cel interacties verloren gaan, wat resulteert in ernstige ziekte. Deze waarnemingen suggereren dat het hier gaat om een specifieke subgroep onder de antilichaam-gemedieerde auto-immuunziekten. MuSK MG kan een veelbelovend model zijn om de oorzaak en gevolgen van IgG4-gemedieerde auto-immuniteit te bestuderen.

LIST OF PUBLICATIONS

Huijbers MG, Vink AD, Niks EH, Westhuis R, van Zwet EW, de Meel RH, Rojas Garcia R, Diaz Manera J, Kuks JB, Klooster R, Straasheijm K, Evoli A, Illa I, van der Maarel SM, Verschuuren JJ. Longitudinal epitope mapping in MuSK myasthenia gravis: implications for disease severity. *J Neuroimmunol*, 2016 Feb 15 (291); 82-88.

Huijbers MG, Querol LA, Niks EH, Plomp JJ, van der Maarel SM, Graus F, Dalmau J, Illa I, Verschuuren JJ. The expanding field of IgG4-mediated neurological autoimmune disorders. *Eur J Neurol*. 2015 May 29.

Gallardo E, Martínez-Hernández E, Titulaer MJ, **Huijbers MG**, Martínez MA, Ramos A, Querol L, Díaz-Manera J, Rojas-García R, Hayworth CR, Verschuuren JJ, Balice-Gordon R, Dalmau J, Illa I. Cortactin autoantibodies in myasthenia gravis. *Autoimmun Rev*. 2014 Oct;13(10):1003-7.

Huijbers MG*, Zhang W*, Klooster R, Niks EH, Friese MB, Straasheijm KR, Thijssen PE, Vrolijk H, Plomp JJ, Vogels P, Losen M, Van der Maarel SM, Burden SJ, Verschuuren JJ. MuSK IgG4 autoantibodies cause myasthenia gravis by inhibiting binding between MuSK and Lrp4. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Dec 17;110(51):20783-8.

Huijbers MG, Lipka AF, Plomp JJ, Niks EH, van der Maarel SM, Verschuuren JJ. Pathogenic immune mechanisms at the neuromuscular synapse: the role of specific antibody-binding epitopes in myasthenia gravis. *J Intern Med*. 2014 Jan;275(1):12-26.

Huijbers MG, Lipka AF, Potman M, Hensbergen PJ, Titulaer MJ, Niks EH, van der Maarel SM, Klooster R, Verschuuren JJ. Antibodies to active zone protein ERC1 in Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Hum Immunol*. 2013 Jul;74(7):849-51.

Verschuuren JJ, **Huijbers MG**, Plomp JJ, Niks EH, Molenaar PC, Martinez-Martinez P, Gomez AM, De Baets MH, Losen M. Pathophysiology of myasthenia gravis with antibodies to the acetylcholine receptor, muscle-specific kinase and low-density lipoprotein receptor-related protein 4. *Autoimmun Rev*. 2013 Jul;12(9):918-23.

Plomp JJ, **Huijbers MG**, van der Maarel SM, Verschuuren JJ. Pathogenic IgG4 subclass autoantibodies in MuSK myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci*. 2012 Dec;1275:114-22.

Klooster R*, Plomp JJ*, **Huijbers MG**, Niks EH, Straasheijm KR, Detmers FJ, Hermans PW, Sleijpen K, Verrips A, Losen M, Martinez-Martinez P, De Baets MH, van der Maarel SM, Verschuuren JJ. Muscle-specific kinase myasthenia gravis IgG4 autoantibodies cause severe neuromuscular junction dysfunction in mice. *Brain*. 2012 Apr;135(Pt 4):1081-101.

Lancaster E*, **Huijbers MG***, Bar V, Boronat A, Wong A, Martinez-Hernandez E, Wilson C, Jacobs D, Lai M, Walker RW, Graus F, Bataller L, Illa I, Markx S, Strauss KA, Peles E, Scherer SS, Dalmau J. Investigations of caspr2, an autoantigen of encephalitis and neuromyotonia. *Ann Neurol*. 2011 Feb;69(2):303-11.

Lai M*, **Huijbers MG***, Lancaster E, Graus F, Bataller L, Balice-Gordon R, Cowell JK, Dalmau J. Investigation of LGI1 as the antigen in limbic encephalitis previously attributed to potassium channels: a case series. *Lancet Neurol*. 2010 Aug;9(8):776-85.

Huijbers MG, Niks EH, Klooster R, de Visser M, Kuks JB, Veldink JH, Klarenbeek P, Van Damme P, de Baets MH, van der Maarel SM, van den Berg LH, Verschuuren JJ. Myasthenia gravis with muscle specific kinase antibodies mimicking amyotrophic lateral sclerosis. *Neuromuscul Disord*, 2016 June;26(6):350-3

*Both authors contributed equally

PATENTS

SJ Burden, W Zhang, **M Huijbers**, JJ Verschuuren, SM van der Maarel Methods for treating muscle specific receptor kinase myasthenia gravis 2014, US Patent App. 14/486,400

CURRICULUM VITAE

Maartje Huijbers was born on the 16th of March 1985 in Eindhoven. In 2003 she graduated from the Dr. Knippenbergcollege in Helmond and started the undergraduate program of Medicine at Maastricht University. After successfully completing the first two years, she decided to take a short leave to start a bachelor in Molecular Life Sciences at the same university. After she finished her bachelor's degree in Maastricht, she started a master's programme in Biomedical Sciences at Leiden University. Her first internship "Investigating new targets in seronegative myasthenia gravis" under the supervision of dr. Rinse Klooster and prof. Jan Verschuuren sparked her enthusiasm for the neuromuscular autoimmune field. She continued in this field by investigating peripheral and central nervous system autoimmune diseases during an 11 month internship in the prof. Josep Dalmau lab at the University of Pennsylvania in Philadelphia. This led to two publications which currently have been cited over 550 times.

After graduating in 2011 she started a PhD at the departments of Neurology and Human Genetics of the LUMC under supervision of Prof. Jan Verschuuren and Prof. Silvère van der Maarel investigating the pathomechanism of MuSK myasthenia gravis. The results of this PhD are outlined in this thesis. In collaboration with Prof. Steven Burden at New York University she unravelled the main pathomechanism by which MuSK auto-antibodies cause myasthenia. These results also led to a patent application and prizes for "Best Content" at the Annual Neurology Science Day at the LUMC as well as the Myasthenia Gravis Young Investigator Travel Fellowship from the New York Academy of Sciences.

Her enthusiasm for science reaches further than research alone. She guided ten students, has been an engaged member of Student and PhD candidate representation committees, organized several conferences and is a member of the Boerhaave Committee (responsible for post-academic education).

Currently, she is employed as a post-doctoral researcher at the departments of Neurology and Human Genetics of the LUMC.



DANKWOORD

Graag wil ik mijn promotoren Prof. Dr. Jan Verschuuren en Prof. Dr. Silvère van der Maarel danken voor hun vertrouwen, support en enthousiasme. Het samenspel tussen de klinische blik van Jan en de praktische technische kennis van Silvère, tezamen met jullie creativiteit hebben mij veel geleerd en maken het een feest om te mogen werken "op de brug van het LUMC".

Naast supervisie van mijn promotoren zijn er ook twee bijzondere mensen die mij de fijne kneepjes van het vak hebben geleerd. Jaap, dank voor al je adviezen, kritische blik en steun in het proefdieronderzoek. Daarnaast Rinse. Ik heb vrijwel alles wat ik hier in het lab weet van jou geleerd. Ik ben je daarvoor, en voor onze fijne persoonlijke samenwerking, erg dankbaar.

I had the incredible opportunity of studying abroad twice. First I would like to thank Josep, Myrna and Rita for welcoming me in their labs in Philadelphia, for being my American family, taking care of me when I was sick and for teaching me so much about autoimmunity and performing research. The second trip was to Steve in New York. Thank you and Ruth for all your advice, the awesome Skirball apartment and enabling any idea I had to be translated into practise.

Ik heb het geluk gehad te mogen samenwerken met drie enorm goede analisten. Kirsten, dank voor je hulp! Zelfs toen ik aan de andere kant van de oceaan zat was je nooit te beroerd om me met of aan data te helpen. Yvonne, wat is het fijn dat we jou in ons team hebben. Je bent ongelofelijk hardwerkend en aanstekelijk enthousiast. Bedankt voor de steun zowel wetenschappelijk als privé. Daarnaast Inge. Dank voor je bereidheid om altijd te helpen, jouw organisatietalent en mooie data en/of snoepjes om me door het 4 uur moment heen te helpen.

Het prettige aan de afdeling Humane Genetica is het feit dat je vrijwel iedereen aan kan spreken voor hulp, antilichamen, apparaten of advies. Daarom eerst een groot DANK! Voor de hele afdeling en iedereen die me feedback of hulp heeft gegeven.

Daarnaast natuurlijk mijn directe collegae. Aan de medische kant: Ellen, Erik, Maarten en Sander. Elke keer weer leer ik van jullie door de klinische kant te verweven met onze wetenschappelijke kennis. Bedankt ook voor de leuke congressen en de onbeperkte supply aan patiënteninformatie. Ingrid, hartelijk dank voor jouw steun bij het verkrijgen en opslaan van patiëntensera en materialen en in het bijzonder jouw flexibiliteit bij de "last minute" verzoekjes.

Dan mijn directe collega's. Lief en leed heb ik met velen van jullie gedeeld, waarvoor dank. In de wetenschap zijn de tegenslagen vaak omvangrijker dan de meevallers, maar wat je wel met elkaar in de hand hebt is of je die tegenslagen met plezier tegemoet treedt. Mijn kamergenootjes, de FSHD collegae, de oude proteomics groep en in het bijzonder Amanda M, Amanda P, Bianca, Klaus (Maarten), Laure, Lucia, Marlinde, Thomas, en Yvonne K hebben dit voor mij zeker bewerkstelligd. Daarnaast uiteraard een groot dank voor de mooie (praktische) grappen, de jaarlijkse culinaire experimenten en bovenal de mentale steun, Peter.

In de afgelopen jaren zijn er ook een aantal studenten de revue gepasseerd. Ik wil graag Mar, Sophie, Pauline, Natasa, Marieke, Anna-Fleur, Hanna, Robert, Ruben en Rory danken voor jullie vertrouwen in mij en al jullie hulp. Lesgeven is mijns inziens de beste manier van leren en ik heb er met jullie erg van genoten.

Promoveren is denk ik grotendeels een kwestie van uithoudingsvermogen. Een aantal van mijn lieve vrienden hebben extra bijgedragen aan het vergroten hiervan. Graag dank ik mijn studievrienden Leo, IIs, Diahann, Kay, Mich, Marieke en Anneliene, mijn VAO/LAP friends, de frituurclub, mijn fantastische vriendinnen en oudhuisgenootjes Caro en Lisan voor de foute maar ontzettend gezellige avonden die mij er vaak doorheen gesleept hebben. En dan mijn vrienden vanuit de oudheid: Luuk, Bart, Myrthe en de kids, Putri (ook voor de prachtige kaft), Ana en Pauline, Tamara en Claudje. Op afstand, maar niet minder in mijn hart en bereid om me te steunen en op te beuren met gezelligheid! En natuurlijk Smirt, niet voor niets mijn paranimf. Wat heerlijk om de ins en outs van het promoveren samen te delen i.c.m. heel veel fun en fijne gesprekken. Bedankt voor alle jaren ongecompliceerde steun!

Ook mijn familie wil ik danken voor hun voortdurende interesse, de kaartjes overzee en het geduld om op deze ceremonie te wachten. In het bijzonder wil ik ook mijn lieve oma danken, voor haar wijze woorden, koude handen en warme hart die me vaak hebben opgevrolijkt!

Tot slot de mensen die er altijd voor mij waren en hopelijk er altijd zullen zijn. Mama en pappa, dank voor jullie vertrouwen en support. Dat ik altijd op stimulatie kon rekenen en af en toe een kritische vraag. Jullie hebben mij altijd hard werken geleerd in combinatie met goede intenties, zie hier het resultaat! En mijn lieve zussen Sanne, Dorien en Leonie. Het is fantastisch dat we al zo vele jaren succes, plezier, lief en leed met elkaar kunnen delen. Bedankt voor de steun en het luisterend oor. Dit boekje is mede mogelijk gemaakt door jullie ☺.

En dan tot slot mijn lieve vriend Paul. Hoe onwaarschijnlijk was onze ontmoeting en hoe onwaarschijnlijk fijn hebben wij het samen. Dank voor je steun, regelmatige champagne dosissen en jouw (flauwe) grappen die me het licht in de soms donkere tijden geven. Het is een eer en een feest om met jou aan mijn zijde te mogen promoveren en te leven.