

# Age-related resistance to experimental autoimmune myasthenia gravis : immunological and neurobiological aspects

## Citation for published version (APA):

Hoedemaekers, C. W. E. (1997). *Age-related resistance to experimental autoimmune myasthenia gravis : immunological and neurobiological aspects*. Universiteit Maastricht.

## Document status and date:

Published: 01/01/1997

## 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](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

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

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

---

## Summary and general discussion

Experimental autoimmune myasthenia gravis (EAMG) is an animal model for the disease myasthenia gravis (MG). The antibody-mediated immune attack in MG and EAMG results in loss of acetylcholine receptor (AChR) with destruction of the postsynaptic membrane and disturbance of the neuromuscular transmission. The pathogenic mechanisms leading to AChR loss in MG and EAMG include cross-linking of AChR by anti-AChR antibodies, complement-mediated focal lysis of the postsynaptic membrane and direct interference of anti-AChR antibodies with ligand binding.

Susceptibility and course of MG and EAMG are determined by both the immune attack and by the target organ. Clinical severity of disease correlates well with functional activities of anti-AChR antibodies, such as the capacity to reduce AChR function. In addition, a strong correlation between severity of disease and AChR degradation rates was found, using immunoglobulins from MG patients on cultured myotubes. Furthermore, the blocking of acetylcholine binding by antibodies correlated with the severity of disease. However, total anti-AChR antibody titers, the amount of AChR complexed with antibody or AChR loss correlate poorly with the severity of neuromuscular dysfunction.

It has been shown that certain AChR haplotypes and a high frequency of microsatellite variants are associated with a higher susceptibility for MG. Furthermore, analysis of AChR  $\alpha$ -subunit mRNA concentrations in biopsies from MG patients revealed increased levels of AChR  $\alpha$ -subunit mRNA in severely affected patients, whereas no increase was found in moderately ill patients, independently of the anti-AChR antibody titers.

Aged rats are resistant to induction of EAMG. In this study possible factors underlying this age-related resistance were analyzed. The results of this study may elucidate factors determining susceptibility and severity of disease in MG patients.

---

In **Chapter 1** current facts about the structure and function of the neuromuscular junction (NMJ), MG and EAMG are reviewed. The NMJ plays a central role in the transmission of electrical impulses from nerve to muscle. The presynaptic axonal terminal releases the neurotransmitter acetylcholine which binds to AChR located at the tops of the postsynaptic junctional folds. The AChR is a transmembrane glycoprotein composed of 4 different subunits that form a pentameric structure around a central ionchannel. The  $\alpha$ -subunit contains both the acetylcholine binding site and the main immunogenic region (MIR) towards which the majority of the antibodies in MG and EAMG is directed. During development, the AChR accumulates at high density at the crests of the postsynaptic junctional folds. The specialized synaptic basal lamina and the postsynaptic membrane contain factors that are involved in clustering and anchoring of the AChR in the postsynaptic membrane. The expression of the AChR genes is highly compartmentalized and restricted to the subsynaptic nuclei. The expression is under control of electrical activity and neural factors and is determined through DNA regulatory sequences in cis and by trans-acting nuclear factors (myogenic regulatory factors). Aging results in gradual changes in structure and function of the NMJ, skeletal muscle fibers and in levels of myogenic regulatory factors.

MG is an autoimmune disease characterized by muscular weakness and excessive fatigue as a result of loss of functional AChR. The loss of AChR is entirely antibody mediated. The anti-AChR antibody production by B cells is T cell dependent, and involve Th1, Th2 or Th0 subpopulations. Thymic abnormalities, including thymic hyperplasia and thymoma, are found in the majority of the MG patients. The thymus in both normal individuals and MG patients contain all components necessary to induce an autoimmune response including autoreactive T cells, antigen presenting cells and the AChR protein, suggesting a role for this organ in the pathogenesis of the disease. The antibody mediated immune attack in MG results in loss of AChR, simplification of the postsynaptic membrane and widening of the synaptic space. The diagnosis MG is based on clinical history, physical examination, presence of anti-AChR antibodies, and disturbances in neuromuscular transmission as measured by electromyography. Treatment consists of anticholinesterase drugs, immunosuppression and thymectomy.

---

EAMG is a valid model for the disease MG. Chronic EAMG can be induced by active immunization with purified native AChR or with individual subunits or peptides. Passive transfer EAMG can be induced by passive transfer of polyclonal or monoclonal anti-AChR antibodies. MAbs that are directed against the MIR are very efficient in inducing EAMG. Several species are susceptible to EAMG. Within one species susceptibility has been shown to be determined by genetic factors, the available anti-AChR antibody repertoire and sex hormones. Similar to MG, the anti-AChR antibody production in EAMG is T helper cell dependent. The pathogenic mechanisms leading to AChR loss in MG and EAMG include cross-linking of AChR by anti-AChR antibodies, complement-mediated focal lysis of the postsynaptic membrane, and direct interference of anti-AChR antibodies with ligand binding or ionchannel function. Destruction of the postsynaptic membrane in MG and EAMG, and subsequent disturbed neuromuscular signal transmission, results in increased expression of the AChR subunit genes and increased AChR protein synthesis. Experimental therapies in EAMG include co-immunization with competitor peptides, induction of mucosal tolerance by nasal or oral AChR administration, manipulation of the idiotype anti-idiotype network and interference with binding of anti-AChR antibodies by high affinity Fab fragments.

In **Chapter 2** the influence of age and sex on induction of chronic EAMG was analyzed in BN rats. Aged male BN rats, immunized with tAChR, showed no clinical signs of disease or AChR loss. Immunization of young male BN rats resulted in both clinical signs of disease and AChR loss. In contrast, both young and aged female BN rats showed comparable AChR loss, although aged female rats did not develop clinical signs of disease. In search for an immunologic cause, we analyzed possible differences in anti-AChR antibody titers, isotypes, specificity and complement deposition between susceptible and resistant rats.

Anti-rat AChR antibody titers remained lower in aged than in young female rats. In aged male rats boosted with tAChR, anti-rat AChR antibody titers were similar to young male myasthenic animals after a single injection, but they nevertheless failed to develop EAMG. The isotype distribution of the anti-tAChR antibody response proved to be similar in EAMG susceptible and resistant rats and was equally distributed among the IgG1, IgG2a and IgG2b

---

isotypes, which are all capable of complement fixation. Immunohistochemical staining revealed comparable depositions of complement component C3 and membrane attack complex (MAC) in muscle biopsies, that coincided with the localization of AChR in both EAMG resistant and susceptible rats. Differences in antibody fine specificity between young and aged rats might result in the existence of a particular pathogenic anti-AChR antibody subset in young animals inducing EAMG. However, no differences in the proportion of serum antibodies that were directed against the MIR or  $\alpha$ -Bungarotoxin binding site were found between susceptible and resistant rats. *In vitro* antigenic modulation experiments with TE671 cells showed that sera from young susceptible and aged resistant rats were able to induce similar AChR loss.

These results show that resistance to EAMG is age and sex related. Furthermore, these results illustrate that resistance to EAMG is not the result of a deficiency in the immunological effector mechanisms in resistant aged rats.

The contribution of macrophages to the age-related resistance to EAMG was studied in **Chapter 3**. Induction of passive transfer EAMG in young susceptible rats is characterized by infiltration of the NMJ with macrophages. These macrophages are ED-1 positive and represent newly recruited exudate macrophages. Aged rats, resistant to AChR loss in passive transfer EAMG, do not reveal infiltrating macrophages at the endplates. Aging is associated with a general decline in immune function, and macrophage function may be impaired in aged rats. Therefore, aged rats were reconstituted with bone marrow derived from young syngeneic donors prior to induction of passive transfer EAMG. However, this did not restore macrophage infiltration and did not abolish resistance to EAMG in aged rats.

To investigate whether macrophages are a primary cause of antibody mediated AChR loss or attracted to the NMJ secondary to tissue damage, young EAMG susceptible rats were lethally irradiated to deplete them from circulating leukocytes and bone-marrow derived precursor cells. Irradiation of rats, prior to induction of passive transfer EAMG, resulted in absence of ED-1 positive macrophages at the NMJ. However, macrophage depletion did not protect rats from clinical signs of disease or AChR loss. The predominant immune effector response in EAMG is antibody mediated and involves activation of the lytic phase of the complement cascade. Despite

---

the absence of infiltrating macrophages, depositions of MAC were found at all endplates of aged and irradiated young rats, indicating that the immunopathological effector mechanisms were operational and chemotactic factors for the attraction of macrophages were present.

The results of these experiments suggest that the absence of infiltrating macrophages in aged rats in passive transfer EAMG is not due to decreased macrophage function in these rats. More likely, the absence of AChR loss and muscle fiber necrosis, prevents chemotaxis of macrophages towards the NMJ. Furthermore, in susceptible rats macrophages do not contribute to AChR loss in the effector phase of EAMG, but are more likely a phenomenon secondary to AChR loss and tissue damage.

In **Chapter 4** differences in susceptibility to EAMG between young and aged Lewis and BN rats were used to analyze factors determining clinical severity of disease. Susceptibility to EAMG was found to decrease with aging in both Lewis and BN rats. Resistance to clinical signs of disease and AChR loss, developed at an earlier age in BN rats than in Lewis rats. Aged female rats showed no clinical signs of disease despite significant AChR loss. The incidence and severity of muscular weakness were not proportional to the amount of AChR loss.

Aged rats showed significantly lower anti-rat AChR antibody titers compared to young rats and developed no, or only mild signs of muscular weakness. Sera from young and aged rats were tested in their ability to interfere with normal AChR function. Although sera from young susceptible rats inhibited normal AChR function significantly more than those of aged resistant rats, this difference was shown to be due to higher serum anti-AChR antibody titers. These results might suggest that resistance to EAMG in aged rats was related to lower anti-rat AChR antibody titers. This dose dependent effect of antibodies was also supported by the fact that aged rats were more susceptible to AChR loss in chronic EAMG, a condition in which the endplates are exposed to a higher concentration of antibody for a longer period of time, as compared to passive transfer EAMG. However, it has been shown previously that aged rats with similar anti-AChR antibody titers as young rats nevertheless fail to develop clinical signs of disease. Moreover, in individual young or aged rats no correlation was found between the clinical signs of disease and anti-AChR antibody titers.

---

Neuromuscular transmission was found to change with aging as measured by single fiber electromyography (SFEMG). In Lewis rats jitters progressively decreased with age, suggesting that neuromuscular transmission is facilitated in aged Lewis rats. Aged female BN rats, however, showed signs of disturbed neuromuscular transmission before immunization. Upon immunization, jitter increased in young and aged Lewis rats and young BN rats, whereas the clinical resistant aged BN rats showed no significant increase in jitter values. Aging may have resulted in a dysfunction of neuromuscular transmission in aged BN rats, which in turn activated mechanisms at the level of the postsynaptic membrane, making the NMJ less susceptible to an antibody mediated attack.

These results indicate that the age-related susceptibility to EAMG is influenced by anti-rat AChR antibody titers. In addition, differences in pre-existing neuromuscular transmission properties may be involved in determining the clinical outcome in EAMG.

**Chapter 5** describes the differential susceptibility of young and aged rat muscle to antibody mediated AChR degradation in EAMG. In the previous chapters it was shown that the age-related resistance to EAMG could not be attributed to deficiencies in the immune attack towards the NMJ in aged rats. It is therefore most likely that the resistance to EAMG in aged rats resides at the level of the target organ. Mechanisms that could account for this age-related resistance include a more efficient compensatory AChR neosynthesis in aged rats or resistance of the AChR protein to antibody mediated AChR degradation.

In MG and EAMG the antibody-mediated AChR degradation results in neuromuscular transmission defects, leading to increased transcription of AChR  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\epsilon$ -, and  $\delta$ -subunit genes. Induction of EAMG in resistant aged rats did not result in an increase in the amount of AChR  $\alpha$ -subunit mRNA, whereas the levels of AChR  $\alpha$ -subunit mRNA increased 3-fold in EAMG susceptible young rats, as measured by competitive RT-PCR. Denervation experiments indicated that aged rats retain the potential to increase AChR neosynthesis to a level comparable to that in young rats. In situ hybridization experiments indicated that the expression of  $\alpha$ - and  $\epsilon$ -subunit genes remained restricted to synaptic areas in aged rats. Furthermore, no increase in synaptic expression of  $\alpha$ - and  $\epsilon$ -subunit genes was observed in EAMG resistant aged rats, excluding the

---

possibility of local compensatory AChR neosynthesis by subsynaptic nuclei. These results indicate that in EAMG resistant aged rats neuromuscular transmission is functional and electrical activity-dependent repression of extrasynaptic AChR gene expression is maintained.

*In vivo* AChR degradation experiments showed no loss of *in vivo* labelled AChR in EAMG resistant aged rats, whereas significant loss was measured in EAMG susceptible young rats. These results indicate that in aged rats the AChR protein in the postsynaptic membrane is resistant against antibody-mediated AChR degradation. Several proteins of the basal lamina and cytoskeleton play an important role in clustering and anchoring of AChR in the postsynaptic membrane. The relative amounts of rapsyn, s-laminin and agrin were found to change with aging. Changes in the composition of the postsynaptic membrane may increase the rigidity of the postsynaptic membrane, which may result in resistance to antigenic modulation and subsequent internalization.

The results of our study indicate that resistance to induction of EAMG in aged rats is determined by resistance of the AChR in the postsynaptic membrane to antibody-mediated degradation. Furthermore, induction of EAMG in aged rats is influenced by anti-rat antibody titers. The neuromuscular dysfunction in MG and EAMG is the result of a combination of several factors, including both the immune attack and the target organ.



138



## Samenvatting en algemene discussie

Myasthenia gravis (MG) is een autoimmuun ziekte waarbij autoantilichamen gericht zijn tegen acetylcholine receptoren (AChR) die gelegen zijn op de overgang tussen zenuwuiteinde en spiercelmembraan (neuromusculaire overgang). Verlies van functionele AChR leidt tot een verstoring van de signaaloverdracht tussen zenuwuiteinde en spiercelmembraan waardoor spierzwakte en verlamming ontstaan. Anti-AChR antilichamen veroorzaken dit verlies via tenminste 3 mechanismen: 1. koppeling van naburige AChR moleculen door ("crosslinking") waardoor de internalisatie snelheid van de AChR sterk toeneemt; 2. activatie van het complement systeem met als gevolg focale lysis van de postsynaptische membraan; 3. blokkade van de activatie van de AChR door anti-AChR antilichamen die de binding van de neurotransmitter acetylcholine verhinderen. Verstoring van de neuromusculaire signaaltransductie activeert ter hoogte van de neuromusculaire overgang een aantal mechanismen die het verlies van AChR compenseren. In het zenuwuiteinde neemt o.a. de hoeveelheid acetylcholine, nodig voor de overdracht van het elektrische signaal van zenuw naar spier, sterk toe. Ter hoogte van de AChR neemt de expressie van de genen die coderen voor de verschillende onderdelen ("subunits") van de AChR toe, om zo het verlies van AChR zo goed mogelijk te compenseren.

Experimentele autoimmuun myasthenia gravis (EAMG) is een proefdiermodel voor een aantal aspecten van de ziekte MG. EAMG kan in een groot aantal proefdiersoorten zoals ratten, muizen, konijnen en apen worden opgewekt. Men onderscheidt 2 proefdiermodellen: chronische (actieve) EAMG en passieve EAMG. Het opwekken van chronische EAMG gebeurt door immunisatie met AChR, die gezuiverd zijn uit de elektrische organen van de elektrische rog *Torpedo Californica*. Ongeveer 4-6 weken na immunisatie ontstaat door de gevormde antilichamen een chronische vorm van de ziekte met spierzwakte en verlies van AChR die vergelijkbaar is met de symptomen in MG patiënten. Het opwekken van de passieve vorm van

---

EAMG gebeurt middels injectie van anti-AChR antilichamen in proefdieren ("passive transfer EAMG") en resulteert reeds binnen 24-48 uur tot klinische verschijnselen van myasthenie en AChR verlies.

De gevoeligheid voor EAMG verschilt zowel tussen verschillende species als ook binnen 1 species en wordt ondermeer door genetische factoren bepaald. Daarnaast blijkt de leeftijd van het proefdier een grote rol te spelen in de gevoeligheid voor het opwekken van EAMG. Het is gebleken dat oude ratten resistent zijn tegen opwekken van EAMG, dit in tegenstelling tot jonge ratten. In dit proefschrift worden de mogelijke mechanismen die aan deze resistentie ten grondslag liggen beschreven. Resultaten van dit proefschrift kunnen meer inzicht bieden in factoren die het verschil in gevoeligheid en ernst van de ziekte bij MG patiënten beïnvloeden.

In **Hoofdstuk 1** wordt een overzicht gegeven van de meest recente literatuur omtrent de structuur en functie van de neuromusculaire overgang, de autoimmuun ziekte MG en het proefdiermodel EAMG. Voorts wordt de invloed van leeftijd op de structuur en functie van de neuromusculaire overgang en op gevoeligheid en klinische ernst van de ziekte MG beschreven. Bij het ouder worden ontstaat een aantal morfologische veranderingen ter hoogte van de neuromusculaire overgang. De lengte van de postsynaptische membraan neemt toe, terwijl de postsynaptische plooiing in de membraan afneemt. Daarnaast bestaan er aanwijzingen dat de regulatie van de expressie van AChR genen verandert.

De incidentie van de ziekte MG vertoont een bimodale verdeling met een 1e piek tussen 20-29 jaar welke met name vrouwen betreft, en een 2e piek tussen 70-79 jaar waarbij mannen en vrouwen ongeveer gelijk zijn getroffen. Jonge vrouwen blijken derhalve gevoeliger voor de ziekte MG te zijn dan jonge mannen, wat een immuun-modulerende rol voor geslachtshormonen suggereert. In de literatuur zijn slechts weinig gegevens beschikbaar met betrekking tot de ernst en het verloop van de ziekte bij oudere MG patiënten. Uit analyse van een gering aantal studies blijkt dat ernst van de ziekte vergelijkbaar is tussen jonge en oude patiënten. Oudere patiënten vertonen echter een betere reactie op therapie dan jongere patiënten en vertonen een lagere mortaliteit.

---

In **Hoofdstuk 2** wordt de invloed van leeftijd en geslacht op de gevoeligheid voor chronische EAMG in Brown Norway (BN) ratten nader geanalyseerd. Oude mannelijke ratten vertonen geen tekenen van spierzwakte of AChR verlies na immunisatie met AChR. Jonge mannelijke ratten daarentegen ontwikkelen zowel spierzwakte als ook AChR verlies. Jonge en oude vrouwelijke ratten hebben een vergelijkbaar verlies van AChR in dit chronische model, echter alleen jonge vrouwelijke ratten vertonen klinische verschijnselen van spierzwakte. Een aantal factoren die aan deze leeftijds-gebonden resistentie ten grondslag kunnen liggen, zijn bestudeerd.

Anti-AChR antilichaam titers gemeten bij oude vrouwelijke ratten zijn lager dan bij jonge vrouwelijke ratten. Oude mannelijke ratten echter ontwikkelen antilichaam titers die vergelijkbaar zijn met die van jonge ratten, maar blijven desondanks ongevoelig voor de ziekte. Er bestaat geen verschil in de immunoglobuline isotype verdeling of in de fijne specificiteit van de anti-AChR antilichamen tussen gevoelige en resistente ratten. Bij histologisch onderzoek worden vergelijkbare afzettingen van de complement componenten C3 en C5-9 gevonden ter hoogte van de zenuwuiteinden van jonge en oude ratten. Antilichamen van jonge en oude ratten hebben voorts een vergelijkbare capaciteit om AChR te crosslinken en te internaliseren.

De resultaten van deze experimenten tonen aan dat gevoeligheid voor het opwekken van chronische EAMG beïnvloedt wordt door zowel leeftijd als geslacht van de ratten. De resistentie tegen het opwekken van EAMG is derhalve niet het gevolg van ontoerijkende in immunopathogene mechanismen die tot verlies van AChR leiden.

**Hoofdstuk 3** omvat de mogelijke rol van macrofagen in de leeftijdsafhankelijke resistentie tegen EAMG. Opwekken van het passive transfer EAMG model bij jonge ratten gaat histologisch gepaard met infiltratie van de neuromusculaire overgangen door macrofagen. In oude, resistente ratten worden deze macrofaag infiltraten niet aangetroffen. Om uit te sluiten dat macrofagen in oude ratten minder functioneel zijn en zo resistentie tegen EAMG verklaren, zijn oude ratten bestraald met Röntgen straling om zo de circulerende witte bloedcellen (waaruit macrofagen afkomstig zijn) te vernietigen. Deze witte bloedcellen van oude ratten zijn

---

vervolgens vervangen door witte bloedcellen van genetisch identieke jonge ratten. Hiertoe is aan oude ratten een beenmergtransplantatie gegeven met beenmerg afkomstig van jonge donorratten. Ondanks de aanwezigheid van jonge macrofagen, blijven oude ratten resistent tegen het opwekken van passieve transfer EAMG en worden er geen infiltrerende macrofagen gevonden ter hoogte van de neuromusculaire overgang in oude ratten.

Om vast te stellen of macrofagen een primaire rol spelen bij het veroorzaken van AChR verlies in EAMG, zijn jonge EAMG gevoelige ratten bestraald met Röntgen straling om zo de circulerende witte bloedcellen te vernietigen. Bestraling van jonge ratten voorafgaand aan inductie van passieve transfer EAMG resulteert in afwezigheid van macrofagen ter hoogte van de neuromusculaire overgang. Echter deze bestraalde ratten vertonen evenveel AChR verlies als niet bestraalde ratten.

Deze experimenten tonen aan dat afwezigheid van macrofagen niet de oorzaak is van de resistentie tegen passieve transfer EAMG in oude ratten. Verder spelen macrofagen geen primaire rol bij het antilichaam-gemedieerde AChR verlies, maar zij worden waarschijnlijk secundair naar de neuromusculaire overgang aangetrokken om de ontstane weefselschade op te ruimen.

In **Hoofdstuk 4** worden bestaande verschillen in gevoeligheid voor EAMG tussen jonge en oude ratten van 2 verschillende stammen gebruikt om factoren te analyseren die de ernst van de ziekte kunnen beïnvloeden. Zowel bij Lewis als bij BN ratten neemt de gevoeligheid voor EAMG af met de leeftijd. Resistentie tegen EAMG ontstaat in BN ratten op jongere leeftijd dan in Lewis ratten. Er bestaat geen directe correlatie tussen ernst van de klinische verschijnselen en mate van AChR verlies. Oude ratten hebben significant lagere anti-AChR antilichaam titers dan jonge ratten en ontwikkelen geen of slechts milde klinische verschijnselen. De capaciteit van deze antilichamen om rechtstreeks de AChR functie te blokkeren is hoger in jonge dan in oude ratten, maar dit verschil kan volledig worden toegeschreven aan verschillen in antilichaam titers. Deze resultaten suggereren dat anti-AChR antilichaam titers aan het verschil in gevoeligheid tussen jonge en oude ratten ten grondslag kunnen liggen. Echter, ook bij vergelijkbare anti-AChR antilichaam titers tussen jonge en oude ratten blijven oude ratten

---

resistent tegen inductie van EAMG. Bovendien bestaat er geen relatie tussen ernst van de spierzwakte en anti-AChR antilichaam titers.

De kwaliteit van de neuromusculaire signaal overdracht kan met single-fiber electromyografisch onderzoek (SFEMG) worden gemeten; de z.g. jitter is een maat voor de variatie van deze signaal overdracht. In Lewis ratten neemt de jitter progressief af met het toenemen van de leeftijd, wat een verbeterde neuromusculaire overdracht suggereert. In oude BN ratten daarentegen worden hogere jitter waarden gevonden dan in jonge ratten. Na immunisatie met AChR neemt in oude Lewis ratten de jitter toe, terwijl bij oude BN ratten geen verschil in neuromusculaire overdracht wordt gemeten. Mogelijk is er bij het ouder worden in BN ratten een compensatie mechanisme ontstaan ter hoogte van de zenuw-spier overgang dat beschermt tegen verder functieverlies.

Deze resultaten tonen aan dat de leeftijds-afhankelijke resistentie tegen EAMG wordt beïnvloedt door verschillen in anti-AChR antilichaam titers. Daarbij lijken verschillen in pre-existente neuromusculaire overdracht kwaliteiten de klinische ernst van de ziekte mede te bepalen.

**Hoofdstuk 5** omvat het verschil in gevoeligheid van het doelwitorgaan voor het opwekken van EAMG. Uit de voorgaande hoofdstukken is gebleken dat verschillen in het immuunsysteem de resistentie tegen het opwekken van EAMG in oude ratten niet geheel kunnen verklaren. Het is het meest waarschijnlijk dat de resistentie door de AChR in de postsynaptische membraan wordt bepaald. Opwekken van EAMG in gevoelige ratten leidt tot toename van het AChR boodschapper RNA (mRNA) welke een verhoogde synthese van AChR reflecteert. Meting van de totale AChR mRNA concentraties in spieren van oude ratten laat daarentegen geen toename zien. In spiercoupes van jonge en oude ratten is het mogelijk de AChR mRNA concentratie lokaal ter hoogte van de neuromusculaire overgang te meten. In oude ratten blijft de hoeveelheid mRNA gelijk na induceren van EAMG, terwijl in jonge ratten de hoeveelheid mRNA afneemt. Omdat er geen initieel verlies van AChR optreedt in oude ratten, betekent dit dat in oude ratten waarschijnlijk geen AChR neo-synthese plaatsvindt om eventueel verlies van AChR te compenseren.

---

Om te bestuderen of de AChR zelf resistenter is tegen afbraak in oude ratten dan in jonge ratten, zijn beide groepen geïnjecteerd met radioactief  $\alpha$ -Bungarotoxine. Dit slangegif bindt irreversibel aan de AChR om te worden gelabeld. Nadat het slangegif irreversibel gebonden heeft aan de AChR, wordt het passieve transfer EAMG model in jonge en oude ratten opgewekt. In jonge ratten is een verlies van radioactief gelabelde AChR gemeten, terwijl in oude ratten geen verlies van gelabelde AChR plaatsvindt. Dit bewijst dat resistentie tegen EAMG in oude ratten veroorzaakt wordt door resistentie van de AChR op zich, tegen antilichaam gemedieerde destructie. Met histologisch onderzoek zijn verschillen aangetoond in de eiwitsamenstelling van de postsynaptische membraan. Veranderingen in deze samenstelling kunnen mogelijk de verankering van de AChR of de rigiditeit van de membraan veranderen waardoor deze resistent wordt tegen internalisatie en degradatie.

Samengevat tonen de resultaten van deze studie aan dat resistentie tegen het opwekken van EAMG wordt bepaald door resistentie van de AChR in de postsynaptische membraan tegen antilichaam gemedieerde destructie. Daarnaast wordt het verschil in gevoeligheid voor het opwekken van EAMG tussen jonge en oude ratten beïnvloedt door verschillen in anti-AChR antilichaam titers. Hieruit blijkt dat de neuromusculaire dysfunctie in MG en EAMG een resultante is van de combinatie van factoren die wordt bepaald door zowel het immuunsysteem als ook door gevoeligheid van het doelwitorgaan.