



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Gangliosides and anti-ganglioside antibodies in neuromuscular synaptic function

Zitman, F.M.P.

Citation

Zitman, F. M. P. (2010, January 20). *Gangliosides and anti-ganglioside antibodies in neuromuscular synaptic function*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/14568>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/14568>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Nederlandse samenvatting

**De rol van gangliosiden en anti-ganglioside
antistoffen in de werking van de
neuromusculaire synaps**

Het syndroom van Guillain-Barré (GBS) is een acute, postinfectieuze neuropathie met een monofasisch verloop. De ziekte kent verscheidene klinische vormen, maar algemeen zijn de symptomen van symmetrische spierzwakte en afwezigheid van reflexen. Een van de mildere klinische varianten van GBS is het Miller Fisher syndroom, welk gekenmerkt wordt door ataxie, areflexie en verlamming of verzwakking van de externe oogspieren. In meer dan de helft van de GBS patiënten kan in het serum de aanwezigheid worden aangetoond van antistoffen tegen gangliosiden. Gangliosiden behoren tot de glycosphingolipiden en bevatten één of meer siaalzuren. Ze vormen een onderdeel van de buitenste laag van de celmembranen en komen voor in elk celtype. Echter, in de membranen van zenuwcellen en dan in het bijzonder in het presynaptische membraan aan het uiteinde van axonale zenuwceluitlopers zijn gangliosiden in verhoogde mate aanwezig. De grote familie van gangliosiden kent een specifieke stapsgewijze synthese, waarbij ceramide de basisstructuur vormt en door toevoeging van suikergroepen en siaalzuren de verschillende familieleden opgebouwd worden. Gangliosiden spelen een rol in cel-cel herkenning en communicatie. Bovendien beïnvloeden ze allerlei processen in het gehele lichaam, waaronder apoptose en spermatogenese. Mede omdat gangliosiden zo geconcentreerd zijn in het presynaptische membraan, wordt verondersteld dat zij betrokken zijn in synaptische transmissie en dan in het bijzonder in het proces van neurotransmitter afgifte. In dit proefschrift is met behulp van onder andere elektrofysiologie de fysiologische rol die deze gangliosiden spelen in neurotransmitter afgifte onderzocht in neuromusculaire synapsen van muizen. Daarnaast zijn in deze synapsen ook de pathofysiologische effecten bestudeerd van antistoffen tegen deze gangliosiden zoals die worden gevonden in serum van GBS patiënten.

In het eerste deel van dit proefschrift is gekeken naar de functie van gangliosiden in het proces van neurotransmitter afgifte in de neuromusculaire synaps van de muis. In hoofdstuk 2.1 zijn synapsen van twee verschillende ganglioside knock-out muizen met behulp van elektrofysiologische technieken onderzocht. Bij deze muizen ontbreekt een deel van de synthases die nodig zijn om de familie van gangliosiden op te bouwen en hierdoor is een subset van die familie afwezig. Bovendien zijn de gangliosiden die wel geproduceerd kunnen worden als gevolg van accumulatie of “opregulatie” in hogere concentratie aanwezig. De geteste muizen misten hetzij de b- en c-series van de gangliosiden, hetzij de b- en c-series *en* alle complexe gangliosiden waardoor ze alleen ganglioside GM3 in hun celmembranen hadden (zie Figuur 1.3). We vonden dat neuromusculaire synapsen van deze ganglioside mutanten alleen subtiele verschillen vertonen in de afgifte van neurotransmitter in vergelijking met wildtype controles, zoals een subklinisch lager *steady-state* niveau bij hoogfrequente zenuwstimulatie (dit is de plateaufase in transmitter afgifte die optreedt na een initiële inzakking). Dit suggereert dat gangliosiden wel degelijk een modulerende invloed hebben, maar dat er geen cruciale, onmisbare rol is die om de aanwezigheid van de complete familie van gangliosiden vraagt. Zelfs wanneer alleen het eenvoudige ganglioside GM3 nog aanwezig was, vertoonde de neurotransmitter afgifte slechts een geringe reductie ten opzichte van het wildtype en was de synaps nog steeds succesvol in het overbrengen van impulsen van zenuw- naar spiercel. Omdat deze experimenten uitgevoerd werden in relatief jonge muizen (jonger dan drie maanden) en gangliosiden mogelijk niet zozeer een rol spelen in de vroege (embryonale en postnatale) levensfase, maar wellicht belangrijker zijn voor onderhoud later in het leven, hebben we in hoofdstuk 2.2 synapsen van transgene muizen ouder dan negen maanden nader bekeken. We hebben onderzocht hoe de neuromusculaire synaps van ganglioside

knock-out muizen functioneert op oudere leeftijd, wanneer herstel, onderhoud en regeneratie van belang zijn. Ook bij deze oude muizen was de afwezigheid van subsets van de familie (alle complexe gangliosiden of de b- en c-series gangliosiden) geen belemmering voor het functioneren van de synaps: opnieuw waren er alleen subtiele veranderingen meetbaar die geen gevolgen hadden voor de impulsoverdracht. Dit impliceert dat ofwel gangliosiden geen cruciale rol hebben in het proces van transmitter afgifte, ofwel dat de verschillende gangliosiden elkaars functie kunnen compenseren en dat het overblijven van bijvoorbeeld alleen ganglioside GM3 daarom voldoende is om de synaps werkend te houden. Om dit verder te onderzoeken hebben we, zoals beschreven in hoofdstuk 2.3, dit laatste ganglioside in een *in vitro* experiment “verwijderd” uit het weefsel van een transgene muis die alleen ganglioside GM3 tot expressie kon brengen. Met behulp van het enzym neuraminidase werd van dit laatste ganglioside het siaalzuur afgeknipt, waarmee het onderscheidende kenmerk van de ganglioside-familie verdwenen was. Hierbij vonden we wel enkele grotere veranderingen in de afgifte van neurotransmitter, zoals een *steady-state* niveau bij hoogfrequente zenuwstimulatie dat 20% lager lag dan in een wildtype synaps, waardoor de “compensatie theorie” enigszins lijkt te worden ondersteund. Maar nog steeds was dit effect onvoldoende om de impulstransmissie in de neuromusculaire synaps te blokkeren. Dit onderstreept nog eens dat gangliosiden geen essentiële en fundamentele rol spelen in de afgifte van neurotransmitter, zelfs niet op oudere leeftijd, maar dat ze wel enige modulerende invloed hebben.

Het tweede deel van dit proefschrift focust op de neuropathofysiologische effecten van antistoffen tegen gangliosiden en de therapeutische werking van complementremmers hierop. Hoofdstuk 3.1 beschrijft het veronderstelde werkingsmechanisme van de antistoffen die na binding aan de gangliosiden in het celmembraan in staat zijn om complement te activeren. Deze reactie leidt tot beschadiging van het presynaptische motor-zenuwuiteinde en heeft tot gevolg dat Ca^{2+} -ionen vrij het uiteinde van de zenuw in kunnen diffunderen. Omdat Ca^{2+} -ionen de afgifte van neurotransmitter stimuleren, is het resultaat een ongecontroleerde, massale afgifte van neurotransmitter wat uiteindelijk leidt tot uitputting van de zenuw en verlamming van de spier door blokkade van neuromusculaire transmissie. Omdat dit neuropathofysiologische proces complement afhankelijk is, lijkt het blokkeren van het complementsysteem een doeltreffende manier om in te grijpen en het schadelijke effect tot stilstand te brengen. In de hoofdstukken 3.2 en 3.3 zijn twee remmers van het complement systeem getest op hun effectiviteit om het presynaptische membraan te beschermen tegen de beschadigende effecten van de anti-ganglioside antistoffen. De eerste remmer is een gehumaniseerd muizenmonoklonaal antilichaam, eculizumab, en de tweede is een recombinant eiwit gebaseerd op een eiwit dat is geïsoleerd uit het speeksel van de zachte teek *Ornithodoros moubata*. Beide blokkers remmen de splitsing van complement component C5 in C5a en C5b. C5b is de eerste component van het *membrane attack complex* (MAC), dat samen met C6-C9 wordt gevormd. MAC is een moleculair complex dat gaten maakt in het celmembraan met lysis van de cel tot gevolg. Dit is een cruciale stap in het beschadigende effect dat optreedt als gevolg van de binding van antistoffen aan de gangliosiden. Door de formatie van MAC te voorkomen waren beide complement remmers in staat om de neuropathologische effecten van de antistoffen te remmen in zowel een *in vitro* als een *in vivo* muismodel voor het Miller Fisher syndroom. Deze stoffen zijn daarom interessante kandidaten om in neuropathie patiënten te testen. Naast effecten als gevolg van de activatie van complement door de anti-ganglioside antistoffen hebben

we ook gekeken naar de verschillende typen antistoffen die deze immunreactie op gang kunnen brengen (hoofdstuk 3.4). Enkele jaren geleden is ontdekt dat er niet alleen antistoffen bestaan die binden aan epitopen op de individuele gangliosiden, maar ook antistoffen die binden aan combinaties van twee verschillende gangliosiden, die kennelijk samen één, geheel nieuwe bindingsplaats vormen voor antistoffen (een ganglioside complex). In een oriënterende studie hebben wij een aantal serummonsters met anti-complex antilichamen getest op hun potentie om neuropathofysiologische effecten te veroorzaken in de neuromusculaire synaps van de muis, zoals eerder aangetoond met sera met antistoffen tegen individuele gangliosiden. Ongeveer de helft van de 27 onderzochte monsters had een beschadigend effect, blijkend uit elektrofysiologische experimenten. Echter, de mate waarin de monsters effecten sorteerden was zeer gevarieerd en bovendien werd de interpretatie bemoeilijkt door het feit dat veel sera ook in meer of mindere mate additionele antistoffen bevatten tegen individuele gangliosiden. De ontwikkeling van monoclonale antistoffen met monospecificiteit tegen ganglioside complexen zal verder onderzoek naar de exacte rol van anti-ganglioside complex antistoffen faciliteren.

Tenslotte is in hoofdstuk 3.5 nader gekeken naar de condities waaronder anti-ganglioside GM1 antistoffen in staat zijn om aan ganglioside GM1 te binden. Het is al eerder gebleken dat het niet alleen belangrijk is dat de gangliosiden aanwezig zijn in het membraan, maar ook in welke confirmatie ze aanwezig zijn en welke interacties ze aangegaan zijn met naburige moleculen. Deze studie laat zien dat een ganglioside in staat is om de bindingsplaats voor antistoffen bij een naburig GM1 ganglioside te maskeren. Het is afhankelijk van de structuur van de antistof of deze vervolgens nog kan binden of niet. Als gevolg van deze interactie tussen naburige gangliosiden kan de activiteit van verschillende antistoffen gericht tegen eenzelfde ganglioside drastisch variëren. Tevens werden in deze studie voor het eerst neuropathofysiologische effecten van (patiënten- en muizen-) anti-GM1 antistoffen op de neuromusculaire synaps aangetoond.

Concluderend laten de studies in dit proefschrift zien dat gangliosiden niet essentieel lijken te zijn voor het functioneren van de neuromusculaire synaps met betrekking tot transmitter afgifte, maar wel een modulerende rol hebben. Daarnaast blijkt het blokkeren van het complement systeem met behulp van C5-remmers een effectieve methode om zenuwmembranen te beschermen tegen de beschadigende effecten van complement activatie na binding van anti-ganglioside antistoffen. In het laatste hoofdstuk worden deze en andere experimentele bevindingen in dit proefschrift bediscussieerd in het licht van de bestaande literatuur en de pathogenese en therapeutische aspecten van GBS.