

Therapeutisch vaccin voor acute en chronische motor neuron ziektes: Gevolgen voor amyotrofe laterale sclerose

D. N. Angelov,^{*†} S. Waibel,^{†‡} O. Guntinas-Lichius,^{†§} M. Lenzen,^{*} W. F. Neiss,^{*} T. L. Tomov,^{*} E. Yoles,[¶] J. Kipnis,[¶] H. Schori,[¶] A. Reuter,[‡] A. Ludolph,^{‡¶} and M. Schwartz^{¶||**}

^{*}Department of Oto-Rhino-Laryngology, University of Cologne, D50924 Cologne, Germany;

[‡]Department of Neurology, University of Ulm, D89075 Ulm, Germany; [§]Anatomical Institute, University of Cologne, D50931 Cologne, Germany; and [¶]The Weizmann Institute of Science, Rehovot 76100, Israel

[†]D.N.A., S.W., and O.G.-L. are joint first authors.

^{||}A.L. and M.S. contributed equally to this work.

^{**}To whom correspondence should be addressed. E-mail: michal.schwartz@weizmann.ac.il.

Communicated by Michael Sela, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel

Received October 27, 2002; Accepted January 9, 2003.

▶ This article has been corrected. See [Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 November 2; 101\(44\): 15823.](#)

▶ This article has been [cited by](#) other articles in PMC.

Therapeutische vaccinatie met Copaxone (glatiramer acetate, Cop-1) beschermt motor neuronen tegen acute en chronische degeneratieve ziekten. Bij acute degeneratie na axotomy van gelaatszenuwen, was het aantal overlevende motorneuronen bijna twee maal hoger bij muizen ingeënt met Cop-1 dan bij niet ingeente muizen, of bij muizen ingeënt met PBS geëmulgeerd in volledig Freund's adjuvant ($P < 0.05$). Bij muizen die het mutant gen Cu/Zn superoxide dismutase G93A (SOD1) hebben, en daarom de chronische menselijke motor neuron ziekte amyotrofe laterale sclerose simuleert, verlengde vaccinatie met Cop-1 de levensverwachting vergeleken met onbehandelde bijgepaste controles van 211 ± 7 dagen ($n=14$) tot 263 ± 8 dagen ($n=14$; $P < 0.0001$). Onze studies tonen aan dat vaccinatie de motor activiteit aanzienlijk verbetert. In overeenstemming met het experimenteel gebaseerde concept van beschermende auto-immuniteit, doen deze bevindingen denken dat Cop-1 vaccinatie het lokale immuun antwoord stimuleert dat destructieve zelsamenstellingen bestrijdt, die in verband gebracht worden met de dood van motor neuronen. Zijn verschillende acties bij CNS auto-immune ziektes en neuro degeneratieve ziektes, afhankelijk van het gebruikte regime, laat het gebruik toe als therapie voor beide condities. Dagelijkse toediening van Cop-1 is een goedgekeurde behandeling bij multiple sclerose. Het protocol voor niet-autoimmune neuro degeneratieve ziektes zoals bij ALS, moet nog bepaald worden voor verdere studies.

ALS is een progressieve ziekte van de boven en onder motorneuronen, die in de meeste gevallen de dood veroorzaakt door falen van de ademhaling. Zijn oorzakenleer, prognose en voortschrijden werden intensief bestudeerd de laatste 10 jaar. Twee oorzakelijke factoren werden tot hier toe geïdentificeerd: mutaties in het Cu/Zn superoxide dismutase (SOD) gen op chromosoom 21 (1) en vermeend coderen van ras GTPase (2, 3) in het alsin gen. Deze mutaties echter geven een verklaring voor minder dan 10% van de patiënten met ALS. Vele factoren die bijdragen tot de pathogenese van ALS zijn gemeenschappelijk aan andere degeneratieve ziektes van het centrale zenuwstelsel, zoals oxidatieve stress, excitotoxiciteit, verlies van trofische

ondersteuning en ionisch onevenwicht (4). De pathogenese van chronische selectieve dood van voorste hoorn cellen, kan bestudeerd worden in transgene muizen met het menselijk mutant Cu/Zn SOD G93A (SOD1) gen (5, 6).

Er waren verschillende klinische en experimentele pogingen om de voortgang van ALS te stoppen door verschillende bemiddelaars van cytotoxiciteit te blokkeren (7). Omdat niet alle ALS patiënten beschadigde genen hebben, zijn de resultaten van dergelijke pogingen dikwijls geverifieerd door het bestuderen van de dood van motor neuronen (gemeenschappelijk aan alle gevallen van ALS) in een dierlijk model van acute perifere zenuw axotomy (8, 9). Het enige geneesmiddel dat momenteel gebruikt wordt om de progressie van ALS te vertragen, hoewel slechts met bescheiden resultaat, is riluzole, een vermeende blokker van vrijmaken van glutamaat (10, 11).

Bij het immuun systeem, dat het organisme beschermt tegen de effecten van het binnendringen van pathogenische micro-organismen, werd recent gevonden dat het zich ook beschermt tegen vernietigende zelf-componenten (12–16). Bij acute neuro degeneratieve kwalen veroorzaakt door mechanische (bv. verwonding door verplettering of axotomy) (12, 14) of biochemische oorzaak (vb. glutamaat of oxidatieve stress) (15), overleven meer neuronen bij de aanwezigheid van een opgewekt anti-zelf T-cellen antwoord dan in zijn afwezigheid, mits dat het opgewekte antwoord goed geordend is (13, 16–19). Het beschermende T celgeleide antwoord kan versterkt worden zonder het risico van auto-immune ziekte inductie, door toediening van copolymer-1 (Cop-1; Copaxone), een synthetische polypeptide bestaande uit het amino zuur tyrosine, alanine, en lysine (15, 20). Recentelijk werd gesuggereerd dat deze samenstelling een brede waaier van zelf-actieve T-cellen kan activeren (20, 21). In een model van een chronische neuro degeneratieve ziekte in verband met optische zenuw neuropathie, zoals glaucoma, werd vastgesteld dat Cop-1 vaccinatie het weefsel specifieke barrière omzeilt door antigenen die in het beschadigde weefsel zijn (15, 22) en dat ze aanmerkelijk de overleving van neuronen verhogen. (15, 20).

Cop-1 is een geneesmiddel dat goedgekeurd is door de 'Food en Drug Administration' voor multiple sclerose (MS). In deze studie werden muizen met Cop-1 behandeld (volgens een verschillend regime dan dat gebruikt werd voor MS) en werd aangetoond dat motor neuronen beschermd kunnen worden tegen zowel acute als chronische aftakeling.

Acute Motor neuron ziekte. Volwassen vrouwelijke muizen (12 weken oud, 20-25 g) van het C57BL/6JO1aHsd ras (Harlan Winkelmann, Borchon, Duitsland) werden blootgesteld aan eenzijdige gezichts-zenuw axotomy. Muizen in de experimentele groep ontvingen een totaal van 100 µg van Cop-1 in volledige adjuvant van Freund (CFA). Controle dieren werden axotomiseerd en waren onbehandeld of ingespoten met PBS geëmulsiëerd in CFA. Zeven dagen later werd een gelaats-gelaats anastomose gecreëerd in verdoofde muizen (100 Mg Ketaset plus 5 mg Rompun per kg lichaamsgewicht) door microchirurgische herbevestiging van de proximale stomp met de distale stomp met twee 11-0 epineurale hechtingen (Ethicon EH 7438G, Norderstedt, Duitsland). De wonde werd gedicht met drie 4-0 huid hechtingen. Voor de beoordeling van het herstel werden de gezichtsmotor neuronen die de whiskerpad spieren bevoorraden, retrograad gemarkeerd door injecties met 30 µl van 1 % waterige oplossing van de fluorescerende retrograde tracer FluoroGold plus 2 % dimethyl sulfoxide (DMSO) geïnjecteerd in de spieren van elk whisker pad. Zeven dagen later werden de muizen terug verdoofd en transcardiaal geperfuseerd met 0.9% NaCl gevolgd door fixatie met 4% paraformaldehyde in 0.1 M fosfaat

buffer, pH 7.4, gedurende 20 min. De hersenen werden verwijderd en 50- μm -dikke coronale secties werden gesneden door de hersenstam met een vibratoom. De secties werden bekeken met een Zeiss Axioskoop 50 epifluoriserende microscoop door een op hand gemaakte HQ-smalband-filter set voor FluoroGold (AHF Analysentechnik, Tübingen, Duitsland)

Kwantitatieve analyse. Voor beeld analyse werd een geladen gekoppelde video camera systeem (Optronics Engineering Model DEI-470, Goleta, CA) gebruikt gecombineerd met de beeldanalyse software Optimas 6.5 (Optimas, Bothell, WA) om manueel de retrograad gemerkte gezichtsmotor neuronen te tellen op het computer scherm (23). Gebruik makend van het fraktionele principe (24), werden alle retrograad gemerkte gezichtsmotor neuronen geteld met zichtbare cel nucleï in elke tweede sectie van de 50 μm dikke sectie door de gezichts-nucleus op zowel de geopereerde als de niet geopereerde kant. Een telling werd gedaan door twee observeerders die niet wisten van de behandeling van de ratten.

Electrofysiologische beoordeling. De twee lange haren van de C-rij op elke kant van het gezicht werden gebruikt voor biometrische analyse. Met de muizen onder lichte narcose met ether werden alle andere vibrissae afgeknipt met kleine fijne scharen. Een digitale camcorder (Panasonic NV DX-110 EG) werd gebruikt om de actief onderzoekende muizen op te nemen gedurende 3-5 minuten. Na calibratie werden de video beelden van het whisking gedrag gesampeld op 50 Hz (50 velden per sec), met de video camera sluiten geopend gedurende 4 msec. Beelden werden opgenomen op AY-DVM 60 EK mini cassettes. De video beelden werden traag herbekeken en 1.5 sec sequentie fragmenten van elke muis werden geselecteerd voor de whisking biometrie. De gebruikte selectie criteria waren de stabiele positie van de kop, de frequentie van whisking en de graad van vibrissale protractie. De geselecteerde sequenties werden opgevangen door een 2D/manueel Advanced Video System PEAK Motus 2000 (PEAK Performance Technologies, Englewood, CO). Het spatiale model bestond uit drie referentiepunten (top van de neus en de binnenste hoeken van de twee ogen). Elk vibrissa is vertegenwoordigd in het spatiale model door twee punten: zijn basis en een punt op de schacht 0.5 cm van de basis.

Glutamaat injecties. Het rechter oog van de verdoofde muis werd gepuncteerd met behulp van een binoculair microscoop in het bovenste gedeelte van het oogwit met een 27-pijlnaald, en een 10- μl Hamilton spuit met een 30-pijlnaald werd ingebracht tot het vitreal lichaam. Muizen werden geïnjecteerd met L-glutamate (200 nmoles) (Sigma) opgelost in saline (totaal volume 1 μl).

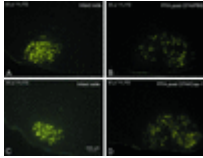
Merken van de retinale gangliale cellen. Muizen werden verdoofd zoals hierboven werd beschreven en geplaatst in een stereotactisch toestel. De schedel werd blootgelegd en het bregma werd geïdentificeerd en gemerkt. De plaats die geselecteerd werd voor de injectie was in de bovenste colliculus, 2.92 mm achter het bregma, 0.5 mm zijwaarts van de middellijn en op een diepte van 2 mm van de hersenoppervlakte. Een opening werd geboord in de schedelhuid boven de bepaalde coördinaten in de rechter en de linker hemisfeer. De neurotracer dye FluoroGold (5% oplossing in saline, Fluorochrome, Denver) werd stereotactisch toegepast (1 μl , per 0.5 $\mu\text{l}/\text{min}$ in elke hemisfeer) gebruik makend van een Hamilton spuit en de huid over de wonde werd gehecht.

Beoordeling van retinale gangliale cel (RGC) overleving. Op het einde van de experimentele

periode, werden de muizen gedood met een injectie van een dodelijke dosis pentobarbitone (170 mg/kg). Hun ogen werden verwijderd en de retinas werden losgemaakt en voorbereid als geplet in 4% paraformaldehyde in PBS. Gemarkeerde cellen van 4 tot 6 velden van identieke grootte (0.076 mm²) werden geteld. De getelde velden werden bepaald op ongeveer dezelfde afstand van de optische schijf (0.3 mm) om variaties toe te laten in RGC dichtheid als een functie van afstand van de optische schijf. Velden werden geteld onder de fluorescens microscoop (vergroting x 800) door observeerders geblindeerd ivm de behandeling die de muizen kregen. Het gemiddeld aantal RGC's per veld werd berekend voor elke retina. Het aantal RGC's in het contralaterale (niet gewonde) oog werden ook geteld en dienden als interne controle.

ALS model. Transgene muizen [B6SJL-TgN (SOD1-G93A) 1Gur, geleverd door The Jackson Laboratory], leeftijd 60 dagen, werden gevaccineerd met Cop-1 (75 µg) geëmulgeerd in compleet Freund's adjuvant (CFA; Difco) die 5mg/ml *Mycobacterium tuberculosis* bevat. De emulsie (totaal volume 200 µl) werd geïnjecteerd in het achterste voetkussen, en werden de muizen vervolgens dagelijks behandeld met oraal Cop-1 (12.5 mg/kg/dag) gegeven in het drinkwater. Hun motor activiteit en sterftcijfer werd gemonitord. Het transgen bij deze muizen draagt een mutant menselijk SOD1 allele dat het Gly-93 --> Ala (G93A) gen bevat. Verlamming wordt veroorzaakt door progressief verlies van de motorneuronen van het ruggenmerg. Controle muizen bleven ofwel onbehandeld of kregen dagelijks 30 mg/kg riluzole. Een tweede groep transgene muizen, die meer copies van de beschadigde SOD1 mutanten uitdrukten, werden behandeld met een injectie met Cop-1 vermengd met Alum-Phos. Dit was toegediend ofwel in 2 injecties om de week of als 3 injecties. De eerste werd gegeven wanneer de muizen ong. 60-70 dagen oud waren, de tweede werd een week later gegeven en de derde een maand later. Controle groepen kregen enkel ofwel 1 injectie of 2 injecties met Alum-Phos. De muizen mochten grijpen en een verticale draad vasthouden (2 mm diameter) met een smalle lus aan het einde. Hun activiteit werd individueel opgenomen door een computer systeem en dagelijks beoordeeld. Voor de statistische beoordeling werd de ronddraaiende beweging genormaliseerd tot de gemiddelde activiteit van elke muis van dag 40 tot dag 60.

Cop-1 vaccinatie beschermt tegen afsterven van motor neuronen teweeggebracht door acute gezichtsenuw axotomy. Dwarssnede van de gezichtsenuw bij volwassen muizen is bekend een gemakkelijk zichtbare degeneratie te veroorzaken van 20-35% van de axotomizeerde motor neuronen (25). Muizen werden geïmmuniseerd met Cop-1 (n=10) of geïnjecteerd met PBS (n=9), beide geëmulgiseerd in CFA, en werden 7 dagen later onderworpen aan gezichtsenuw axotomy. Muizen van een derde groep (n=8) werden geaxotomiseerd zonder vorige immunizatie, en muizen van een vierde groep (n=7) werden ongemoeid gelaten. Acht weken na de axotomy, zoals getoond in fig. 1 en tabel 1, was het belangrijkste aantal van de FluorGold-gemerkte motor neuronen veelzeggend groter bij muizen gevaccineerd met Cop-1 dan het aantal verkregen in de groep geïnjecteerd met PBS in CFA of in de onbehandelde controle groep (P<0.05). Immunizatie met PBS in CFA had geen beschermend effect. Behandeling met COP-1 had geen effect op het aantal motor neuronen in de niet verwonde gezichtsnuclus.



Figuur 1

Redding van motor neuronen door Cop-1 toegediend na gezichts-zenuw axotomy. Terugwerkende neuronale merking na injectie met FluoroGold in het whiskerpad toonde geen verschil in de lokalisatie of aantal motor neuronen in de intacte gezichtsnucleus ([meer ...](#))

Tabel 1

Effect van Cop-1 vaccinatie op overleving van motor neuronen

Toediening van Cop-1 beschermt motor neuron activiteit na acute axotomy. Om te bepalen of een groter aantal motor neuronen gevonden in de Cop-1 behandelde axotomiseerde muizen dan in de controles geassocieerd werd met functionele verbetering, analyseerden we het whisking gedrag biometrisch. Basis parameters voor whisking gedrag werd gedocumenteerd in intacte controle muizen. Onder normale psychologische condities, zijn de mystaciale vibrissae opgericht met oriëntatie naar voor. Hun gelijktijdige zwaaien, gekend als 'whisking' of 'snuffelen' ([26](#), [27](#)), gebeurde 5-11 keer per seconde ([28](#), [29](#)). De sleutel bewegingen van deze motor neuron activiteit zijn de verlenging en het intrekken van de vibrissale haren door de piloerectische spieren, die bezenuwd worden door de buccale tak van de gezichts-zenuw ([30](#)). Wanneer de gezichts-zenuw dwars doorgesneden wordt, verwerven de de vibrissae een staart oriëntatie en blijven bewegingsloos. We gebruikten dit model (Fig. 4, dat gepubliceerd is als ondersteunende informatie op de PNAS website, www.pnas.org) om de volgende parameters te evalueren: (i) verlenging (voorwaartse beweging van de vibrissae), gemeten door de rostrally geopende hoek tussen de mid-sagittale vlakke en de haarschacht (grote verlengingen worden gepresenteerd door kleine hoek waarden); (ii) frequentie van whisking, vertegenwoordigd voor cycli van verlenging en het intrekken (Passieve achterwaartse beweging) per seconde; (iii) amplitude (het verschil in graden, tussen maximale verlenging en maximale intrekking; (iv) angulaire versnelling gedurende verlenging (in graden per seconde); en (v) angulaire versnelling gedurende intrekking (in graden per seconde per seconde).

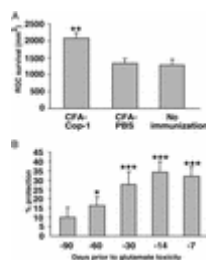
Muizen onderworpen aan gezichts-zenuw axotomy en Cop-1 toediening vertoonden een significant beter 'whisking' gedrag dan de andere groepen muizen, zoals aangetoond door de amplitude, de angulaire snelheid tijdens verlenging, en de angulaire versnelling gedurende terugtrekking (Tabel [2](#)).

Tabel 2

Effect van Cop-1 vaccinatie op herstel van whisking gedrag na gezichts-zenuw axotomy.

De resultaten hierboven voorgesteld suggereren dat motor neuronen in een muis model van een acute degeneratieve ziekte, voordeel kan hebben van bescherming door Cop-1 injectie. Cop-1 behandeling verhoogt de levensverwachting van ALS muizen. Muizen met een teveel aan het defecte menselijke SOD1 gen, ontwikkelen een motor ziekte die goed lijkt op de menselijke ziekte ALS. De motor neuron disfunctie veroorzaakt uiteindelijk hun dood. Om de mogelijke efficiëntie te beoordelen van Cop-1 vaccinatie bij een model van een chronische degeneratieve ziekte, bepaalden we eerst of het effect van een enkele immunizatie met Cop-1 emulsifieerd in CFA lang-levend is. De gekozen dosis was 75 µg, omdat dit optimaal effectief bevonden werd in

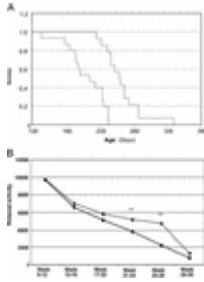
een waaier Cop-1 doseringen tussen 25 en 225 µg, (H.S., Hila Avidan, en M.S., ongepubliceerde gegevens). We gebruikten een muis model van glutamaat giftigheid om eerst de lengte van tijd te meten dat een enkele vaccinatie met Cop-1 emulsifiëerd in CFA beschermt tegen glutamaat giftigheid. Muizen werden onderworpen aan plaatselijke giftigheid van glutamaat, dat intravitaal geïnjecteerd werd op verschillende tijdsintervallen na de vaccinatie. Een week na de glutamaat injectie werd het aantal overlevende neuronen geteld. Fig. 2A toont dat een enkele injectie met Cop-1 geëmulsiëerd in CFA aanmerkelijk meer effectief was bij het beschermen tegen glutamaat giftigheid dan de injectie van PBS geëmulsiëerd in CFA. Aanmerkelijke bescherming tegen glutamaat giftigheid werd geobserveerd bij muizen die giftige hoeveelheden glutamaat ontvingen tot 60 dagen (maar niet meer) na de vaccinatie (Fig. 2B). Het zwakke effect van de adjuvant op zichzelf (Figs. 1 en 2A), gekoppeld met de aanhoudende aard van na-vaccinatie immuun-afhankelijke bescherming, zette ons aan om de doeltreffendheid van van Cop-1 immunisatie voor chronische ALS te onderzoeken.



Figuur 2

Cop-1 vaccinatie beschermt RGCs tegen glutamaat giftigheid. (A) C57BL/6J luizen (n=6) werden geïmmuniseerd met Cop-1 geëmulsiëerd in CFA. Tien dagen later werden de muizen onderworpen aan unilaterale intraoculaire injectie van giftige hoeveelheden glutamaat (200 nmol). (meer ...)

Muizen geïmmuniseerd met Cop-1 op een leeftijd van 60 dagen en onbehandelde controle muizen van de zelfde leeftijd werden dagelijks geobserveerd en wekelijks gewogen. De muizen kregen een enkele immunisatie van Cop-1 geëmulsiëerd in CFA, gevolgd door een orale immunisatie met Cop-1 gegeven in het drinkwater. De leeftijd bij symptoom aanvang was bepaald als de leeftijd (in dagen) op het tijdstip van eerste verschijning van beving of schudding van de ledematen, of hangen (eerder dan uitslaan) van de achterste ledematen wanneer de muis in de lucht gehouden werd aan de staart. Verlies van het righting reflex werd genomen om het eindstadium van de ziekte aan te duiden. In de afwezigheid van behandeling stierven de muizen in onze studie (n = 14) op een leeftijd van 211 ± 7 dagen (bedoeld \pm SD). Muizen geïmmuniseerd met Cop-1 (n=15) leefden 263 ± 8 dagen. Bijgevolg verhoogde vaccinatie met Cop-1 dramatisch de levensverwachting van ALS muizen (Fig. 3A). Als positieve controle werd aan 15 muizen een dagelijkse dosis (30 mg/kg) riluzole gegeven, het enige geneesmiddel dat momenteel aan ALS patiënten gegeven wordt. Deze muizen overleefden 230 ± 7 dagen. Bovendien, bij de verhoging van bijna 25% levensverwachting was het begin van de ziekte vertraagd (getoond door motor prestatie). (Fig. 3B), aantonend dat het voordeel ook uitgedrukt werd in levenskwaliteit, beide bij preklinische en klinische stadia (Fig. 3B). Normale waarden voor elke muis werden verkregen door beoordeling van nachtelijke motor activiteit (van 8 tot 20 uur) tussen de leeftijd van 40 en 60 dagen, door gebruik van het rotarod apparaat (Laser- and Medizin-Technologie, Berlin). Met het doel om deze bevindingen te vertalen naar een toekomstige behandeling voor ALS patiënten testten we G93A transgene muizen die een groot aantal copies van de menselijke mutant vorm van SOD1 hadden, gebruik makend van Cop-1 geëmulsiëerd in CFA of in Alum-Phos (gezien CFA niet bruikbaar is bij menselijke therapieën) of Cop-1 zonder adjuvant. Het optimale protocol werd nog niet gevonden. De verhoging in levensverwachting overschreed niet de 10% in het 'high-copy' model (gegevens niet getoond). Verdere studies zijn nodig om een optimale dosis vast te leggen en een regime nodig voor dit doel.



Figuur 3

Levensverwachting bij ALS muizen geïmmuniseerd met Cop-1. (A) Ongevaccineerde controles ($n=15$) werden verlamd in 1 of meer ledematen en stierven op leeftijd 211 ± 7 dagen (d.i. \pm SEM). Cop-1-behandelde muizen overleefden 263 ± 8 dagen. Overleving ([meer ...](#))

In een protocol verschillend dan gebruikt bij MS Patiënten, tonen de resultaten dat vaccinatie met Cop-1 de motor neuronen beschermt tegen acute of chronische aftakeling in een muis model.

Recentelijk werd gesuggereerd dat CNS insult ageert als een noodsignaal aan het immuunsysteem ([13–16](#)). Eigen aan normale knaagdieren, verliezen ze significant meer neuronen na CNS insult wanneer volwassen T cellen weggenomen worden ([13, 15](#)).

Experimenteel bewijs suggereert dat onder stress het CNS signaal aan het immuunsysteem een aangepast immuun antwoord oproept dat gestuurd wordt tegen overvloedige antigenen die zich op de plaats van het letsel bevinden ([15, 16, 31, 32](#)). Enkelingen verschillen in hun vermogen om spontaan een immuun antwoord op te roepen ([13](#)). Niettemin kunnen alle individuen genieten van het versterken van het antwoord, mits de tussenkomst op het juiste moment gebeurt en het juiste antigen gebruikt wordt in optimale formulering zodat het anti-zelf antwoord versterkt wordt, en toch het risico op een autoimmuun ziekte niet verhoogt ([12, 17, 33](#)). We toonden verder aan dat dezelfde T cellen (T helper 1) blijkbaar verantwoordelijk konden zijn voor zowel auto immuun ziekte als voor de bescherming tegen de nadelige effecten van de destructieve zelf-samenstellingen. Zodus werd aangetoond dat T helper 1 cellen gericht tegen immunodominante proteïnen, bekwaam zijn een auto-immuun ziekte op te wekken, evenals neurobescherming ([34](#)). Ziekte vrije bescherming werd verkregen door een immuun antwoord op te wekken tegen cryptische epitopen die in dezelfde potentiële pathogene immuun-rijke proteïnen zitten, of door een gewijzigd pathogeen peptide te gebruiken om de mogelijke pathogeniciteit van het peptide te elimineren ([17, 32](#)).

Studies bedoeld om het mechanisme achter deze bescherming te ontdekken hebben getoond dat T cellen die tegen de zelf-antigenen gericht worden, migreren naar de plaats van het letsel waar ze geactiveerd worden. Eens geactiveerd kunnen ze dienen als een bron van cytokines en neurotrophines. Terwijl lokale neurale cellen de plaats van het letsel vrijmaken van cel overblijfselen en andere schadelijke stoffen ([35, 36](#)), kunnen de T cellen bijkomend het lokale aangeboren antwoord reguleren bij welke residente cellen ofwel antigen-tonende cellen of fagocyt die cellen bufferen, kunnen worden. (I. Shaked, O. Butovsky, T. Mizrahi, R. Gersner, X. Xiao, P. Soteropoulos, P. Tolia, R. P. Hart, en M.S., ongepubliceerde gegevens; en ref. [37](#)).

In een poging om een methode te ontwikkelen om dit T-cel afhankelijk antwoord te versterken terwijl afsluit weefsel specificiteit en genetische gevoeligheid omzeild werd, testten we het copolymeer Cop-1, een goedgekeurd geneesmiddel voor MS. Voor Cop-1 vaccinatie werd aangetoond dat ze CNS neuronen beschermt tegen sterfte teweeg gebracht door een letsel aan de optische zenuw of door glutamaat giftigheid in rat en muis modellen ([15, 38](#)). In deze experimenten, evenals bij andere waar vaccinatie gebruikt werd om neurobescherming op te wekken, gebruikten we dieren geïmmuniseerd met PBS in CFA als controle. De bescherming teweeggebracht door CFA was zelden significant relatief aan onbehandelde controles, en was altijd significant minder dan de optimale bescherming verkregen door immunisatie met

specifieke antigenen. Ook in het huidige werk werden muizen opgenomen behandeld met PBA in CFA en met PBS alleen als controle groepen in het acute model van motor neuron degeneratie. Zoals verwacht werd gevonden dat CFA enig beschermend effect had hoewel het significant lager was dan verkregen in muizen behandeld met Cop-1 in CFA. Recente studies toonden aan dat Cop-1 immunisatie zonder adjuvant ook leidt tot effectieve bescherming tegen glutamaat giftigheid. (H.S., Hila Avidan, en M.S., ongepubliceerde gegevens) Deze immunisatie methode geeft bescherming vergelijkbaar aan deze bereikt met immunisatie met adjuvant, maar het niveau van T cellen dat het effect kan bewaren, is slechts behouden voor twee weken. Daarenboven verbeteren herhaaldelijk dagelijkse vaccinatie met Cop-1 de afloop niet, maar ze verminderen het voordeel verkregen door een enkele injectie (H.S., Hila Avidan, en M.S., ongepubliceerde gegevens) Het lijkt redelijk aan te nemen dat Cop-1 immunisatie leidend tot neuro bescherming, zoals beschermende immunisatie met zelf verkregen peptides, phenotype afhankelijk is. Daarom leidt dagelijkse immunisatie op dagelijkse basis, zelfs indien het leidt tot de aanwezigheid van een groot aantal reactieve T cellen, niet tot neuro bescherming wanneer het phenotype verandert. Recente studies toonden dat vooraleer immunisatie met Cop-1 beschermend wordt, IFN- γ expressie door de geactiveerde lymphocyten moet volgehouden worden. Dit zou verklaren waarom een immunisatie protocol dat effectief is bij het onderdrukken van autoimmuniteit in een autoimmune ziekte als MS, niet van voordeel is bij neuro degeneratieve ziektes zoals ALS waar actieve immuniteit nodig is (20). Het lijkt dus dat om Cop-1 te ontwikkelen voor gebruik als een therapeutisch vaccin tegen chronische ziektes, het nodig is een formulering te vinden en de frequentie van immunisatie. Verdere studies zouden moeten focussen op een optimale timing, frequentie en dosering van de interventie, en andere adjuventen zouden ook moeten getest worden. In lopende studies wordt het gebruik van Cop-1 onderzocht zonder enig transportmiddel. Een belangrijke bevinding van de huidige studie is dat de keuze van dier model, met betrekking tot het niveau van uitdrukking van de mutant vorm van menselijk SOD1, het succes van de immuun interventie significant beïnvloed en misschien ook het protocol beïnvloed.

ALS is een agressieve neurodegeneratieve ziekte waarin veel destructieve zelf componenten een belangrijke rol spelen, maar die niet allen geïdentificeerd zijn, . Glutamaat en oxidatieve stress zijn tot heden geïdentificeerd als belangrijkste mediators van giftigheid. De rol van cellulaire en moleculaire immuun factoren bij bescherming van het organisme tegen de effecten van deze zelf destructieve agenten, werd jarenlang bediscussieerd. Onderzoekers en klinici hebben ook geprobeerd immuno onderdrukkers te gebruiken als behandeling, in de veronderstelling dat in ALS, zoals bij vele andere neurodegeneratieve ziektes, ontsteking kan geassocieerd worden met ziekte verspreiding en daarom schadelijk is (39, 40). De aanwezigheid van anti-ganglioside antilichamen bij ALS patiënten (41) heeft ook sommige onderzoekers aangezet te suggereren dat ALS een auto immuun ziekte is. Niettemin is er geen afdoend bewijs voor elk van deze hypothesen en behandeling met immuno onderdrukkers, inclusief volledige lichaamsbestraling, schoot tekort om enig effect te tonen (42). Dit gebrek zou kunnen suggereren dat de geobserveerde auto-immuniteit in ALS niet bijdraagt tot de voortgaande degeneratie, en dat de auto-immuniteit geassocieerd met de ziekte in feite deels een gebrek aantoont om een geschikt beschermend immuun mechanisme te vinden die helpt tegen de bedreiging van het weefsel. Door goed gecontroleerde immuniteit zo te versterken, die met zwakke zelf reagerende T cellen simuleert of cross-reageert, is het mogelijk om de destructieve effecten van zelf samenstellingen zoals glutamaat tegen te werken (15, 19, 43). Recent bewijs suggereert dat elementen van neurodegeneratieve en autoimmune ziekten kunnen vermengd worden in dezelfde ziekte. Processen die bekend zijn voor te komen in degeneratieve ziektes werden ontdekt bij auto-

immune ziektes (20, 44–48). Het is dus mogelijk dat in ‘gemengde’ ziektes het degeneratieve weefsel voordeel heeft van immuno modulatie eerder dan van immunosuppressie (43). Zodus, anders dan herhaaldelijke injecties, zoals in het therapeutische model voor MS, kan een eenmalige injectie met Cop-1 beschouwd worden als een therapie waarbij immune activiteit gestimuleerd wordt en gemoduleerd eerder dan onderdrukt.

Voor het antibioticum minocycline werd recentelijk aangetoond dat het de aanvang vertraagt en de voortgang van de symptomen in een muis model van ALS (49–51). In het zicht van het feit dat dit geneesmiddel, zoals andere tetracyclines, verschillende anti-ontstekkende acties heeft, zou zijn waargenomen heilzaam effect in ALS muizen de bevindingen van de huidige studie tegenspreken. Het lijkt echter dat minocycline in het ALS model werkt door het blokkeren van de vrijgave van cytochrome c in de mitochondria (50). Zodus spreken de twee behandelingsmodaliteiten zich niet tegen, en zouden ze zelfs complementair zijn, een mogelijkheid die het waard is om te onderzoeken.

Men denkt dat de pathogenese van ALS gelinkt is tot een onvoldoende aan glutamaat transporters, wiens functie het is om een teveel aan extracellulair glutamaat te bufferen (52, 53). IFN- γ up-reguleert de uitdrukking van de glutamaat transporters door astrocyten. (54). Omdat IFN- γ een dominant cytokine in T helper 1 cellen is, heeft onze groep gesuggereerd dat de activiteit van IFN- γ afgeleid uit T cellen, een mechanisme aan de basis kan leggen waarbij de T cellen, eens dat ze zich bij het letsel bevinden, geactiveerd worden en de residente microglia helpen in hun taak om de cel overblijfselen en andere giftige substanties die het weefsel bedreigen, weg te doen. Studies door onze groep hebben inderdaad aangetoond dat de fagocytische activiteit van de microglia en hun capaciteit voor opname van radioactief glutamaat significant verhoogde na hun blootstelling aan IFN- γ (I. Shaked, O. Butovsky, T. Mizrahi, R. Gersner, X. Xiao, P. Soteropoulos, P. Tolia, R. P. Hart, en M.S., ongepubliceerde gegevens).

Andere studies door onze groep hebben aangetoond dat Cop-1-reactieve T cellen, wanneer ze geïnjecteerd worden in niet gekwetste ratten, gaan naar de CNS, een kenmerk van T cellen die zelf-antigenen herkennen (38). Het aantal Cop-1 reactieve cellen dat naar CNS gaat, is verhoogd na CNS verwonding (55). Daarom lijkt het dat Cop-1-reactieve T cellen zelf-antigenen herkennen op de plaats van het letsel. Aangezien Cop-1 niet identiek in structuur is aan enig zelf-reagerend antigeen, zijn de T cellen die het activeert waarschijnlijk deze die antwoorden met lage affiniteit i.e. niet die mogelijk pathogeen zijn. Er werd gesuggereerd dat Cop-1 ageert zoals een gewijzigd peptide ligand bij het activeren van non encephalitogenetische T cellen (21). Het gebruik van Cop-1, dat gekarakteriseerd werd als een zwak reagerend anti-gen dat cross-reageert met een breed bereik van zelf reagerende T cellen (20, 21), zou een manier kunnen zijn om de verschillende vereisten bij menselijke individuen te voldoen ten opzichte van zelf-actieve antigenen. In een model voor glaucoma, een ziekte die gekarakteriseerd is door chronische optische zenuw neuropathy, werd gevonden dat Cop-1 vaccinatie een kortstondige verhoogde infiltratie van T cellen opwekt, en bewees het dat het een krachtig middel was voor de bescherming van weefsel. Dit werd vastgesteld toen de retinas van dieren geïmmuniseerd met Cop-1, een betere morfologie hebben dan retinas van niet gekwetste dieren, beide onderworpen aan glutamaat giftigheid (15). Het is daarom denkbaar dat, zoals bij andere CNS insult modellen, vaccinatie in het huidige model het aantal infiltrerende T cellen kortstondig verhoogt (37), en daarbij de mogelijkheid van residente cellen om onderhoud en herstelling van het weefsel indirect versterkt.

ALS in verband gebracht met SOD mutaties vertegenwoordigen slechts een kleine fractie van ALS patiënten. De veelbelovende resultaten met Cop-1 hier verkregen in het acute perifere

zenuwletsel model en zijn effect bij transgene muizen, argumenteren daarom in het voordeel van een behandeling van Cop-1 als behandeling voor andere vormen van ALS naast de familiale vorm. In de veronderstelling dat het aantal oorzakelijke of risico factoren in ALS of enige andere motor neuron ziekte groot is, is het onwaarschijnlijk dat globale bescherming bereikt kan worden door een enkel geneesmiddel gericht tegen één enkele mediator voor giftigheid. Mits veelvuldige factoren nodig zijn voor CNS herstel, zou globale bescherming verkregen kunnen worden door een therapeutische strategie waarbij de lichamelijke hulpmiddelen (immuun systeem) aangewend worden. Omdat T cellen aanmerkelijk zijn tussen de immune deelnemers in neuro bescherming ([13](#), [16](#)), zou een dergelijke therapie waarschijnlijk ontelbare factoren afgeleid uit T cellen werven ([35](#), [36](#)).

In het licht van aanwezige bevindingen en aangezien Cop-1 goedgekeurd werd door de 'Food and Drug Administration' voor klinisch gebruik in MS, stellen we voor dat dit onmiddellijk ontwikkeld wordt (in een klinisch goedgekeurde formulering en regime) tot een vaccin voor de behandeling van perifere zenuw letsels en motor neuron ziektes.

ALS amyotrophic lateral sclerosis

SOD superoxide dismutase

MS multiple sclerosis

RGC retinal ganglion cell

CFA complete Freund's adjuvant