

Zell- und Gentherapie bei der Amyotrophen Lateralsklerose

Experimentelle und klinische Forschung

Susanne Petri und Reinhard Dengler

Zusammenfassung

Die ALS ist eine neurodegenerative Erkrankung, die nach einer durchschnittlichen Überlebenszeit von 3 Jahren zum Tode führt. Schlanke und spastische Paresen resultieren aus einem progredienten Zelluntergang kortikaler und spinaler Motoneurone.

Etwa 10% der humanen ALS-Fälle treten familiär auf, davon tragen 10-20% Mutationen in dem Gen, das für das Enzym Cu-Zn Superoxid Dismutase (SOD1) codiert (40). Durch Überexpression humaner ALS-assoziiierter SOD1-Mutationen ließen sich transgene Tiermodelle generieren, die klinisch und neuropathologisch der humanen ALS gleichen (22). Multiple Pathomechanismen sind in die Entstehung von ALS involviert: Oxidativer Stress, Exzitotoxizität, Dysfunktion des Ubiquitin-Proteasom-Systems, mitochondriale Defekte, Dysorganisation von Neurofilamenten, Störung des retrograden axonalen Transports, Sekretion proinflammatorischer Zytokine durch aktivierte Mikroglia. Während in der familiären ALS sowie im Tiermodell der toxische Funktionsgewinn des mutierten SOD1-Proteins am Anfang einer Kaskade pathogenetischer Ereignisse steht, ist in der sporadischen ALS noch unklar, welcher Faktor den Ausgangspunkt für die unterschiedlichen zum selektiven Motoneuronverlust führenden zytotoxischen Mechanismen bildet (5). Pharmakologische Ansätze haben bisher trotz intensiver Forschung nicht zum Erfolg geführt. Während im ALS-Tiermodell u.a. Antioxidanzien, antiinflammatorische Substanzen oder neurotrophe Faktoren das Fortschreiten der Symptome verzögern können, ist beim Menschen die bisher einzige Substanz mit marginalem therapeutischem Potenzial der Glutamatantagonist Riluzol, der zu einer durchschnittlichen Lebensverlängerung von 3-4 Monaten führt (4).

Daher richten sich auch bei der ALS in den letzten Jahren vermehrt Hoffnungen auf experimentelle Behandlungsformen.

Zelltherapie

Zellersatztherapien wurden experimentell und in klinischen Studien bereits bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinson oder Chorea Huntington eingesetzt (46). Die Möglichkeit, zu Grunde gegangene Motoneurone durch Stammzellen zu ersetzen, ist nach aktuellem Kenntnisstand bei der ALS eher begrenzt: zielgerichtetes axonales Auswachsen vom primären Motorcortex zum Vorderhorn oder von spinalen Motoneuronen zu distalen Extremitätenmuskeln erscheint derzeit nicht realistisch. Daher liegt das Hauptinteresse in der Neuroprotektion von Motoneuronen durch Transplantate, die sich in gliale Zellen weiter differenzieren (29, 44). Die Rationale für diesen neuroprotektiven Therapieansatz leitet sich aus Experimenten mit chimären SOD1-Mäusen mit einer Mischung aus Wildtyp- und mutierten neuronalen und nicht-neuronalen Zellen ab (8). Dabei konnte gezeigt werden, dass Wildtyp-Motoneurone in Gegenwart von umgebenden Gliazellen mit der SOD1-Mutation degenerieren. Umgekehrt verlängern Wildtyp-Gliazellen das Überleben von benachbarten Motoneuronen, die die ALS-auslösende SOD1-Mutation exprimieren. Offensichtlich haben also mutierte nicht-neuronale Zellen (Astrozyten, Gliazellen) toxische Eigenschaften, während Wildtyp-Zellen therapeutisches Potential besitzen. Auch in vitro, in Kokultursystemen von aus embryonalen Stammzellen gewonnenen Motoneuronen und Astrozyten konnte dieser nicht-zellautonome Effekt der SOD1-Mutationen gezeigt werden (13, 37). Worin genau dieser besteht, ist noch nicht geklärt. Sowohl verringerte Sekretion von Nervenzellwachstumsfaktoren wie IGF 1 oder GDNF,

als auch vermehrte Sekretion zytotoxischer Substanzen durch die mutierten Astrozyten und Gliazellen könnten jedoch eine Rolle spielen (36).

Potenzielle Quellen für eine Stammzelltherapie stellen embryonale Stammzellen, neurale Stammzellen, Nabelschnurblut- oder Knochenmarkstammzellen (Tabelle 1) dar.

Embryonale Stammzellen

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) sind pluripotente Zellen, die im Blastozystenstadium des Embryos aus der inneren Zellmasse gewonnen werden können, bevor es zur Implantation in das Uterusendometrium kommt. Pluripotenz bedeutet, dass aus diesen embryonalen Stammzellen Zellen aller drei embryonalen Keimblätter entstehen können. Die Gewinnung von embryonalen Stammzellen wurde erstmals 1998 beschrieben, mittlerweile wurden über 225 verschiedene embryonale Stammzelllinien generiert (19). Im undifferenzierten Zustand können diese Zellen unbegrenzt unter den entsprechenden Zellkulturbedingungen vermehrt werden. Die Pluripotenz der embryonalen Stammzellen macht sie grundsätzlich zu vielversprechenden Kandidaten für zellbasierte Therapien. Ersatz von geschädigtem oder zugrunde gegangenem Gewebe, die Produktion von Enzymen oder Wachstumsfaktoren sowie die Wiederherstellung von zugrunde gegangenen Verbindungen zwischen unterschiedlichen Zellen sind im Prinzip vorstellbar. Die Differenzierung von embryonalen Stammzellen in neuronale oder gliale Zellen nach Transplantation ist allerdings stark von der Umgebung abhängig, in nicht neurogenen ZNS-Regionen entstehen in der Regel überwiegend Gliazellen. Auch die notwendigen Voraussetzungen für eine funktionale Integration der neu gebildeten Zellen in bestehende Netzwerke sind bisher

Tabelle 1

	Quelle	Eigenschaften	Studien im ALS-Tiermodell (Referenz-Nr.)
Embryonale Stammzellen	Blastozyste des Embryos	Pluripotent (Differenzierung in Zelltypen aller 3 Keimblätter möglich) Risiko der malignen Entartung nach Transplantation undifferenzierter Zellen	-
Adulte Stammzellen			
- neurale Stamm-/Vorläuferzellen	fetales/adultes ZNS-Gewebe	Differenzierung in verschiedene Zelltypen des zentralen Nervensystems (Neurone, Astrozyten, Oligodendrozyten)	10, 29, 45, 54
- Knochenmarkstammzellen	Beckenkamm-punktion	V.a. hämatopoetische, aber auch mesenchymale Stammzellen (Differenzierung in Knorpel-/Muskel-/ Nervenzellen)	6, 9, 14, 23
- Nabelschnurblut-Stammzellen	Nabelschnur/Plazenta (postpartal)	V.a. hämatopoetische, zu einem geringen Prozentsatz auch mesenchymale Stammzellen	18, 23

noch ungenügend verstanden; ein weiteres noch ungenügend gelöstes Problem ist das erhöhte Risiko der Tumorbildung nach Transplantation von ES-Zellen (7).

Zur in vitro Differenzierung von spezifischen neuronalen oder glialen Subtypen aus embryonalen Stammzellen wurden schon Protokolle entwickelt. So können beispielsweise durch Zugabe von Retinsäure und Sonic Hedgehog embryonale Stammzellen in Motoneurone und Interneurone differenziert werden (52), auch Methoden zur Differenzierung in Astrozyten (21), Oligodendrozyten (20) und Mikrogliazellen (50) wurden bereits publiziert. Vor Kurzem wurde gezeigt, dass aus humanen embryonalen Stammzellen in vitro differenzierte Motoneurone

nach Transplantation ins Rückenmark von Hühnerembryonen sowie in adultes Ratten-Rückenmark ihren motoneuronalen Phänotyp beibehalten und axonale Projektionen ausbildeten (31).

Neurale Stammzellen

Während im embryonalen ZNS Zellen mit Stammzellpotenzial weit verbreitet sind, kommen sie im Erwachsenen-ZNS nur in zwei Regionen vor: im Gyrus dentatus des Hippocampus und in den subventrikulären Zonen der Seitenventrikel (1, 16). Je nach Gehirnregion, aus der die Zellen isoliert werden, unterscheidet man zwischen tatsächlichen neuronalen Stammzellen und neuronalen Vorläuferzellen: Neuronale Stammzellen

besitzen ein hohes Regenerationspotenzial und die Fähigkeit, sich in die verschiedenen Zelltypen des zentralen Nervensystems (Neurone, Astrozyten, Oligodendrozyten) zu differenzieren. Neuronale Vorläuferzellen dagegen erneuern sich nur in begrenztem Ausmaß und sind in ihrer Differenzierungskapazität auf entweder neuronale oder gliale Zelltypen festgelegt. Humane neuronale Vorläuferzellen können z. B. bei Gewebresektionen im Rahmen der Epilepsie-

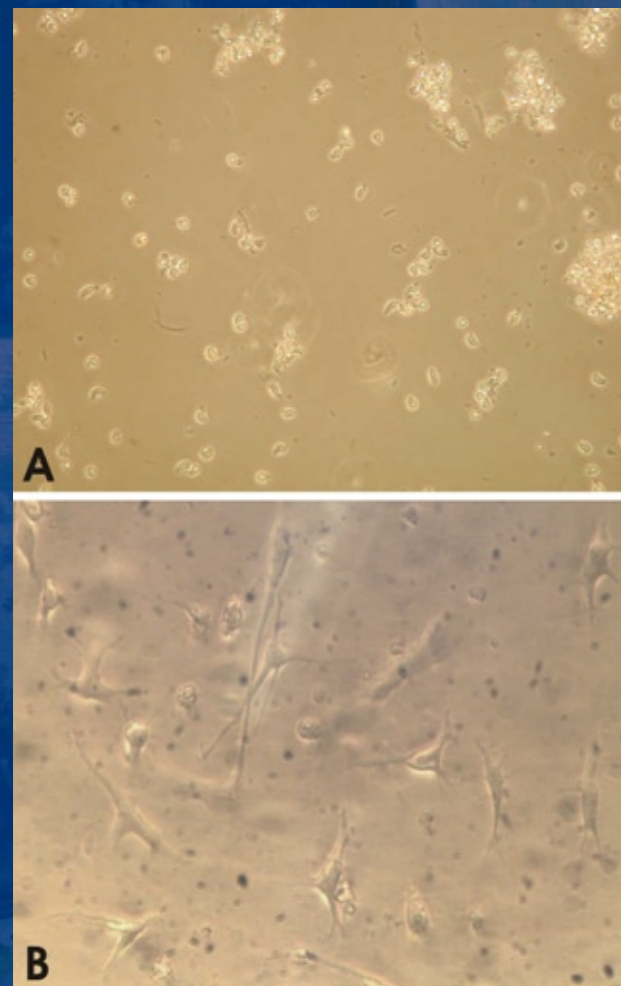


Abb 1:
Humane Nabelschnurblut-Stammzellen nativ (A) und nach Differenzierung in einen neuronalen Phänotyp in vitro (B)

Chirurgie gewonnen werden; als selektive Proliferationsfaktoren dienen der basische Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF-2) oder der epidermale Wachstumsfaktor (EGF). Nach einer Proliferationsphase können die Zellen dann in vitro durch Entzug des Proliferationsfaktors und/oder durch Zugabe von Differenzierungsfaktoren wie Retinsäure oder Sonic Hedgehog zur Differenzierung gebracht werden (17).

Knochenmark- und Nabelschnurblut-Stammzellen

Das Knochenmark beinhaltet zum einen hämatopoetische Stammzellen, aus denen Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten entstehen können, zum anderen mesenchymale Stammzellen, aus denen Osteoblasten, Chondrozyten, Myozyten und viele andere Zelltypen entstehen können (30). Es gibt auch Evidenz dafür, dass sich Knochenmarkstammzellen in geeignetem Milieu in neuronale und astrozytäre Zellen weiterentwickeln können, wobei bisher nicht sicher geklärt ist, ob es sich um Transdifferenzierungs- oder Zellfusionsprozesse handelt (49). Hierunter versteht man eine Reprogrammierung der Zelle nach Verschmelzung mit umgebenden Zellen im Empfängerewebe.

Nabelschnurzellen werden aus Plazenta und Nabelschnur gewonnen und sind ebenfalls reich an hämatopoetischen Stammzellen, weshalb sie als Alternative zur Knochenmarkstransplantation bei hämatologischen Erkrankungen dienen können, wenn keine passenden Knochenmarkspender gefunden werden können (43), darüber hinaus enthalten Nabelschnurblut-Stammzellen auch einen kleinen Prozentsatz von mesenchymalen Stammzellen und endothelialen Progenitorzellen (32). Auch eine Differen-

zierung in neuronale und gliale Phänotypen ist möglich (41,42) (Abb. 1).

Zelltransplantationsstudien im Tiermodell

Das am häufigsten verwendete und am besten charakterisierte Tiermodell der ALS sind transgene Mäuse oder Ratten, die mutierte SOD1 überexprimieren, was zu einem der ALS sehr ähnlichen Phänotyp mit progressivem Motoneuronverlust im Rückenmark und fortschreitenden Paresen führt. Bereits vor Ausbruch der Erkrankung kommt es zu einer Vermehrung reaktiver Astrozyten und aktivierter Mikrogliazellen im Rückenmark (24) und der entsprechenden Produktion proinflammatorischer und proapoptotischer Zytokine.

Neuronale Stammzellen

Zwei Arbeitsgruppen untersuchten das neuroprotektive Potential neuronaler Stammzellen im SOD1-Rattenmodell. Die Zellen wurden jeweils bereits vor Auftreten der ersten Symptome ins Rückenmark transplantiert. Klein und Mitarbeiter verwendeten humane neuronale Stammzellen, die zusätzlich mit einem viralen Vektor infiziert waren, der eine vermehrte Produktion des Nervenwachstumsfaktors GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) induzierte. Zudem waren die Zellen mit CNTF (ciliary neurotrophic factor) vorbehandelt, um den Prozentsatz an Astrozyten in der Zellpräparation zu erhöhen. Das Problem bei dieser Studie war jedoch, dass die transplantierten Zellen nur sehr begrenzt im Rückenmark wanderten und GDNF daher nur im unmittelbaren Transplantatbereich sezerniert wurde. Zudem beinhaltete das Transplantat trotz der CNTF-Vorbehandlung nur einen kleinen Anteil von Astrozyten und bestand überwiegend aus Nestin-positiven neuronalen Vorläuferzel-

len (29). Folglich hatte die Behandlung auch keinen Effekt auf das Fortschreiten der Erkrankung oder die Überlebenszeit. In einer weiteren Studie der gleichen Arbeitsgruppe konnte dann gezeigt werden, dass die Zellkörper der Motoneurone im Rückenmark durch die GDNF-sezernierenden Vorläuferzellen durchaus geschützt wurden, es aber weiterhin zum Verlust der neuromuskulären Endplatten kam (45).

Xu et al. transplantierten humane neuronale Stammzellen, die aus Zervikalmark gewonnen worden waren, was im Rattenmodell zu einer Verzögerung des Krankheitsbeginns und einer Verlängerung der Lebenszeit führte, begleitet von einer Reduktion des spinalen Motoneuronverlusts (54). In dieser Studie bildeten die transplantierten Zellen überwiegend einen neuronalen Phänotyp aus und gingen synaptische Verbindungen mit den Motoneuronen des Empfängertieres ein. Außerdem ließ sich auch eine Sekretion der Wachstumsfaktoren GDNF (glial derived neurotrophic factor) und BDNF (brain derived neurotrophic factor) im Rückenmark und Liquor der transplantierten Tiere nachweisen, sodass der Effekt der Transplantation der neuronalen Stammzellen v.a. auf die vermehrte Sekretion dieser Wachstumsfaktoren zurückgeführt wurde. Das insgesamt bessere Ergebnis dieser Studie bei ähnlichem Ansatz könnte auf eine verbesserte Platzierung des Transplantates, das jüngere Alter bei Transplantationen, einen unterschiedlichen Phänotyp der implantierten Zellen oder auch auf den Gebrauch unterschiedlicher Immunsuppressiva zurückzuführen sein (26).

Eine Studie in SOD1-Mäusen evaluierte die Wirkung muriner neuronaler Stammzellen, die vor der Transplantation in einen motoneuron-ähnlichen Phänotyp differenziert wur-

den (10). Die Tiere zeigten eine 3-wöchige Verzögerung des Krankheitsausbruchs, einhergehend mit einem verzögerten Absterben spinaler Motoneurone und einer durchschnittlichen Überlebenszeitverlängerung von ebenfalls 3 Wochen, wobei die mittlere Krankheitsdauer unverändert blieb. Auch hier ließ sich der positive Effekt der transplantierten Zellen auf das Überleben der Motoneurone der Empfängertiere auf die Freisetzung von Nervenwachstumsfaktoren (IGF-1, insulin-like growth factor-1; VEGF, vascular endothelial growth factor) zurückführen (10). Ein Hauptproblem war auch hier wieder, dass die transplantierten Zellen kaum im Rückenmark migrierten, sondern offensichtlich lediglich lokal im Bereich der Transplantatstelle einwuchsen. Angesichts der Tatsache, dass es jedoch nach Transplantation ins lumbale Rückenmark nicht nur zu einer Verzögerung des Auftretens der Paresen der Hinterbeine, sondern zu einer generellen Verzögerung des Krankheitsbeginns kam, ist davon auszugehen, dass die von den transplantierten Zellen produzierten Wachstumsfaktoren durch das Rückenmark diffundierten, um einen generellen trophischen Effekt zu erzielen (26).

All diese Studien wurden in präsymptomatischen Tieren durchgeführt. Inwieweit die Transplantation neuraler Stammzellen, deren Haupteffekt in vermehrter Sekretion von trophischen Faktoren zu liegen scheint, auch nach Ausbruch der Erkrankung von Nutzen sein kann, bleibt zukünftigen Studien vorbehalten. Möglicherweise könnte die Erhöhung der Anzahl von Injektionsstellen entlang der Wirbelsäule zur effektiveren Versorgung des gesamten Rückenmarkes mit Wachstumsfaktoren führen, sodass diese Art der Zelltherapie auch nach Auftreten der ersten ALS-Symptome noch von Nutzen sein könnte, was letztlich die Voraussetzung

für einen Einsatz bei Patienten wäre (26).

Nabelschnurblut-/ Knochenmarkszellen

Auch mit Nabelschnurblut- und Knochenmarkstammzellen wurden im ALS-Mausmodell bereits Therapiestudien durchgeführt (6, 9, 14, 18). Die intravenöse Injektion von sowohl humanen Nabelschnurblutzellen als auch murinen Knochenmarkszellen führte zu einer Verzögerung des Krankheitsausbruchs und verlängerte die Überlebenszeit um bis zu drei Wochen. Die Autoren gehen davon aus, dass hier v.a. systemische, ggf. immunmodulatorische Effekte der Zellinjektion entscheidend für die beobachteten Verbesserungen waren.

Um das Schicksal intraperitoneal injizierter Knochenmarkstammzellen besser verfolgen zu können, transplantierte eine italienische Arbeitsgruppe SOD1-Mäuse (nach vorausgehender Knochenmarksablation durch Bestrahlung) mit Knochenmarkstammzellen, die von Mäusen stammten, die ein grün fluoreszierendes Protein (GFP) in allen Gewebetypen exprimierten, und von Tieren, die ein gelb fluoreszierendes Protein (YFP) ausschließlich neuronal exprimierten. Im Cortex der Empfängertiere konnten nur wenige GFP- und YFP-positive Neurone beobachtet werden, was von den Autoren auf Zellfusionsprozesse zurückgeführt wurde. Hingegen konnten in großem Ausmaß GFP-positive Mikrogliazellen sowohl im Gehirn als auch im Rückenmark der behandelten Tiere nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden auch reife und unreife GFP-positive Muskelfasern in Herz- und Skelettmuskelgewebe der ALS-Mäuse nachgewiesen, was dafür spricht, dass Knochenmarkstammzellen auch zur Muskelregeneration beitragen können. SOD1-Mäuse, die mit Wildtyp-Knochenmarkszellen behandelt wurden,

zeigten eine Verzögerung des Krankheitsausbruchs und eine Verlängerung der Überlebenszeit von jeweils 12 – 14 Tagen, was sich anhand der Fluoreszenzmarkierung vor allem auf den Effekt der aus den Knochenmarkstammzellen entstandenen gesunden Mikroglia und nicht auf eine Neuroneogenese zurückführen lässt (9).

Eine Studie aus Ulm verglich die intrathekale Verabreichung von humanen mesenchymalen und Nabelschnurblut-Stammzellen sowohl nativ als auch nach Vordifferenzierung der jeweiligen Zellen in neuralen Stammzellen ähnliche Zellen. Hauptproblem bei dieser Studie war, dass es nach Injektion der Zellsuspension in die Zisterna magna nur zu einer sehr limitierten Migration der Zellen ins ZNS-Gewebe kam. Dementsprechend waren die Ergebnisse bis auf eine Verbesserung der motorischen Leistungen bei weiblichen Tieren nach Transplantation von mesenchymalen Stammzellen negativ (23).

Erste klinische Therapiestudien mit hämatopoetischen Stammzellen wurden bereits an ALS-Patienten durchgeführt. Janson et al. (2001) injizierten ALS-Patienten hämatogene aus peripherem Blut gewonnene Stammzellen intrathekal, was bei guter Verträglichkeit keine signifikanten Effekte ergab (27). In Studien von Mazzini et al. wurden autologe Knochenmarkstammzellen ins Rückenmark von bisher insgesamt neun ALS Patienten injiziert. Die Behandlung hatte nur geringe Nebenwirkungen, die Wirksamkeit konnte noch nicht ausreichend belegt werden. Es zeigte sich jedoch eine Verlangsamung der Progredienz des Kraftverlustes in einigen Muskeln sowie eine Stabilisierung der respiratorischen Funktion bei einem Teil der behandelten Patienten (33-35). Da eine kurative neuroprotektive Therapie der ALS nach wie vor nicht existiert, sollte dringend

eine weitere Erprobung dieser Methode sowohl im Tiermodell als auch in kontrollierten klinischen Studien mit begleitender wissenschaftlicher Evaluation erfolgen, um das Potenzial dieser Methode zu erfassen (44).

Während die bisher erwähnten Studien nicht auf Zellersatz verloren gegangener oder geschädigter Motoneurone, sondern auf die Erzeugung günstigerer Bedingungen für körpereigene Motoneurone im Rückenmark abzielten, ist aufgrund des selektiven Motoneuronverlustes bei der ALS trotz zahlreicher noch ungelöster methodischer Probleme grundsätzlich auch eine tatsächliche Zellersatztherapie denkbar. In einem Rattenmodell mit virusvermitteltem akutem Motoneuronverlust konnten Motoneurone aus murinen embryonalen Stammzellen bereits erfolgreich eingesetzt werden; die spinal implantierten Motoneurone zeigten bei gleichzeitiger Infusion des Wachstumsfaktors Dibutyryl - cAMP ein zielgerichtetes Auswachsen von Axonen in die Vorderwurzeln (25). Ob derartige auf direkten Zellersatz ausgerichtete Ansätze auch bei einer chronischen neurodegenerativen Erkrankung wie der ALS sinnvoll eingesetzt werden können, muss sicherlich noch durch intensive Grundlagen- und tierexperimentelle Forschung weiter abgeklärt werden (26). Das G93A-Mausmodell, das eine hohe Kopienzahl des mutierten SOD1-Gens exprimiert und daher einen sehr raschen Krankheitsverlauf zeigt, erscheint für derartige Untersuchungen nur bedingt geeignet. Möglicherweise sind Tiermodelle mit langsamerer Krankheitsprogression, wie z. B. die Wobbler-Maus, in denen potenzielle Regenerationsprozesse in einem ausreichend langen Zeitfenster beobachtet werden können, geeigneter (26).

Gentherapie

Gentherapie mit viralen Vektoren hat in den letzten 20 Jahren als vielversprechender Behandlungsansatz für Krankheiten, für die bisher keine pharmakologische oder operative Behandlungsoption existiert, Beachtung gefunden. Das ursprüngliche Konzept war vor allem auf die Behandlung von erblichen genetischen Krankheiten gerichtet, derzeit sind jedoch Krebserkrankungen die Hauptindikation bei klinischen Gentherapie-studien.

Zur Behandlung von neurologischen Erkrankungen erscheinen virale Vektoren, die auf Lentiviren oder adenoassoziierten Viren (AAV) basieren, besonders attraktiv (2, 12). Lentiviren können durch unterschiedliche Hüllproteine „pseudotypisiert“ werden, wodurch die Spezifität für bestimmte Zelltypen erhöht und die Transduktionseffizienz, d.h. das Einschleusen des therapeutisch wirksamen Gens in die Zielzellen, verbessert wird. Gentherapie mit lentiviralen Vektoren wurde in den letzten Jahren in zahlreichen Tiermodellen neurologischer Erkrankungen erfolgreich zum Einsatz gebracht (2).

Rekombinante AAV-Vektoren (adenoassoziierte virale Vektoren) können eine Vielzahl von sich teilenden und ruhenden Zelltypen transduzieren und zu einer langfristigen Genexpression führen, dabei sind sie nicht pathogen und nur schwach immunogen.

Derzeit existieren 8 verschiedene AAV-Serotypen mit verschiedener Gewebespezifität und verschiedenen Transduktionsmustern (15, 48). Die Mehrzahl klinischer Studien, die derzeit bei neurodegenerativen Erkrankungen geplant oder bereits im Gange sind, basieren daher auf AAV-Vektoren. Hierzu gehören Phase1-Studien bei der Parkinsonerkrankung mit AAV-Glutamatdecarboxylase (GAD) sowie der Einsatz von AAV-Vektoren

zum Transfer von nerve growth factor (NGF) bei Morbus Alzheimer (15).

Gentransfer

Bei den Applikationsformen der Gentherapie kann man zwischen direktem und indirektem Gentransfer unterscheiden. Die direkte Injektion eines Vektors ins Rückenmark führt zu hohen Titern in der Zielregion; Zellspezifität des Vektors kann durch Hüllproteine oder zellspezifische Promotorsequenzen gewährleistet werden. Effektiver Gentransfer durch intraspinale Injektion konnte im SOD1 transgenen Tiermodell sowohl mit lentiviralen als auch mit AAV-Vektoren erzielt werden (15, 47). Nachteil der direkten intraspinalen Injektion sind die damit verbundenen potenziellen Komplikationen und Risiken, die jedoch angesichts der Schwere der Erkrankung und des Fehlens kurativer Therapiealternativen bei der ALS vertretbar sein könnten.

Eine Alternative zur direkten intraspinalen Injektion stellt der retrograde axonale Transport eines viralen Vektors, in der Regel nach intramuskulärer Injektion, dar. So wird eine spezifische Expression des therapeutischen Transgens in Motoneuronen gewährleistet; gliale Zellen, deren Bedeutung in der ALS-Pathogenese zunehmend gewürdigt wird, werden auf diesem Weg allerdings nicht erreicht. Problematisch erscheint zudem, dass im ALS-Mausmodell Störungen des axonalen Transports auftreten, so dass die Effizienz des indirekten Gentransfers bei der ALS eingeschränkt sein könnte (53).

Einige Gruppen berichteten jedoch über erfolgreiche Gentherapien im SOD1-Tiermodell nach intramuskulärer Injektion viraler Vektoren (38, 55). Die potenzielle Übertragung dieser Ergebnisse in Patientenstudien wird zusätzlich erschwert durch die we-

sentlich größere menschliche Muskelmasse und längere Distanz von distalen Extremitätenmuskeln bis zum Rückenmark, was den retrograden axonalen Transport sicherlich komplizierter macht als im Mausmodell. Die fortschreitende Weiterentwicklung viraler Vektoren wird diese Technik jedoch möglicherweise eines Tages auch beim Menschen anwendbar machen (15).

Eine dritte Möglichkeit, ein therapeutisch wirksames Transgen zur Expression in den Empfängerorganismus zu bringen, besteht in der sog. ex vivo Gentherapie. Hierbei handelt es sich um die genetische Manipulation von Zellen, vorzugsweise Stammzellen mit hohem Regenerationspotenzial, ex vivo vor Transplantation ins Rückenmark. Ein Beispiel für diesen Ansatz ist die bereits erwähnte Arbeit von Klein und Mitarbeitern, in der menschliche neurale Vorläuferzellen durch Infektion mit einem lentiviralen Vektor dazu gebracht wurden, vermehrt den Nervenwachstumsfaktor GDNF zu sezernieren (29).

Nervenwachstumsfaktoren sorgen während der Embryonalentwicklung für Überleben und Ausdifferenzierung von Nervenzellen und tragen auch im erwachsenen Nervensystem zum Funktionserhalt bei. Während im Tiermodell zum Beispiel mit vascular endothelial growth factor (VEGF) oder insulinlike growth factor 1 (IGF-1) therapeutische Effekte erzielt werden konnten, waren klinische Studien an ALS-Patienten bisher nicht erfolgreich und scheiterten z. T. an den nicht tolerierbaren Nebenwirkungen, die eine systemische Applikation von Wachstumsfaktoren mit sich brachte (2, 51). Hier könnte die gezielte virusvermittelte Expression eines Wachstumsfaktors in Motoneuronen einen Ausweg bieten, was im Tiermodell bereits erfolgreich umgesetzt wurde (3, 28).

RNA-Interferenz

Neben der vermehrten Expression von potenziell therapeutisch wirksamen Transgenen bietet die Gentherapie mit viralen Vektoren auch die Möglichkeit, ein mutiertes Gen, das zellschädigende Proteine generiert, herunter zu regulieren, auch als „Gene silencing“ bezeichnet (2). Dies geschieht mittels der Methode der RNA-Interferenz (RNAi), d.h. dem hochspezifischen „Stilllegen“ eines Gens durch in die Zelle eingeschleuste kleine RNA-Moleküle (11). Für diesen Therapieansatz sind lediglich Krankheiten geeignet, die auf einer bekannten Genmutation beruhen, die zur Überproduktion eines zellschädigenden Proteins führt. Hierzu gehören die 20% der familiären ALS-Fälle, die durch Mutationen im SOD1-Gen und den dadurch bedingten toxischen Funktionsgewinn des SOD1-Enzyms hervorgerufen werden (40). Mehrere Studien konnten im SOD1-Mausmodell bereits sehr erfolgreich zeigen, dass mittels RNA-Interferenz die mutierte SOD1 effizient herunter reguliert und das Überleben der Tiere sowie die motorische Leistung dramatisch verbessert werden können (38, 39). Die Herausforderung bei der Behandlung der menschlichen autosomal dominant erblichen SOD1-assoziierten ALS liegt jetzt darin, die mutierten SOD1-Allele spezifisch herunterzuregulieren, ohne die physiologisch wichtige Expression des gesunden SOD1-Proteins zu beeinträchtigen. Da bereits über 100 unterschiedliche ALS-verursachende SOD1-Mutationen bekannt sind, müssten zudem jeweils spezifische Vektoren entwickelt werden (2).

Insgesamt erscheint die Gentherapie als vielversprechender Ansatz, nebenwirkungsarm bestimmte Faktoren, die zum Überleben von Motoneuronen beitragen, zellspezifisch zu exprimieren. Bevor es zur breiten

Anwendung in klinischen Studien kommen wird, sind jedoch noch zahlreiche Aspekte wie ausreichende Sicherheit des verwendeten Vektor-Systems (Vermeidung einer zufälligen Integration ins humane Genom oder in Keimzelllinien), die Ermittlung der sichersten und gleichzeitig effizientesten Applikationsmethoden sowie nicht zuletzt die standardisierte Produktion großer Vektormengen (da wahrscheinlich mehrere Injektionsorte und mehrfache Injektionen pro Patient erforderlich wären) zu bedenken. (2). Die schlechte Prognose und die fehlenden Alternativen liefern jedoch Argumente, experimentelle Therapieansätze wie Stammzell- und Gentherapien möglichst bald in klinischen ALS-Studien auszuprobieren.

Literatur

- Alvarez-Buylla A, Seri B, Doetsch F (2002) Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain. *Brain research bulletin* 57:751-758
- Azzouz M (2006) Gene Therapy for ALS: progress and prospects. *Biochimica et biophysica acta* 1762:1122-1127
- Azzouz M, Ralph GS, Storkebaum E, Walmsley LE, Mitrophanous KA, Kingsman SM, Carmeliet P, Mazarakis ND (2004) VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse ALS model. *Nature* 429:413-417
- Bensimon G, Lacomblez L, Meininger V (1994) A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *The New England journal of medicine* 330:585-591
- Brujin LI, Miller TM, Cleveland DW (2004) Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annual review of neuroscience* 27:723-749
- Chen R, Ende N (2000) The potential for the use of mononuclear cells from human umbilical cord blood in the treatment of amyotrophic lateral sclerosis in SOD1 mice. *Journal of medicine* 31:21-30
- Christou YA, Moore HD, Shaw PJ, Monk PN (2007) Embryonic stem cells and prospects for their use in regenerative medicine approaches to motor neuron disease. *Neuropathology and applied neurobiology* 33:485-498
- Clement AM, Nguyen MD, Roberts EA, Garcia ML, Boillee S, Rule M, McMahon AP, Doucette W, Siwek D, Ferrante RJ, Brown RH, Jr., Julien JP, Goldstein LS, Cleveland DW (2003) Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science NY* 302:113-117
- Corti S, Locatelli F, Donadoni C, Guglieri M, Papadimitriou D, Strazzer S, Del Bo R, Comi GP (2004) Wild-type bone marrow cells ameliorate the phenotype of SOD1-G93A ALS mice and contribute to CNS, heart and skeletal muscle tissues. *Brain* 127:2518-2532
- Corti S, Locatelli F, Papadimitriou D, Del Bo R, Nizzardo M, Nardini M, Donadoni C, Salani S, Fortunato F, Strazzer S, Bresolin N, Comi GP (2007) Neural stem cells LewisX+ CXCR4+ modify disease progression in an amyotrophic lateral sclerosis model. *Brain* 130:1289-1305
- Davidson BL, Paulson HL (2004) Molecular medicine for the brain: silencing of disease genes with RNA interference. *Lancet neurology* 3:145-149
- Deglon N, Hantraye P (2005) Viral vectors as tools to model and treat neurodegenerative disorders. *The journal of gene medicine* 7:530-539
- Di Giorgio FP, Carrasco MA, Siao MC, Maniatis T, Eggan K (2007) Non-cell autonomous effect of glia on motor neurons in an embryonic stem cell-based ALS model. *Nature neuroscience* 10:608-614
- Ende N, Weinstein F, Chen R, Ende M (2000) Human umbilical cord blood effect on sod mice (amyotrophic lateral sclerosis). *Life sciences* 67:53-59
- Federici T, Boulis NM (2006) Gene-based treatment of motor neuron diseases. *Muscle & Nerve* 33:302-323
- Gage FH (2000) Mammalian neural stem cells. *Science NY* 287:1433-1438
- Gao J, Coggeshall RE, Tarasenko YI, Wu P (2005) Human neural stem cell-derived cholinergic neurons innervate muscle in motoneuron deficient adult rats. *Neuroscience* 131:257-262
- Garbuzova-Davis S, Willing AE, Zigova T, Saporta S, Justen EB, Lane JC, Hudson JE, Chen N, Davis CD, Sanberg PR (2003) Intravenous administration of human umbilical cord blood cells in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: distribution, migration, and differentiation. *Journal of hematotherapy & stem cell research* 12:255-270
- Gearhart J (2004) New human embryonic stem-cell lines—more is better. *The New England journal of medicine* 350:1275-1276
- Glaser T, Perez-Bouza A, Klein K, Brustle O (2005) Generation of purified oligodendrocyte progenitors from embryonic stem cells. *Faseb J* 19:112-114
- Gossrau G, Thiele J, Konang R, Schmandt T, Brustle O (2007) Bone morphogenetic protein-mediated modulation of lineage diversification during neural differentiation of embryonic stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 25:939-949
- Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, Caliando J, Hentati A, Kwon YW, Deng HX, et al. (1994) Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu, Zn superoxide dismutase mutation. *Science NY* 264:1772-1775
- Habisch HJ, Janowski M, Binder D, Kuzma-Kozakiewicz M, Widmann A, Habich A, Schwalenstocker B, Hermann A, Brenner R, Lukomska B, Domanska-Janik K, Ludolph AC, Storch A (2007) Intrathecal application of neuroectodermally converted stem cells into a mouse model of ALS: limited intraparenchymal migration and survival narrows therapeutic effects. *J Neural Transm* 114:1395-1406
- Hall ED, Oostveen JA, Gurney ME (1998) Relationship of microglial and astrocytic activation to disease onset and progression in a transgenic model of familial ALS. *Glia* 23:249-256
- Harper JM, Krishnan C, Darman JS, Deshpande DM, Peck S, Shats I, Backovic S, Rothstein JD, Kerr DA (2004) Axonal growth of embryonic stem cell-derived motoneurons in vitro and in motoneuron-injured adult rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:7123-7128
- Hedlund E, Hefferan MP, Marsala M, Isacson O (2007) Cell therapy and stem cells in animal models of motor neuron disorders. *European journal of neuroscience* 26:1721-1737
- Janson CG, Ramesh TM, During MJ, Leone P, Heywood J (2001) Human intrathecal transplantation of peripheral blood stem cells in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of hematotherapy & stem cell research* 10:913-915
- Kaspar BK, Llado J, Sherkat N, Rothstein JD, Gage FH (2003) Retrograde viral delivery of IGF-1 prolongs survival in a mouse ALS model. *Science NY* 301:839-842
- Klein SM, Behrstock S, McHugh J, Hoffmann K, Wallace K, Suzuki M, Aebischer P, Svendsen CN (2005) GDNF delivery using human neural progenitor cells in a rat model of ALS. *Human gene therapy* 16:509-521
- Kolf CM, Cho E, Tuan RS (2007) Mesenchymal stromal cells. *Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. Arthritis research & therapy* 9:204
- Lee H, Shamy GA, Elkabetz Y, Schofield CM, Harrison NL, Panagiotakos G, Succi ND, Tabar V, Studer L (2007) Directed differentiation and transplantation of human embryonic stem cell-derived motoneurons. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 25:1931-1939
- Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH (2004) Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 103:1669-1675
- Mazzini L, Fagioli F, Boccaletti R (2004) Stem-cell therapy in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 364:1936-1937
- Mazzini L, Mareschi K, Ferrero I, Vassallo E, Oliveri G, Boccaletti R, Testa L, Livigni S, Fagioli F (2006) Autologous mesenchymal stem cells: clinical applications in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurological research* 28:523-526
- Mazzini L, Mareschi K, Ferrero I, Vassallo E, Oliveri G, Nasuelli N, Oggioni GD, Testa L, Fagioli F (2008) Stem cell treatment in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Journal of the neurological sciences* 265:78-83
- Miller TM, Cleveland DW (2003) Has gene therapy for ALS arrived? *Nature medicine* 9:1256-1257
- Nagai M, Re DB, Nagata T, Chalazonitis A, Jessell TM, Wichterle H, Przedborski S (2007) Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nature neuroscience* 10:615-622
- Ralph GS, Radcliffe PA, Day DM, Carthy JM, Leroux MA, Lee DC, Wong LF, Bilsland LG, Green-Smith L, Kingsman SM, Mitrophanous KA, Mazarakis ND, Azzouz M (2005) Silencing mutant SOD1 using RNAi protects against neurodegeneration and extends survival in an ALS model. *Nature medicine* 11:429-433
- Raoul C, Abbas-Terki T, Bensadoun JC, Guillot S, Haase G, Szulc J, Henderson CE, Aebischer P (2005) Lentiviral-mediated silencing of SOD1 through RNA interference retards disease onset and progression in a mouse model of ALS. *Nature medicine* 11:423-428
- Rosen DR (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 364:362
- Sanchez-Ramos JR (2002) Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood. *Journal of neuroscience research* 69:880-893
- Sanchez-Ramos JR, Song S, Kamath SG, Zigova T, Willing A, Cardozo-Pelaez F, Stedeford T, Chopp M, Sanberg PR (2001) Expression of neural markers in human umbilical cord blood. *Experimental neurology* 171:109-115
- Schoemans H, Theunissen K, Maertens J, Boogaerts M, Verfaillie C, Wagner J (2006) Adult umbilical cord blood transplantation: a comprehensive review. *Bone marrow transplantation* 38:83-93
- Silani V, Cova L, Corbo M, Ciammola A, Polli E (2004) Stem-cell therapy for amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 364:200-202
- Suzuki M, McHugh J, Tork C, Shelley B, Klein SM, Aebischer P, Svendsen CN (2007) GDNF secreting human neural progenitor cells protect dying motor

neurons, but not their projection to muscle, in a rat model of familial ALS. PLoS ONE 2:e689

46. Tai YT, Svendsen CN (2004) Stem cells as a potential treatment of neurological disorders. Current opinion in pharmacology 4:98-104

47. Tanase K, Teng Q, Krishnaney AA, Liu JK, Garrity-Moses ME, Boulis NM (2004) Cervical spinal cord delivery of a rabies G protein pseudotyped lentiviral vector in the SOD-1 transgenic mouse. Invited submission from the Joint Section Meeting on Disorders of the Spine and Peripheral Nerves, March 2004. Journal of neurosurgery 1:128-136

48. Tenenbaum L, Chtarto A, Lehtonen E, Velu T, Brodchi J, Levivier M (2004) Recombinant AAV-mediated gene delivery to the central nervous system. The journal of gene medicine 6 Suppl 1:S212-222

49. Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, Meyer EM, Morel L, Petersen BE, Scott EW (2002) Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. Nature 416:542-545

50. Tsuchiya T, Park KC, Toyonaga S, Yamada SM, Nakabayashi H, Nakai E, Ikawa N, Furuya M, Tomioka A, Shimizu K (2005) Characterization of microglia induced from mouse embryonic stem cells and their migration into the brain parenchyma. Journal of neuroimmunology 160:210-218

51. Tuszynski MH (2002) Growth-factor gene therapy for neurodegenerative disorders. Lancet neurology 1:51-57

52. Wichterle H, Lieberam I, Porter JA, Jessell TM (2002) Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. Cell 110:385-397

53. Williamson TL, Cleveland DW (1999) Slowing of axonal transport is a very early event in the toxicity of ALS-linked SOD1 mutants to motor neurons. Nature neuroscience 2:50-56

54. Xu L, Yan J, Chen D, Welsh AM, Hazel T, Johe K, Hatfield G, Koliatsos VE (2006) Human neural stem cell grafts ameliorate motor neuron disease in SOD-1 transgenic rats. Transplantation 82:865-875

55. Yamashita S, Mita S, Kato S, Okado H, Ohama E, Uchino M (2003) Bcl-2 expression using retrograde transport of adenoviral vectors inhibits cytochrome c-release and caspase-1 activation in motor neurons of mutant superoxide dismutase 1 (G93A) transgenic mice. Neuroscience letters 350:17-20

Impressum:



Deutsche Gesellschaft
für Muskelkranke e.V.

DGM · Deutsche Gesellschaft
für Muskelkranke e.V.
Im Moos 4 · 79112 Freiburg
Tel.: 07665/9 44 70

Anschrift der Verfasser und Kontaktadresse:

PD Dr. med. Susanne Petri
Prof. Dr. med. R. Dengler
Neurologische Klinik mit
Klinischer Neurophysiologie
Medizinische Hochschule Hannover
Carl-Neuberg-Straße 1
D-30177 Hannover

Tel.: 0511-532 3579

Fax: 0345-532 3115

E-Mail: Petri.Susanne@mh-hannover.de

E-Mail: Dengler.Reinhard@mh-hannover.de

Herausgeber der Schriftenreihe:

Prof. Dr. med. R. Dengler · Hannover
Prof. Dr. med. S. Zierz · Halle/Saale

Verantwortlich für den Inhalt dieser Ausgabe:

Prof. Dr. med. R. Dengler · Hannover



sanofi aventis

Das Wichtigste ist die Gesundheit

Sanofi-Aventis Deutschland GmbH
Business Unit Oncology/Speciality
Potsdamer Str. 8
10785 Berlin
Tel.: 0 180/2 222 010

Zell- und Gentherapie bei der
Amyotrophen Lateralsklerose

ARCIS Verlag GmbH · München 2008
ISSN 0949-1503
13. Jahrgang