

Genterapi vid genetiskt orsakad hörselnedsättning

Framtida behandlingsmöjlighet – kanske kombinerad med stamceller



BJÖRN PALMGREN, specialistläkare, sektionen för öron-, näs- och halssjukdomar, Karolinska Universitetssjukhuset Solna, Stockholm
bjorn.palmgren@karolinska.se
ZHE JIN, med dr, Institutet för hörsel- och kommunikationsforskning, Karolinska institutet, Stockholm
ULF ROSENHALL, professor, överläkare, sektionen för hörselsjuk-

domar, Karolinska Universitetssjukhuset Solna, Stockholm
MAOLI DUAN, docent, läkare, sektionen för öron-, näs- och halssjukdomar, Karolinska Universitetssjukhuset Huddinge, Stockholm; institutionen för klinisk neurovetenskap, Institutet för hörsel- och kommunikationsforskning, Karolinska institutet, Stockholm

Hörselnedsättning, från lätt eller måttlig till mycket svår, är ett stort globalt folkhälsoproblem med många drabbade över hela världen. Inom EU, med ungefär en halv miljard invånare, har cirka 140 miljoner människor någon form av hörselnedsättning. De flesta har lätt hörselnedsättning, men mer än 30 miljoner har behov av åtgärder, framför allt i form av hörselrehabilitering. Av dessa personer är mer än 700 000 gravt hörselskadade eller helt döva. Dessa personer har ingen eller endast ringa nytta av hörapparatförstärkning.

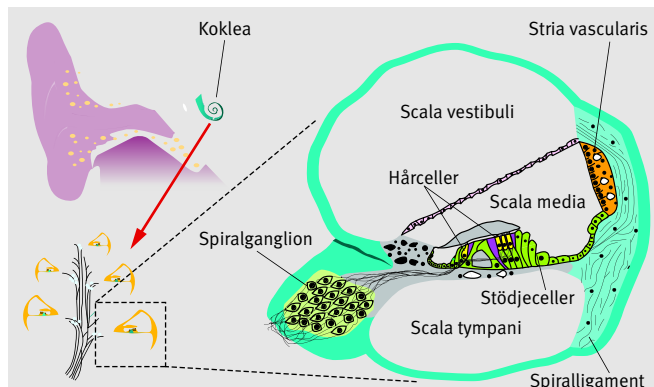
För närvarande är kokleaimplantat den enda medicinskt-tekniska behandlingsmöjligheten vid dövhet, men det är en dyr teknik, som heller inte lämpar sig för alla typer av bakomliggande orsaker.

Det finns därför ett stort behov av nya och helt annorlunda behandlingsmetoder. Genterapi är en aktuell och lovande metod för att bota dövhet, framför allt om dövheten är genetiskt orsakad. Denna översiktsartikel fokuserar på mekanismerna bakom genetiskt orsakad hörselnedsättning och de framtida möjligheterna till behandling med genterapi.

Introduktion

Hos däggdjur fungerar den spiralformade koklean i innerörat som mottagare i det perifera auditiva systemet. Den omvandlar ljudvågor som förmedlas av trumhinnan och mellanörats benkedja till elektriska impulser, som sedan tolkas av hörselcentrum i hjärnan. Kokleans tre funktionella komponenter är laterala väggen, Cortis organ och spiralgangliet (Figur 1), och det är således där den primära skadan återfinns vid genetisk hörselnedsättning.

Omkring 50 procent, eller till och med mer, av grava hörselskadade hos barn är genetiskt betingade. Cirka 70 procent av ge-



Figur 1. Schematisk bild av örats olika delar och en tvärsnittsbild av koklean. Koklean är indelad i tre olika vätskefyllda rum där scala vestibuli och scala tympani innehåller perilymfa och scala media endolymfa. Orsaken till genetisk hörselnedsättning återfinns oftast i någon av kokleans tre funktionella komponenter: laterala väggen, Cortis organ och spiralgangliet. Laterala väggen består av stria vascularis och spiralligamentet, vilka deltar i kokleans reglering av kaliumjoner. Cortis organ består av bl a hårceller och stödjeceller, som deltar i omvandlingen av mekaniska signaler till elektriska impulser. Spiralgangliet innehåller två typer av primära hörselneuron (typ I och typ II) och fortleder de elektriska impulserna till hörselcentrum i hjärnan.

netisk hörselnedsättning är icke-syndromal utan andra kliniska uttryck, medan det hos resterande 30 procent är del i ett syndrom. För närvarande finns ingen tillgänglig genetisk behandling för hereditära hörselskador. De senaste åren har vår kunskap om genterapi ökat dramatiskt, och genterapi har potential att i framtiden bli en av de viktigaste medicinska behandlingsmetoderna.

Innerörats anatomiska förhållanden gör det väl lämpat för genterapi. Det är ett relativt isolerat organ som är vätskefyllt med kända volymer peri- och endolympa och med en strikt avgränsad blodförsörjning. Således kan alla funktionella celler relativt lätt nås av önskade koncentrationer av det aktuella ämnet genom lokalt riktad behandling. Denna kan ges antingen som enstaka injektioner eller med miniosmotiska pumpar. På så sätt kan man effektivt och säkert transfektera koklean, med teoretiskt liten risk för sidoeffekter.

Man har redan identifierat mer än 120 olika gener som direkt påverkar innerörats utveckling eller funktion och ytterligare

SAMMANFATTAT

Inom EU har cirka 140 miljoner människor någon form av hörselnedsättning, och mer än 700 000 är gravt hörselskadade eller helt döva.
För närvarande är kokleaimplantat den enda behandlingsmöjligheten för gravt hörselskadade.
De flesta genetiskt betingade hörselnedsättningar orsakas av defekter i någon eller några av kokleans tre funktionella komponenter: laterala väggen, Cortis organ och spiralgangliet.
Genetiskt betingad hörsel-

nedsättning kan delas in i syndromal och icke-syndromal. Exempel på syndrom som innefattar hörselnedsättning eller dövhet är Alports syndrom och Ushers syndrom.
Vid genterapi ersätter man defekta gener med friska, som introduceras till cellerna med hjälp av virala vektorer.
Ytterligare potentiella behandlingsmöjligheter inkluderar genterapi i kombination med stamceller.
Mer forskning behövs innan genterapi på allvar kan användas i klinisk rutinverksamhet.

betydelsefulla lokus är kända. Transgena tekniker har också visat sig ha effekt på kongenital dövhet hos shaker-2(sh2)-möss [1]. Ytterligare potentiella möjligheter till att bota grav hörselnedsättning inkluderar användning av stamceller.

Genetisk hörselnedsättning består av en grupp högst olika störningar av det perifera hörselsystemet; de flesta är lokaliserade till innerörat och orsakar kokleär hörselnedsättning eller dövhet. Det finns också genetiska hörselnedsättningar av konduktiv typ, vilka orsakas av kraniofaciala missbildningar som kan engagera mellanörat och den yttre hörselgången.

Neurofibromatos typ 2 (NF2) är en genetisk sjukdom med lokus 22q12.2. Sjukdomen medför multipla schwannom, bl a i hörselnerven, som leder till progressiv dubbelsidig retrokokleär hörselnedsättning.

Mer än 400 olika typer av genetisk hörselnedsättning har till dags datum beskrivits. Sedan 1995, då den första genen som orsakar icke-syndromala hörselnedsättningar identifierades, har utvecklingen gått snabbt. De dövhetsrelaterade generna grupperas ofta i olika klasser på basis av de proteiner eller jonkanaler de kodar för, t ex transkriptionsfaktorer, cytoskelettproteiner, extracellulära matrixkomponenter och jonhomeostaskanaler [2-4]. En övergripande och uppdaterad sammanfattning av gener som orsakar hörselskada återfinns på The Hereditary Hearing Loss Homepage, <<http://webhost.ua.ac.be/hhh/>>.

Man har observerat att olika mutationer hos en och samma gen kan ge upphov till helt olika typer av genetisk hörselnedsättning. Ett typiskt exempel är de rubbningar som orsakas av mutation i MYO7A-genen. Dessa inbegriper både icke-syndromala och syndromala hörselskador, t ex Ushers syndrom typ 1B [5], beroende på mutationens lokalisering. Det är även intressant att konstatera att samma fenotyp av dövhet kan uppstå från mutationer av olika gener; t ex kan dövhet vid Waardenburgs syndrom 4 (WS4) separert orsakas av mutationer i tre olika gener.

Icke-syndromal hörselnedsättning

Vid icke-syndromala hörselnedsättningar är hörselskadan patientens enda kliniska manifestation. Icke-syndromrelaterad hörselnedsättning står för cirka 70 procent av alla genetiskt betingade hörselskador och delas in i autosomt recessivt (DFNB, 75 procent), dominant (DFNA, 20 procent), könsbundet (DFN, 3 procent) och mitokondriellt (1 procent) nedärvda [6]. Jämfört med den autosomt dominant nedärvda typen är den recessiva generellt sett allvarligare med nedsättning vid alla frekvenser och med en prelingual debut.

Hittills har över 120 genlokus för icke-syndromal hörselnedsättning lokaliserats och mer än 40 individuella gener identifierats. Värt att notera är att mutationer i en enda gen, GJB2 som kodar för gap junction-proteinet connexin 26, står för cirka 50 procent av all autosomal recessiv icke-syndromrelaterad hörselnedsättning hos nyfödda. I koklean finns connexin 26 på ett flertal ställen, t ex i lateralväggen och i stödjeceller [7], vilket spelar en viktig roll när det gäller att upprätthålla den kokleära jonhomeostasen, framför allt av kaliumjoner.

Mutationer i GJB2-genen är inte bara kopplade till DFNB1 utan också till icke-syndromal autosomt dominant hörselnedsättning (DFNA3) [8] och till hörselnedsättning vid Vohwinkels syndrom [9]. De flesta patienter med GJB2-mutationer uppvisar svår prelingual, icke-progressiv sensorineural hörselnedsättning. En djurmodell har utvecklats [10], där man lokaliserade sönderfall av connexin 26 i det epitheliala gap junction-nätverket i koklean, vilket resulterade i dövhet.

Syndromal hörselnedsättning

Vid syndromal hörselnedsättning finns det förutom hörselpå-

verkan även ytterligare organ dysfunktioner, t ex i njurar eller ögon. Över 400 syndrom där hörselnedsättning är en deldefekt finns beskrivna. Orsaken till syndromal dövhet varierar och kan kopplas till recessiva, dominant, könsbundna (X-bundna) eller mitokondriella anlag.

I denna genomgång beskriver vi endast ett par av de vanligare syndromen i detalj, men det är också vid dessa som man förväntas se de mest lovande resultaten för framtida genterapi. Ytterligare information gällande syndromrelaterad dövhet finns tillgänglig i andra sammanfattande artiklar [11, 12].

Alports syndrom är en kliniskt och genetiskt heterogen störning som karakteriseras av en kombination av progredierande nefrit, synpåverkan och sensorineural hörselnedsättning [13]. Hörselnedsättningen hos dessa patienter står för cirka 1 procent av den hereditära hörselnedsättningen, och hälften av de drabbade utvecklar progressiv hörselskada [14].

Orsaken till hörselnedsättningen hos dessa patienter är mutationer i typ IV-kollagen gener, som resulterar i defekter i basilmembranet. Typ IV-kollagen är en nödvändig komponent i basilmembranet och innehåller sex genetiskt olika α -kedjor ($\alpha 1$ - $\alpha 6$), som tillsammans bildar tre olika trippelhelixkomplex.

En histopatologisk studie av humana temporalbenspreparat från patienter med Alports syndrom visade på basilmembransdefekter i Cortis organ och stria vascularis [15], men den bakomliggande orsaken till hörselnedsättningen hos dessa patienter är fortfarande oklar. Ungefär 85 procent av alla patienter med Alports syndrom har könsbunden arvsång (X-bunden) med mutationer i COL4A5-genen som kodar för $\alpha 5$ -kedjan i typ IV-kollagen [16]. Resterande Alportfall är autosomt nedärvda med mutationer i COL4A3 eller COL4A4 [17].

Ushers syndrom är en autosomt recessivt nedärvd sjukdom som karakteriseras av hörselnedsättning eller dövhet och progressiv synnedsättning på grund av retinitis pigmentosa. Ushers syndrom står för mer än halva andelen av vuxna patienter som är både döva och blinda. Man har urskilat tre olika kliniska varianter, USH1, USH2 och USH3, och dessutom flera subtyper. Hittills har 11 genlokus för Ushers syndrom kartlagts.

Den allvarligaste kliniska varianten är USH1, och en av dess subtyper, USH1B, står för 60 procent av alla USH1-fall. USH1B orsakas av en mutation i genen som kodar för proteinet myosin VIIa, som framför allt finns i hårcellerna i koklea, det retinala pigmentepitelet och i fotoreceptorceller [18].

Den lindrigaste och vanligaste subtypen av Ushers syndrom är USH2A, som finns hos 57 procent av patienter med Ushers syndrom. USH2A-genen kodar för usherin, ett nyupptäckt protein som uppvisar likheter med proteingruppen laminer, som delvis bygger upp kärnhöljet i celler. Usherin uttrycks framför allt i basalmembranet i koklea och retina, men dess funktion är ännu oklar.

Genetisk screening

Genetisk screening av sjukdomsalstrande gener kan förutsäga framtida uppkomst och utveckling av hörselnedsättning och även bidra till tidig diagnos av annan organ dysfunktion kopplad till respektive gen. Den kan även effektivisera och underlätta planering av behandlingsstrategier.

Det stora antalet möjliga genmutationer vid genetiskt betingad hörselnedsättning innebär dock en stor utmaning vid

»Genterapi är en aktuell och lovande metod för att bota dövhet, framför allt om dövheten är genetiskt orsakad.«

»För att den genterapeutiska behandlingen ska lyckas måste den aktuella genen identifieras, isoleras och på ett säkert sätt föras in i målcellerna.«

genetisk screening. De flesta test av genmutationer finns tillgängliga endast på forskningsnivå, och endast ett fåtal (GJB2, SLC26A4 och EYA1) finns tillgängliga i klinisk rutinverksamhet. Fler tillförlitliga test för identifiering av mutationer är helt nödvändigt för framtida genetisk terapi.

Behandling

I utvecklade postindustriella länder satsar man intensiva resurser på barn med symtomgivande och kommunikationsstörande hörselnedsättning i form av olika habiliteringsprogram, som alltid innehåller pedagogiska insatser. För barn med måttlig till svår hörselnedsättning är hörapparatförstärkning mycket viktigt.

För barn med mycket svår hörselnedsättning eller total dövhet består insatserna av teckenspråksinlärning och kokleaimplantat. Kokleaimplantat är dock för kostsamt för att erbjuda alla barn, framför allt i utvecklingsländer och länder med dålig offentligt finansierad sjukvård. Dessutom kan kostnader för batteribyten och postoperativ träning utgöra en ekonomisk belastning för familjerna. Fungerande spiralganglieneuron och hörselnerv är dessutom en förutsättning för lyckat kokleaimplantat; den ljudkvalitet implantatet kan ge beror på antalet fungerande nervtrådar.

Det finns därför ett stort behov av ytterligare behandlingsmöjligheter för gravt hörselskadade och döva och framför allt för dem med defekt hörselnerv. I teorin är genterapi en ypperlig metod att bota dövhet hos barn. Det krävs dock en oerhört komplicerad teknik, även om själva behandlingen kommer att genomföras med ett relativt enkelt ingrepp, och det krävs mer forskning och utveckling för att den på allvar ska kunna tas i kliniskt bruk.

Administrationssätt och val av vektor

För att den genterapeutiska behandlingen ska lyckas måste den aktuella genen identifieras, isoleras och på ett säkert sätt föras in i målcellerna. Själva transfektion av genen till cellerna sker med hjälp av vektorer.

Icke-viral vektor är en enkel, säker och immunologiskt okomplicerad metod för genöverföring, som dock har nackdelen av att vara relativt ineffektiv och dessutom svår att styra till rätt celler. I detta avsnitt kommer vi därför att fokusera på viral vektor som metod för distribution av genen. Man använder sig av virusets förmåga att ta sig in i cellen och införliva sin arvs massa i värdcellens genom.

Olika distributionsmetoder har prövats för tillförsel till det perifera hörselorganet, såsom lokal applikation till runda fönstret, kokleotomi, vestibulär approach och administration i cerebrospinalvätskan. I ett kliniskt perspektiv låter runda fönster-approachen mest tilltalande, och det finns rapporter som talar för att det går att introducera en »reportergen« via runda fönstret. Mekanismen bakom permeabiliteten är fortfarande oklar, eftersom de flesta vektorer på grund av storleken har svårt att passera runda fönstret. Möjligen kan orsaken vara att man använt en »gel-foam« med adenoviral vektor och att denna har ändrat permeabiliteten på membranet [19].

Kokleotomi innebär att ett litet hål skapas i basala vindlingen av koklean, där man sedan kan introducera vektorn [20]. Denna metod skulle kunna användas vid behandling av döva

patienter, där man inte riskerar att skada hårceller. Övriga administrationssätt, t ex till det vestibulära systemet eller till cerebrospinalvätskan, skulle antagligen innebära alltför stora risker för komplikationer som svår yrsel, encefalit eller annan infektion.

En stor fördel med de virala vektorerna är deras storlek. Adenovirus är ett virus med en diameter på cirka 70 nm som in vitro kan fås i höga koncentrationer (10^{10} – 10^{11} viruspartiklar/ml). Adenovirus kan effektivt infektera både de celler som delar sig och de som inte delar sig. Dock begränsar värdens immunsystem möjligheterna till att använda adenovirus i framtida klinisk genterapi, eftersom de flesta människor har exponerats för adenovirus och därför utvecklat antikroppar mot olika serotyper.

Det är känt att 90 procent av de injicerade viruspartiklarna bryts ner inom 24 timmar [21], vilket gör adenovirus till ett olämpligt alternativ för genterapi. Adenoassocierat virusvektor (AAV) är ett virus som ger latent infektion av humana celler. AAV infekterar både de celler som delar sig och de som inte delar sig och kan bibehålla en lång tids expression av en terapeutisk gen. AAV har framgångsrikt använts i kliniska fas 1-studier för sjukdomar som cystisk fibros och hemofili B. Dessutom har man visat att AAV kan transfektera spiralganglieneuron och stria vascularis i djurmodeller [22]. AAV är således en lämplig vektor för genterapi av innerörat.

Användning av lentivirus som vektor har studerats ingående, och man har visat att lentivirus kan transfektera inneröreceller och infoga en terapeutisk gen i värdcellens genom och därigenom säkra en långvarig genexpression. Således är även lentivirus en potentiell vektor vid genterapi av innerörat.

Genterapi vid Alports syndrom

Alports syndrom är en sjukdom som skulle lämpa sig väl att börja behandla med genterapi. Som vi angivit ovan är majoriteten av alla fall med Alports syndrom ett resultat av en mutation av $\alpha 5(IV)$ -kollagenen. Kollagen är essentiellt för att bibehålla kokleans normala struktur och funktion. Användning av lentivirusvektor- $\alpha 5$ -gen för att införa icke-muterade kopior av $\alpha 5$ -genen till kokleära celler skulle ge normala mängder kollagen IV-protein i koklean. Teoretiskt ska det räcka med att endast vissa typer av kokleära celler tranfekteras av vektorn för att upprätta kokleans normala struktur och funktion.

Genetisk screening har gjort det möjligt att diagnostisera barn med Alports syndrom vid tidigare ålder än förr. För genterapi är detta extremt viktigt, eftersom tidig diagnos av Alports syndrom gör det möjligt att starta behandlingen innan en betydande andel av hårceller, spiralganglieneuron och andra drabbade celler har skadats.

Spontana eller transgena djurmodeller med Alports syndrom [23, 24] är utmärkta modeller för att studera och förstå patogenesen och därigenom kunna utveckla nya behandlingstekniker vidare för människor. En $\alpha 3(IV)$ -gen-knockoutmusmodell för den autosomalt recessiva varianten av Alports syndrom har utvecklats [25]. Den viktigaste patologin för dessa möss är förtjockning av de striala kapillära basalmembranen [26].

I en studie [27] har man visat att flera av de matrixmetalloproteinaser (MMP) som är involverade i matrixproteiners omsättning är dysfunktionella i stria vascularis hos Alport-musen. Administration av MMP-inhibitorer till Alport-musen förvärrar förtjockningen av de striala kapillära basalmembranen.

Som ett initialt test för principen med genterapi av Alports

»Själva transfektionen av genen till cellerna sker med hjälp av vektorer.«

syndrom lyckades Heikkila och medarbetare [28] introducera $\alpha 5$ -genen till en grisljure och fann ökad expression och inkorporering av $\alpha 5(IV)$ -kedjeproteinet i det glomerulära basalmembranet. Vidare har en färsk studie visat att introduktion av $\alpha 5$ -genen till glatt muskulatur återskapade in vivo-expressionen av typ IV-kollagen $\alpha 5$ - och $\alpha 6$ -kedjor hos en kaninmodell för Alports syndrom [29].

Dessa lovande resultat visar att det är rimligt att anta att introduktion av $\alpha 5$ -genen till innerörat kan bli en utmärkt behandlingsmetod för hörselnedsättning hos patienter med Alports syndrom. Valet av lentiviral framför adenoviral vektor beror på att den lentivirala vektorn lätt introducerar den valda genen till värdcellen och att genen sedan permanent uttrycks i innerörat. Dessutom är världens immunologiska svar mindre för lentivirusvektorer än för adenovirala vektorer.

Genterapi vid Ushers syndrom

Ushers syndrom typ 1 är en kombination av kraftig hörselnedsättning, progressiv retinitis pigmentosa och vestibulär funktionsnedsättning. USH1 är den allvarligaste kliniska varianten, och subtypen USH1B står för 60 procent av alla USH1-fall. USH1B orsakas av mutation i MYO7A-genen som kodar för myosin VII-proteinet. Om bristen på myosin VII-protein kompenseras vid tidig ålder, skulle man möjligen kunna lindra eller bota USH1B.

Nyligen visade Boeda och medarbetare [30] i flera varianter av transgena möss att MYO7A uttrycktes i alla kokleära inre hårceller, i de yttre hårcellerna, i kokleas apex och i de vestibulära hårcellerna. Dessa fynd visar att man genom att använda en lentiviral vektor kan introducera MYO7A-genen till hårceller och att man därigenom kan få en produktion av myosin VII.

Fortsatta djurstudier är dock nödvändiga innan genterapiförsök kan initieras för behandling av USH1B hos människa. Den tydliga korrelationen mellan genotyp och fenotyp har även observerats hos andra USH1-subtyper; USH2A är den vanligaste formen av Ushers syndrom. Man har identifierat den ansvariga USH2A-genen och den vanligaste muterade allelen.

Genterapi vid GJB2-relaterad hörselnedsättning

Mutationer av GJB2-genen står för hälften av alla fall med icke-syndromal sensorineural hörselnedsättning i västvärlden. Kodsekvenserna för GJB2 består av 681 baspar som kodar för gap junction-proteinet connexin 26. Man känner i dag till mutationer i flera olika alleler. De nödvändiga koncentrationerna av connexin 26 för att bibehålla normal kokleär funktion är ännu inte kända.

En färsk studie visar att man med hjälp av GJB2-specifikt kort dubbelsträngat RNA (siRNA) kan hämma uttrycket av en dominant, negativ GJB2allel in vitro och in vivo utan sidoeffekter på endogent vildtyps-GJB2-uttryck. Baserat på dessa resultat föreslår författarna att det möjligen går att rädda hörseln hos en fenotyp med hörselnedsättning med allelspecifikt RNA-interferens (RNAi) som riktas mot muterade GJB2-alleler.

Jero och medarbetare [19] fann att GFP-reportergenuttryck-

et detekterades efter administration av liposombunden plasmid till runda fönstret, vilket indikerar att denna administrationsmetod av genetiskt material till koklea fungerar väl.

Således verkar det som om en kombination av RNA-interfereringsteknik och genterapi är ett gynnsamt behandlingsalternativ, åtminstone för vissa former av dominant genetisk hörselnedsättning. Framtida experiment på den villkorliga GJB2-knockoutmusen är nödvändiga för bättre förståelse av patofysiologin i innerörat och utveckling av nya behandlingsalternativ som inkluderar, men inte begränsas till, genterapi.

Genterapi kombinerat med stamcellsimplantation

Genterapi med stamceller är en potentiell behandlingsmetod för genetiskt orsakad grav hörselnedsättning, framför allt vid degeneration av hårceller och spiralganglieneuron. Hårceller och stödjeceller har sitt ursprung från samma typ av progenitorceller [31]. Man har sett att flera transkriptionsfaktorer spelar roll för inneröreutvecklingen, såsom bl a mouse atonal homolog 1 (Math1), Hath1, Hes1, Hes5, Jagged2 och Pou4f3. Math1-knockoutmöss producerar inte hårceller [32]. Intressant är att ett överuttryck av Math1 och Hath1 leder till ökat antal hårceller.

Zheng och Gao [33] visade först in vitro att överuttryck av Math1 ledde till ektopiska hårceller i koklea hos råttor. Dessa resultat har stor betydelse för inneröreforskningen, eftersom de indikerar att det är möjligt att inducera proliferation och regenerering av hårceller med hjälp av gen-»knockin«-teknik. Det skulle kunna utföras genom att man använder »knockin« av Math1-genen till stamceller, som sedan implanteras till koklea, där de kan differentiera till hårceller. Tekniken behöver självfallet förfinas för att undvika ektopisk eller excessiv produktion.

Gener som Hes1 och Hes5 är negativa regulatorer av Math1. Hes1^{+/-}-möss har signifikant ökat antal inre hårceller, medan Hes5^{+/-}-möss har signifikant ökat antal yttre hårceller, vilket påvisar deras olika roller som regulatorer. I koklean hos P27^{kip1}-knockoutmöss finns det övertaligt med inre och yttre hårceller, men P27^{kip1} kontrollerar även antalet stödjeceller, vilket tyder på att genen har en roll i proliferation [34]. Pou4f3-knockoutmöss uppvisar utebliven mognad av hårceller i sen embryonal utveckling.

Alla ovanstående fynd är intressanta ur en framtida terapeutisk aspekt, eftersom de tillhandahåller en bas för utveckling av stamcellsterapi. En möjlig behandlingsstrategi skulle vara att in vitro använda knockin-teknik för att införliva transkriptionsfaktorer (t ex gener som Math1, Hath1, Hes1, Hes5, Jagged2 och Pou4f3) och tillväxtfaktorer till stamceller. Därefter transplanteras dessa genmodifierade stamceller till koklean in vivo, där de sedan kan differentiera till hårceller och spiralganglieneuron och följaktligen bota sensorineural hörselnedsättning genom att imitera den viktiga tidiga utvecklingen av innerörat. Dessutom har man visat att vissa transkriptionsfaktorer som Math1 och Hath1 omvandlar stödjeceller till hårceller.

En viktig fråga som måste studeras vidare är hur man kan behandla degeneration av spiralganglieneuron, som vi vet inträff-

TABELL I. Exempel på sjukdomar som potentiellt skulle kunna åtgärdas med genterapi.

Typ av hörselskada	Gen/protein	Funktion
Alports syndrom (X-bundet)	COL4A5/myosin VIIa	Komponent i basilmembranet i Cortis organ
Ushers syndrom 1B (USH1B)	MYO7A/ α -kedjan av typ IV-kollagen	Komponent i hårcellernas stereocilier; molekyllär motor
DFNB1	GJB2/connexin 26	Jonhomeostas, framför allt av kaliumjoner

»Genterapi som behandlingsmetod vid hörselnedsättning är fortfarande en ung teknik, som dock verkar lovande och som är värd att utveckla och förfina.«

far sekundärt till primär hårcellsskada. Det har visats att stamceller kan differentiera till neuron när man via viral vektor låter transfektera neurala stamceller med neurogenin 2 (ngn2) in vitro, och sedan transplanterar cellerna till koklea [35].

Ytterligare ett intressant fynd är att adulta stamceller kan migrera i retrograd riktning från injektionsstället till den vestibulokokleära nerven [20]. Det finns även nya resultat som visar på möjligheten att injicera stamceller direkt till den vestibulokokleära nerven. Det finns därför god möjlighet att modifierade stamceller transfekterade med proneuronala gener, som främjar stamceller att differentiera till spiralganglieneuron, kommer att bli en bra behandlingsteknik för att reversera degenerationen av spiralganglieneuron och därigenom återställa hörseln.

Risker associerade med genterapi

Som vid de flesta nyintroducerade behandlingsmetoder måste man vara medveten om de risker som är associerade med behandlingen. Vid genterapi inkluderar dessa infektion/inflammation och immunologiska reaktioner då vektorn introduceras. Metoden ska också vara utformad så att man minimerar riskerna för att mellan- eller innerörat tillfogas permanenta skador då vektorn introduceras. Risken för malignitet som följd av förändrat DNA bör tas på stort allvar och har dokumenterats i flera djurstudier [36].

Fördelen med genterapi till innerörat är som tidigare nämnts att koklean är ett relativt isolerat system, vilket borde minimera riskerna för spridning av vektorn och underlätta styrning av koncentrationer. Man har visat att spridning av vektor från vestibulokokleära systemet till cerebrospinalväts-

ka är strikt volymbunden, och i en studie [37] såg man spridning vid introduktion av 25 µl viral vektor, men inte vid 5 µl. Den normala volymen vid introduktion av vektor till koklea överstiger sällan 1–2 µl, vilket gör spridning mindre sannolik. Dessutom sker eventuell spridning till stor del via aqueductus cochleae (kochleas kommunikation med cerebrospinalrummet), som är öppetstående i många försöksdjur, men som oftast är stängd hos människa. Detta skulle kunna innebära ytterligare en isolerande funktion hos människa.

Framtiden får visa hur vi ska minimera riskerna för komplikationer, där val av vektor är en komponent, men där det troligtvis finns många fler faktorer som bör beaktas.

Nytt och omvälvande – ytterligare omfattande forskning krävs

Genterapi som behandlingsmetod vid hörselnedsättning är fortfarande en ung teknik, som dock verkar lovande och som är värd att utveckla och förfina. Genetisk hörselnedsättning är självklart svårt att bota, men genterapi erbjuder en spännande möjlighet till behandling. Man bör initialt fokusera på användning av genterapi vid utvalda former av genetisk hörselnedsättning som Alports syndrom, Ushers syndrom och GJB2-mutation (Tabell I).

Den experimentella forskningen antyder att genterapi kan leda till någonting helt nytt och omvälvande, nämligen medicinsk behandling av genetisk hörselnedsättning. Ytterligare omfattande forskning är nödvändig, bl a måste ingående studier av eventuella risker genomföras, och uppläggningsen av framtida kliniska behandlingsprogram måste preciseras.

■ *Potentiella bindningar eller jävsförhållanden: Inga uppgivna.*

■ *Erik Borg, professor, överläkare, Regionsjukhuset i Örebro, Örebro Universitet, har lämnat synpunkter på manuset till författaren.*

Kommentera denna artikel på lakartidningen.se

REFERENSER

- Probst FJ, Fridell RA, Raphael Y, Saunders TL, Wang A, Liang Y, et al. Correction of deafness in shaker-2 mice by an unconventional myosin in a BAC transgene. *Science*. 1998; 280(5368):1444-7.
- Cryns K, Van Camp G. Deafness genes and their diagnostic applications. *Audiol Neurootol*. 2004;9(1): 2-22.
- Weil D, Blanchard S, Kaplan J, Guilford P, Gibson F, Walsh J, et al. Defective myosin VIIA gene responsible for Usher syndrome type 1B. *Nature*. 1995;374(6517):60-1.
- Van Camp G, Willems PJ, Smith RJ. Nonsyndromic hearing impairment: unparallelled heterogeneity. *Am J Hum Genet*. 1997;60(4): 758-64.
- Friedman TB, Schultz JM, Ben-Yosef T, Pryor SP, Lagziel A, Fisher RA, et al. Recent advances in the understanding of syndromic forms of hearing loss. *Ear Hear*. 2003;24(4):289-302.
- Gorlin RJ, Toriello HV, Cohen MM, editors. *Hereditary hearing loss and its syndromes*. Oxford Monographs on Medical Genetics. Vol 50. New York: Oxford University Press; 1995. p. 1-457.
- Gregory MC, Terreros DA, Barker DF, Fain PN, Denison JC, Atkin CL. Alport syndrome – clinical phenotypes, incidence, and pathology. *Contrib Nephrol*. 1996;117:1-28.
- Hasson T. Molecular motors: sensing a function for myosin-VIIa. *Curr Biol*. 1999;9(22):R838-41.
- Jero J, Tseng CJ, Mhatre AN, Lalwani AK. A surgical approach appropriate for targeted cochlear gene therapy in the mouse. *Hear Res*. 2001;151(1-2):106-14.
- Regala C, Duan M, Zou J, Salminen M, Olivius P. Xenografted fetal dorsal root ganglion, embryonic stem cell and adult neural stem cell survival following implantation into the adult vestibulocochlear nerve. *Exp Neurol*. 2005;193(2):326-33.
- Gardlik R, Palffy R, Hodosi J, Lukacs J, Turna J, Celec P. Vectors and delivery systems in gene therapy. *Med Sci Monit*. 2005;11(4):RA110-21.
- Li Duan M, Bordet T, Mezzina M, Kahn A, Ulfendahl M. Adenoviral and adeno-associated viral vector mediated gene transfer in guinea pig cochlea. *Neuroreport*. 2002;13: 1295-9.
- Cosgrove D, Meehan DT, Grunke-meyer JA, Kornak JM, Sayers R, Hunter WJ, et al. Collagen COL4A3 knockout: a mouse model for autosomal Alport syndrome. *Genes Dev*. 1996;10(23):2981-92.
- Heikkila P, Tibell A, Morita T, Chen Y, Wu G, Sado Y, et al. Adenovirus-mediated transfer of type IV collagen alpha5 chain cDNA into swine kidney in vivo: deposition of the protein into the glomerular basement membrane. *Gene Ther*. 2001; 8(11):882-90.
- Harvey SJ, Zheng K, Jefferson B, Moak P, Sado Y, Naito I, et al. Transfer of the alpha 5(IV) collagen chain gene to smooth muscle restores in vivo expression of the alpha 6(IV) collagen chain in a canine model of Alport syndrome. *Am J Pathol*. 2003;162(3):873-85.
- Boeda B, Weil D, Petit C. A specific promoter of the sensory cells of the inner ear defined by transgenesis. *Hum Mol Genet*. 2001;10(15):1581-9.
- Hawkins RD, Lovett M. The developmental genetics of auditory hair cells. *Hum Mol Genet*. 2004;13 Spec No 2:R289-96.
- Hu Z, Wei D, Johansson CB, Holmström N, Duan M, Frisén J, et al. Survival and neural differentiation of adult neural stem cells transplanted into the mature inner ear. *Exp Cell Res*. 2005;302(1):40-7.
- Modlich U, Kustikova OS, Schmidt M, Rudolph C, Meyer J, Li Z, et al. Leukemias following retroviral transfer of multidrug resistance 1 (MDR1) are driven by combinatorial insertional mutagenesis. *Blood*. 2005;105(11):4235-46.
- Stover T, Yagi M, Raphael Y. Transduction of the contralateral ear after adenovirus-mediated cochlear gene transfer. *Gene Ther*. 2000;7(5):377-83.