

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR NEUROLOGIE
DIREKTOR: PROF. DR. MED. RALF LINKER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

BIOMARKER SUPERVISED G-CSF (FILGRASTIM) RESPONSE IN ALS PATIENTS

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Siw Wollebæk Johannesen

2018

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR NEUROLOGIE
DIREKTOR: PROF. DR. MED. RALF LINKER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

BIOMARKER SUPERVISED G-CSF (FILGRASTIM) RESPONSE IN ALS PATIENTS

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Siw Wollebæk Johannesen

2018

Dekan:	Prof. Dr. Dr. med. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Ulrich Bogdahn
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Tobias Pukrop
Tag der mündlichen Prüfung:	12.04.2019

Die vorgelegte Dissertation wurde von Prof. Dr. med. Ulrich Bogdahn angeregt und von ihm in ihrer Ausarbeitung betreut.

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quellen gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den 26.11.2018

Siw Wollebæk Johannesen

Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis	4
II. Erläuternde Zusammenfassung der Originalarbeit	5
1. Einleitung und Fragestellung	5
2. Methoden	6
2.1 Patienten und Intervention	6
2.2 Kalkulationen und Statistik	7
3. Ergebnisse	8
3.1 Demographische Ergebnisse, Intervention und Sicherheit	8
3.2 Die Mobilisation von Stammzellen war mit der Überlebenszeit assoziiert	9
3.3 Initiale Zytokinspiegel waren mit der Überlebenszeit assoziiert	11
3.4 Die G-CSF-Behandlung beeinflusste fortlaufend die Zytokinspiegel	11
4. Diskussion	12
4.1 ALS ist eine neuroinflammatorische Erkrankung	12
4.2 G-CSF bei ALS	13
4.3 G-CSF-Behandlung war sicher und wurde gut toleriert	13
4.4 Die Stammzellenmobilisation war mit einer längeren Überlebenszeit assoziiert	13
4.5 G-CSF beeinflusste Zytokinspiegel, die mit der Überlebenszeit assoziiert waren	14
4.6 Limitierung, Schlussfolgerung und Ausblick	18
III. Literaturverzeichnis	20
IV. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	24
V. Originalarbeit	26
Manuscript	27
Supplement material	42
VI. Danksagung	49
VII. Lebenslauf	50

I. Abkürzungsverzeichnis

ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
ALSFRS-R	ALS functional rating scale revised
AUC	Area under the curve (Fläche unter der Kurve)
bFGF	Basic Fibroblast growth factor
CCR5	C-C-Motiv-Chemokin-Rezeptor 5
CRP	C-reaktives Protein
Eotaxin-1	(CCL11)
Eotaxin-3	(CCL26)
FDR	False Discovery Rate (Falscherkennungsrate)
Flt-1	Fms-like tyrosine kinase-1
G-CSF	Granulocyte-colony stimulating factor
HSPC	Hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
IL	Interleukin
INF-gamma	Interferon gamma
IP-10	Interferon gamma induced protein (CXCL10)
MCP-1	Monocyte chemotactic protein 1 (CCL2)
MCP-4	Monocyte chemotactic protein 4 (CCL13)
MDC	Macrophage-derived chemokine (CCL22)
MIP1-beta	Macrophage inflammatory protein 1-beta (CCL4)
PIGF	Placenta growth factor
SAA	Serum amyloid A protein
(S)AE	(Serious) adverse event
SD	Standardabweichung
TARC	Thymusaktivitätsregulierendes Chemokin (CCL17)
Tie-2	Tyrosinkinase-2
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor alpha
TNF-beta	Tumornekrosefaktor beta (LTA, lymphotoxin-alpha)
Treg	Regulatorische T-Zellen
VCAM	Vascular adhesion molecule-1
VEGF	Vascular endothelial growth factor
ZNS	Zentralnervensystem

II. Erläuternde Zusammenfassung der Originalarbeit

1. Einleitung und Fragestellung

Die amyotrophe Lateralsklerose (ALS) ist eine klinisch und ätiopathogenetisch heterogene neurodegenerative Erkrankung, die durch den gemeinsamen Untergang der ersten und zweiten Motoneuronen des Zentralnervensystems gekennzeichnet ist¹. Mit einer Inzidenz von 2 bis 3 pro 100.000¹ und einem lebenslänglichen Erkrankungsrisiko von etwa 1 : 400² ist ALS die häufigste Motoneuronenerkrankung im Erwachsenenalter. Die mediane Überlebenszeit beträgt ab Symptomanifestation 29.8 Monate und ab Diagnosestellung 15.8 Monate³. In Deutschland ist lediglich Riluzol als krankheitsverzögernde Therapie zugelassen, das eine begrenzte Verlängerung der mittleren Überlebenszeit von 2 bis 3 Monaten bewirkt⁴. Die Krankheitsätiologie ist heterogen und die Degeneration der Motoneuronen entsteht durch unterschiedliche Pathomechanismen, einschließlich der Neuroinflammation¹. Die Neuroinflammation kann als Reaktion auf degenerative Prozesse mit Änderungen der ZNS-Homöostase, Proteinakkumulation und Zelltod auftreten. Sie kann aber auch eine initiale, die Neurodegeneration befördernde und aufrechterhaltende Rolle einnehmen¹. Zytokine vermitteln in einer komplexen Interaktion von ZNS-eigenen und peripheren Immunzellen und lenken die Immunantwort hin zu einer eher pro- oder anti-inflammatorischen Ausrichtung⁵.

Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) ist ein 20-kDa großes Glykoprotein, das zur Mobilisation von hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen (HSPC) führt und seit vielen Jahren für den klinischen Einsatz mit einem guten Sicherheitsprofil zugelassen ist⁶⁻⁸. Zudem beeinflusst G-CSF Zytokinnetzwerke und moduliert anti-inflammatorische Effekte^{8,9}. Ferner besitzt G-CSF weitere nicht-hämatologische Wirkungen, die bei neurodegenerativen Erkrankungen wie ALS von Relevanz sein könnten¹⁰. G-CSF ist ein neuraler Wachstumsfaktor, der die Blut-Hirn-Schranke durchqueren kann und dessen Rezeptoren im ZNS weit exprimiert sind¹¹. G-CSF hat neuroprotektive und -regenerative Eigenschaften, u.a. durch anti-apoptotische Effekte^{11,12}, indem es die neurale Differenzierung induziert, die Neurogenese stützt und die Arteriogenese fördert^{11,13}. Zudem werden direkte zelluläre Effekte durch mobilisierte hämatopoetische Stammzellen diskutiert, da diese ins ZNS migrieren^{14,15} und dort eine trophische Unterstützung und eine Modulation des lokalen Immunsystems bewirken können^{15,16}. Im ALS-Tiermodell führt die G-CSF-Behandlung zu einer Verbesserung der motorischen Funktion und des Überlebens der Tiere¹⁷⁻¹⁹. Kleinere Studien bei ALS-Patienten konnten bereits eine gute Verträglichkeit und hohe Sicherheit²⁰⁻²³ von G-CSF, sowie die Modulation immunologischer Parameter zeigen²⁴.

Ausgehend von den Erkenntnissen zur Wirkung von G-CSF und seinem möglichen Einfluss auf die Krankheitsentwicklung von ALS¹⁰, insbesondere auf die Immunmodulation, den Einfluss auf hämatopoetische und neuronale Stammzellen und die lokale trophische Wirkung im ZNS, sowie unter Berücksichtigung des aktuellen Stands der Therapie von ALS und der unweigerlich infausten Prognose entschieden wir uns, 36 ALS-Patienten mit G-CSF in Rahmen von individuellen experimentalen Therapieversuchen zu behandeln. Die aktuelle Arbeit umfasst retrospektive Analysen dieser individuellen Therapieversuche mit dem Ziel, die Patientensicherheit und die Medikamententoleranz bei ALS zu beleuchten.

Bisher fehlen für ALS validierte diagnostische, prognostische und therapeutische Biomarker²⁵. Aufgrund der ätiologischen und klinischen Komplexität von ALS ist allerdings nicht anzunehmen, dass ein einzelner Biomarker einen adäquaten Hinweis auf den weiteren klinischen Verlauf und eine therapeutische Wirksamkeit liefern kann. Deshalb erfolgte eine retrospektive Auswertung von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen sowie Angiogenese-markern; zudem wurden HSPC erfasst. Die Analyse peripherer Zytokine ermöglicht es, relevante immunologische Veränderungen zu untersuchen. Die Erfassung von G-CSF-Effekten auf Differenzierung und Mobilisation von HSPC kann ggf. Rückschlüsse auf die G-CSF-Wirkung auf neuronale Stammzellen im Sinne eines Stellvertreters bei individuellen Patienten ermöglichen und Hinweise auf direkte und indirekte Wirkungen von mobilisierten HSPC liefern.

2. Methoden

2.1 Patienten und Intervention

36 ALS-Patienten wurden von Januar 2010 bis März 2017 individuelle experimentale Therapieversuche mit G-CSF angeboten. Die Einwilligungen zu den individuellen Therapieversuchen und zu den retrospektiven Auswertungen der erhobenen Daten wurden schriftlich eingeholt. Die Patientendaten wurden in pseudonymisierter Form erfasst. Die retrospektive Auswertung wurde von der Ethikkommission der Universität genehmigt.

Die ambulant betreuten ALS-Patienten erhielten subkutane Injektionen mit G-CSF, wobei die Dosierungen und Applikationsmodi individuell unterschiedlich waren und im Verlauf weiter angepasst wurden. Daraus resultierten heterogene Behandlungsschemata (Abbildung 1 im Kapitel IV). Im Rahmen der klinischen Routine erfolgten ein- bis zweimal monatlich Patientenvorstellungen mit klinischer Untersuchung, routinemäßiger Erhebung der klinischen Progression mittels des etablierten ALSFRS-R²⁶, sowie einer Überprüfung des Blutbildes, des Differentialblutbildes, von Blutaussstrichen und von der Knochenmarkfunktion

(periphere hämatologische Stammzellen). Blutbild und Differentialblutbild wurden mit einem automatischen Zellzähler (Sysmex[®], Kobe, Japan) analysiert. Periphere Blutausstriche wurden alle 3 Monate mit einem Lichtmikroskop erfasst. Mittels Flow Cytometry wurden monatlich CD34⁺ und CD34⁺CD38⁻ HSPC analysiert, wie die Gruppe bereits in einer Arbeit beschrieben hat²². Zusätzlich wurden ein- bis zweimal monatlich Rückstellproben aus dem Patientenserum bei -20°C eingefroren. Aus Sicherheitsgründen erfolgten sonographische Milzdarstellungen vor Behandlungsbeginn und nach den Dosiserhöhungen.

Vor dem Hintergrund sicherheitsrelevanter Fragestellungen wurde nach erfolgter Behandlung von 36 Patienten entschieden, retrospektiv Zytokinanalysen aus den Rückstellproben zu veranlassen. Diese Rückstellproben waren zweimal monatlich bei Patienten eingefroren worden, die G-CSF über fünf aufeinanderfolgende Tage erhielten, und zwar vor (Tag 0) und nach (Tag 7) der Behandlung. Bei Patienten, die G-CSF zweimal wöchentlich oder jeden zweiten Tag applizierten, wurden die Rückstellproben einmal monatlich, am Tag nach der Verabreichung, abgenommen. Dies ermöglichte eine retrospektive Erfassung von Zytokinen vor Behandlungsbeginn, nach 3 und 6 Monaten unter laufender G-CSF-Behandlung mittels multiplex electrochemoluminescence mit dem Panel-Test V-PLEX Human Biomarker 40-Plex Kit (MesoScale Discovery[®], Maryland, USA). Die Tests, für die jeweils 25µl Serum verwendet wurden, erfolgten in Duplikaten und entsprechend der Herstellerinformation.

2.2 Kalkulationen und Statistik

Für die Analysen der Immunparameter wurden die Ergebnisse von drei Zeitpunkten herangezogen: vor Behandlungsbeginn, sowie nach je 3 und 6 Monaten während der Behandlung. Da die Patienten nicht immer zum exakt vorgesehenen Zeitpunkt erschienen wurden die Zeitpunkte als Zeitperioden definiert. Bei der Erhebung des ALSFRS-R vor dem Behandlungsbeginn wurde der Tag des Behandlungsbeginns +/- 28 Tage herangezogen. Für die Messungen von Laborwerten vor dem Behandlungsbeginn wurden Proben herangezogen, die vor der ersten G-CSF-Gabe erhoben worden waren. Der Zeitpunkt 3 Monate definierte die Tage 45 bis 134, der Zeitpunkt 6 Monate die Tage 135 bis 224.

Der unmittelbare Effekt von G-CSF auf Zytokine, HSPC und das Blutbild wurde aus einem Vergleich der Werte zwei Tage vor und einem Tag nach einer fünftägigen G-CSF-Behandlung erfasst. Anschließend fand eine Analyse der unterschiedlichen Immunantworten in Abhängigkeit von der Überlebenszeit statt. Die Überlebenszeit wurde als Zeit zwischen der Diagnosestellung und dem Tod durch ALS-bedingte Komplikationen (einschließlich Suizid)

erfasst, im Falle einer Zensurierung bis zum letzten Besuch. Hierfür wurden die Patienten anhand der Überlebenszeit bis 30 Monate in zwei ähnlich große Gruppe geteilt. Patienten, die zum Ende der Datenerhebung noch lebten und bereits über 30 Monate observiert worden waren (n=7) gehörten der Gruppe „lange Überlebende“ an. Diejenigen, deren Observationszeitraum kürzer war, wurden für diese Auswertung nicht berücksichtigt (n=3). Derselbe Vorgang wurde für Korrelationsanalysen angewandt. Anschließend wurden in beiden Gruppen retrospektiv Zytokine, HSPC sowie das Blutbild vor Behandlungsbeginn analysiert und mit der Überlebenszeit korreliert.

Für die statistischen Analysen und die Erstellung der Graphiken wurden R oder GraphPad Prism 7 verwendet. Korrelationen wurden durch zweiseitige Pearson Korrelation ermittelt und mit dem Korrelationskoeffizienten (r), Bestimmtheitsmaß (R^2) und p-Wert beschrieben. Vergleiche wurden mit Hilfe des Mann-Whitney Tests und des gepaarten Wilcoxon Tests gezogen. Ergebnisse mit p-Werten ≤ 0.05 wurden als signifikant gewertet, solche mit p-Werten ≤ 0.1 als Trend. Eine Korrektur für den Vergleich mit mehrfachen Testungen erfolgte mit dem False Discovery Rate Ansatz (FDR, two-stage step-up Methode von Benjamin, Krieger und Yekutieli, der verlangte FDR (Q) war 10%). Als evident betrachtet wurden korrigierte Vergleiche bei einem FDR-angepassten p-Wert (q) < 0.1 . Die Mobilisation von HSPC nach fortdauernder Gabe von G-CSF wurde durch die Ermittlung der Fläche unter der Kurve (AUC) geschätzt. Messungen von Stammzellen vor und nach den G-CSF-Gaben waren bei Patienten möglich, die mit fünftägiger G-CSF-Applikation behandelt worden waren. Um Vergleiche bei Patienten mit langem und kurzem Überleben zu ermöglichen wurden solche Patienten ausgewählt, die über die ersten 4 Monate hinweg mit anhaltender fünftägiger G-CSF-Applikation behandelt worden waren. Die AUC wurde mit der *auc* Funktion „flux“ in R (Jurasinski, Koebisch, Guenther und Beetz, 2014) berechnet. Als Schwelle für die Berechnung wurde der Wert vor Behandlungsbeginn verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Demographische Ergebnisse, Intervention und Sicherheit

36 ALS-Patienten (25 männlich, 11 weiblich, 28 spinaler und 8 bulbärer Krankheitsmanifestation, mittleres Alter 51.9 Jahre, mittlerer ALSFRS-R bei Beginn 38/48) wurden zusätzlich zur Riluzol-Standardtherapie mit G-CSF behandelt. Die individuellen Therapieversuche ergaben sehr heterogene Behandlungsschemata. Die Dosierungen und Applikationsmodi waren individuell unterschiedlich und wurden fortlaufend angepasst (Abbildung 1 im Kapitel IV und Supplement Table S1). G-CSF wurde subkutan in einem Dosisbereich von 90

bis 2160 Mio. IE/Monat und mit einer mittleren Dosis von 464 Mio. IE/Monat verabreicht. Die Applikationsmodi waren individuell angepasst und variierten von einmal wöchentlich bis durchgehend jeden zweiten Tag. Die mediane Behandlungsdauer lag bei 13.7 Monaten (mittlere Dauer 16.7 Monate, Spannweite 2.7 bis 73.8 Monate) (Table 1, Figure 1).

Die lange anhaltenden und ambulant verabreichten Behandlungen mit G-CSF wurden von den ALS-Patienten generell gut vertragen; auch die Compliance war sehr gut. Milde bis moderate Knochenschmerzen und Leukozytose nach der Gabe von G-CSF wurden häufig festgestellt. Ein Patient gab nach 39 Monaten Behandlung eine einmalige Episode mit Wärmegefühl, Benommenheit und einer 15-minütigen Dyspnoe an einem Tag der G-CSF-Applikation an. Aufgrund einer möglichen Medikamentenintoleranz oder einer leichten allergischen Reaktion wurde die Behandlung mit G-CSF beendet. Antikörper gegen G-CSF waren nicht nachweisbar. Erwartungsgemäß kam es bei den meisten Patienten unter anhaltender G-CSF-Behandlung zu einer leichten bis moderaten Splenomegalie. Eine asymptotische Vergrößerung der mittleren Milzbreite von 4.3 auf 4.9 cm und der -länge von 10.7 auf 12.1 cm wurde beobachtet. In den Blutaussstrichen konnte keine pre-maligne Transformation detektiert werden und schwere unerwünschte Ereignisse traten nicht auf.

Vor dem Behandlungsbeginn waren die Routineblutwerte der Patienten unauffällig. Die G-CSF-Gaben führten zu einer Mobilisation von neutrophilen Leukozyten sowie von CD34⁺ und CD34⁺CD38⁻ HSPC vom Knochenmark ins Blut. Die Leukozytenzahl stieg bei allen Patienten signifikant an von einem mittleren Wert bei $6.9 \times 10^3/\mu\text{l}$ vor Behandlungsbeginn auf $48.2 \times 10^3/\mu\text{l}$ (Spannweite $8.3\text{-}118.7 \times 10^3/\mu\text{l}$, $p < .0001$) nach der Verabreichung von G-CSF. Die erwartete Erhöhung von Neutrophilen (von 64.8 bis 87.3 %, $p < .0001$) war von einer relativen Abnahme der Lymphozyten (von 24.1 bis 7.0 %, $p < .0001$), der Monozyten (von 8.8 bis 4.7 %, $p < .0001$) und der Eosinophilen (von 1.8 bis 0.7 %, $p < .0001$), sowie von einer leichten Abnahme der Erythrozyten (von 5.03 bis $4.83 \times 10^3/\mu\text{l}$, $p < .0001$), des Hämoglobins (von 14.9 bis 14.4 g/dl, $p < .0001$) und des Hämatokrits (von 44.2 bis 43.6, $p = .0362$) begleitet (alle Vergleiche mittels gepaartem t-Test, zweiseitiger p-Wert. Supplement Figure S1). Während der Behandlung wurden keine signifikanten Veränderungen der basophilen Granulozyten und Thrombozyten festgestellt.

3.2 Die Mobilisation von Stammzellen war mit der Überlebenszeit assoziiert

Von den 36 mit G-CSF-behandelten ALS-Patienten verstarben 26 zwischen Januar 2010 und März 2017. Der Patient, der eine mögliche allergische Reaktion gezeigt hatte, wurde regelmäßig ambulant betreut. Drei Patienten beendeten die G-CSF-Behandlung an den

Tagen 82, 420 und 427 und wurden nicht mehr betreut. Die mediane Gesamtüberlebenszeit (ab dem Zeitpunkt der Diagnosestellung) aller *verstorbenen* Patienten lag bei 24.2 Monaten (mittlere 25.5; Spannweite 3.9 bis 56.6 Monate). Für die weitere Analyse wurden die Patienten anhand ihrer Überlebenszeit (kürzer oder länger als 30 Monate) in zwei ähnlich große Gruppen aufgeteilt. Noch lebende Patienten wurden für diese Analyse eingeschlossen, wenn sie länger als 30 Monate beobachtet wurden. Die mittlere (mediane) Überlebenszeit unterschied sich in beiden Gruppen: 46.59 (39.55) Monate, SD 16.34 v.s. 17.04 (18.30) Monate, SD 8.16 (Mann-Whitney t-Test, zweiseitiger p-Wert < .0001). Der Abfall der ALSFRS-R über Zeit verlief signifikant flacher in der Gruppe mit der längeren Überlebenszeit (Wilcoxon Test, p = .00086; Figure 2). Länger überlebende Patienten waren jünger (mittleres Alter 46.8 vs. 56.6 Jahre, ungepaarter t-Test p = .0163) und hatten eine längere Latenz zwischen der Diagnosestellung und dem Behandlungsbeginn (mittlere Latenz 333 vs. 163 Tage, ungepaarter t-Test p = .0377). Der klinische Funktionsstatus war in beiden Gruppen jedoch nicht signifikant unterschiedlich (mittlerer ALSFRS-R 38.6/ vs. 37.3/48). Zudem waren lange überlebende Patienten seltener weiblich (18.8% vs. 47.1%), boten aber ähnlich häufig eine bulbäre Symptomatik bei der Diagnosestellung (18.8% vs. 17.6%) (Table 1).

G-CSF mobilisiert HSPC ins Blut. Im Serum wurden CD34⁺ und CD34⁺CD38⁻ HSPC bei Behandlungsbeginn sowie nach 3 und nach 6 Monaten jeweils zwei Tage vor (Tag 0) und einen Tag nach (Tag 7) einer fünftägigen G-CSF-Behandlung gemessen. Zu allen Zeitpunkten erhöhte G-CSF CD34⁺ und CD34⁺CD38⁻ HSPC (Figure 3). Der Vergleich der CD34⁺ und CD34⁺CD38⁻ HSPC nach G-CSF-Gabe zu den drei Zeitpunkten ergab keine signifikante Reduktion der Mobilisation der HSPC bei Patienten, die mit einer fünftägigen G-CSF-Applikation behandelt worden waren (Mittelwert der CD34⁺/ml bei Behandlungsbeginn 30307, bei 3 Monaten 35250, bei 6 Monaten 22017; Mittelwert der CD34⁺CD38⁻/ml bei Behandlungsbeginn 3092, bei 3 Monaten 2089, bei 6 Monaten 1632, durchgehend gepaarter Wilcoxon t-Test, alle p-Werte nicht signifikant. Supplement Figure S2). Bei der Betrachtung von HSPC im Serum von Patienten mit Überlebenszeit länger oder kürzer als 30 Monate zeigte sich jedoch eine unterschiedliche Mobilisationsfähigkeit. Dies wurde durch Ermittlung der Fläche unter der Kurve (AUC) der mobilisierten CD34⁺CD38⁻ HSPC innerhalb des ersten Jahres mit G-CSF-Behandlung von 19 Patienten, die alle durchgehend fünftägige G-CSF-Applikationen erhielten, analysiert. Länger überlebende Patienten zeigten nach einem Jahr Behandlung eine signifikant höhere Mobilisation von CD34⁺CD38⁻ HSPC während der

G-CSF-Applikation. Nach 4 Monaten der Behandlung entsprach dieser Unterschied einem statistischen Trend (Figure 4).

3.3 Initiale Zytokinspiegel waren mit der Überlebenszeit assoziiert

Der Serumspiegel vor Behandlungsbeginn des Zytokins TNF-beta korrelierte negativ mit der Überlebenszeit. Die Zytokine MCP-1 und INF-gamma waren, als statistische Trends, auch negativ mit der Überlebenszeit korreliert. Der IL-16 Serumspiegel vor Behandlungsbeginn war positiv mit der Überlebenszeit korreliert. MDC, IL-8, IL-17A und PIGF waren, als statistische Trends, auch positiv mit der Überlebenszeit korreliert (Table 2, Figure 5). Anschließend wurden Patienten anhand ihrer Überlebenszeit (kürzer oder länger als 30 Monate) dichotomisiert und die Serumspiegel der Zytokine beider Gruppen vor Behandlungsbeginn verglichen. Länger überlebende Patienten hatten initial signifikant höhere Spiegel von MDC und Tie-2; IL-16, IL-17A und PIGF zeigten ähnliche Trends. Andererseits hatten kürzer überlebende Patienten initial signifikant höhere Spiegel von TNF-beta und IL-7, während TNF-alpha und MCP-1 ähnliche Trends zeigten. Allerdings blieben nach der Korrektur für mehrfache Testungen der Zytokinvergleiche beider Überlebensgruppen keine dieser Ergebnisse signifikant (angegeben mit FDR-adjustierten p-Werten (q-Werten) in Table 2).

3.4 Die G-CSF-Behandlung beeinflusste fortlaufend die Zytokinspiegel

Die unmittelbaren Effekte von G-CSF auf die Zytokinspiegel wurden bestimmt, indem diese zwei Tage vor und einen Tag nach der G-CSF-Applikation zu drei Zeitpunkten der andauernden Behandlung (bei Behandlungsbeginn, 3 und 6 Monate) verglichen wurden. Bedingt durch die unterschiedlichen Applikationsmodi waren die entsprechenden Blutproben für 18 Patienten bei Behandlungsbeginn, 17 Patienten zum Zeitpunkt 3 Monate und 14 Patienten bei 6 Monaten der G-CSF-Behandlung verfügbar.

G-CSF hatte einen unmittelbaren Effekt auf die Spiegel mehrerer Zytokine (Table 3, Supplement Figure S3). Nach der G-CSF-Gabe zu den Zeitpunkten Behandlungsbeginn, 3 und 6 Monate stieg der Serumspiegel von IL-10 signifikant an (bei 3 Monaten allerdings nur als Trend). Die Spiegel von IL-16, Tie-2, TNF-alpha, MIP1-beta, IP-10, VCAM, ICAM-1 und Flt-1 stiegen nach der Verabreichung von G-CSF zu den oben genannten Zeitpunkten signifikant an; dagegen sanken die Spiegel von TARC, IL-7, INF-gamma und MCP-1 signifikant ab. SAA, IL-12/IL-23p40, CRP und VEGF-A stiegen nach der G-CSF-Gabe bei Behandlungsbeginn und 6 Monaten an (VEGF-A allerdings bei 6 Monaten nur als Trend). Die Spiegel von VEGF-C und PIGF stiegen nach der G-CSF-Applikation bei 6 Monaten, von

PIGF auch bei 3 Monaten als Trend. Bei Behandlungsbeginn und 3 Monaten kam es nach der G-CSF-Gabe zur Reduktion von Eotaxin-1, Eotaxin-3 und VEGF-D. Zum Zeitpunkt Behandlungsbeginn sanken die TNF-beta-Spiegel nach der Gabe von G-CSF ab, bei 6 Monaten nur als Trend. MCP-4 wurde bei 6 Monaten und bei Behandlungsbeginn reduziert, aber nur als Trend. Der Spiegel von bFGF sank nach G-CSF-Gabe bei 3 und 6 Monaten ab.

4. Diskussion

Die lange anhaltenden und individuell adaptierten Therapieversuche mit G-CSF bei 36 ALS-Patienten waren sicher und wurden gut vertragen. Die Anzahl der G-CSF-mobilisierten HSPC war, anhand der AUC-Berechnung, mit einer längeren Überlebenszeit assoziiert. Vor Behandlungsbeginn gemessene Zytokinserumspiegel (wie MDC, TNF-beta, IL-7, IL-16 und Tie-2) waren signifikant mit der Überlebenszeit assoziiert. Dies weist auf einen möglichen prognostischen Einsatz dieser Zytokine bei G-CSF-behandelten ALS-Patienten hin. Die anhaltenden Gaben von G-CSF führten zu bleibenden Änderungen im Serumspiegel mehrerer Zytokine und die wiederholten Bestimmungen deckten facettenreiche Effekte von G-CSF auf.

4.1 ALS ist eine neuroinflammatorische Erkrankung

ALS ist eine multifaktorielle Erkrankung. Neurodegenerative Prozesse triggern Neuroinflammation und umgekehrt. Neuroinflammation mit mikroglialer Aktivierung, Infiltration peripherer Immunzellen ins ZNS und Änderungen der Zytokinpiegel sind pathologische Befunde bei ALS. Zytokine sind Mediatoren der immunologischen Kommunikation, die die Blut-Hirn-Schranke überqueren können und einen Mechanismus darstellen, über den das periphere Immunsystem einen direkten Einfluss auf das ZNS ausüben kann²⁷. In einer aktuellen Studie haben wir gezeigt, dass eine pro-inflammatorische Immunantwort mit erhöhten inflammatorischen Zytokinen sowohl im Serum während der Erkrankung, als auch post-mortem im ZNS der ALS-Patienten vorhanden ist²⁸. Die Immunantwort kann bei ALS jedoch nicht einfach in einen pro- und anti-inflammatorischen Zustand geteilt werden, da die Zytokine oft pleiotrop sind und deren Funktion sich sowohl über Zeit als auch abhängig von Konzentration und vom spezifischen Krankheitskontext unterscheidet. Es ist denkbar, dass die Zytokinantwort der frühen ALS-Erkrankung versucht, die homöostatische Balance wiederherzustellen, während die lang anhaltende Exposition von pro-inflammatorischen Zytokinen zu Zelldestruktion und zum Verlust der neuronalen Funktion führen kann. Letzterer unterstützt einen sich selbsterhaltenden inflammatorischen Prozess und wahrscheinlich eine Zunahme der Krankheitsprogression⁵. Neuroinflammation und systemische inflammatorische

Stimuli mit deren ZNS-Effekten stellen Ziele für therapeutische Interventionen in ALS dar²⁹. Analysen von peripherem Blut sind wenig invasive und wiederholt machbare Alternativen für eine Beurteilung von immunmedierten und pathophysiologisch relevanten Parametern²⁵.

4.2 G-CSF bei ALS

Bei ALS kann die Modulation von Neuroinflammation und -degeneration für Patienten von Vorteil sein. Obwohl G-CSF ein etablierter, gut tolerierter und sicherer Wachstumsfaktor für die Mobilisation von HSPC ist³⁰ häufen sich die Hinweise darauf, dass G-CSF auch ein potenter Modulator mehrerer für ALS relevanter ZNS-Funktionen ist¹⁰. G-CSF moduliert die Immunantwort³¹, fördert anti-inflammatorische und senkt pro-inflammatorische Mediatoren³². Kleine G-CSF-Studien bei ALS-Patienten haben inkonklusive Resultate erbracht. Eine G-CSF-Behandlung von ALS-Patienten war mit einer Abnahme von pro-inflammatorischen Zytokinen in Serum und Liquor assoziiert²⁴ und kleinere Vorteile wurden mittels Neuroimaging beobachtet²³. Die vielversprechende Wirksamkeit von G-CSF, die sich in Tiermodellen der ALS-Erkrankung zeigte, konnte jedoch nicht bei Patienten umgesetzt werden. Anscheinend benötigt eine gelungene klinische Überführung eine höhere Dosis, häufigere Applikationen sowie eine längere Behandlungs- und Observationszeit³³. Letztere ist von hoher Wichtigkeit, wenn das Ziel eine strukturelle und funktionelle Verbesserung oder eine Unterstützung von Neurogenese ist.

4.3 Die G-CSF-Behandlung war sicher und wurde gut toleriert

Bei onkologischen Erkrankungen sind G-CSF-Gaben normalerweise auf Behandlungszyklen begrenzt. Klinische Erfahrungen mit lebenslanger G-CSF-Behandlung stammen von Patienten, die an schwerer angeborener Neutropenie und zyklischer Neutropenie leiden^{34,35}. Die anhaltenden G-CSF-Gaben wurden von den ALS-Patienten gut toleriert. Kleinere unerwünschte Ereignisse waren milde bis moderate Knochenschmerzen sowie Leukozytose. Eine Aussage zur Wirksamkeit, wie etwa bezüglich der Überlebenszeit, war nicht das Ziel dieser Analysen der individuellen Therapieversuche und aufgrund des Fehlens einer Kontrollgruppe nicht möglich. Die Betrachtung der mittleren Überlebenszeit der 26 *verstorbenen* Patienten bei 25.5 Monaten (ab Diagnosestellung) deutete jedoch darauf hin, dass kein Schaden durch G-CSF verursacht wurde.

4.4 Die Stammzellenmobilisation war mit einer längeren Überlebenszeit assoziiert

G-CSF ist ein zur Mobilisation von HSPC gut bekannter Faktor^{6,7}. Bei allen Patienten, die mit fünftägigen Applikation behandelt wurden, führte G-CSF zu einer Erhöhung der HSPC-Mobilisation im Blut. Interessanterweise zeigte sich eine Assoziation zwischen der Stammzellmobilisation und der Überlebenszeit. Patienten, die länger als 30 Monate überlebten, mobilisierten innerhalb des ersten Jahres mehr CD34⁺CD38⁻ HSPC als Patienten mit einer kürzeren Überlebenszeit (Figure 4). Bei Menschen sind höhere Spiegel an zirkulierenden HSPC nach einer intrazerebralen Blutung mit einem besseren klinischen Befund und weniger strukturellen Schäden assoziiert³⁶. Unklar ist jedoch, nach welchem Mechanismus HSPC in neurodegenerativen Erkrankungen wirken können. Eine Migration von Knochenmarkzellen ins ZNS und anschließender neuronaler Transdifferenzierung wird kontrovers diskutiert¹⁶. G-CSF erhöht die Zahl von HSPC, die ins geschädigte ZNS wandern^{14,15}. Es ist möglich, dass die HSPC mit ortsansässigen Zellen interagieren, das Immunsystem modulieren, neurotrophe Faktoren produzieren, und das Wachstum sowie das Überleben von neuronalen Progenitorzellen fördern^{15,16}. Eine jüngst publizierte Arbeit beleuchtet einen interessanten Zusammenhang zwischen dem Rückenmark und dem ZNS. Anhand eines Mausmodells mit Hirnbestrahlung zeigen Dietrich et al., dass G-CSF die Neurogenese augmentiert. G-CSF-mobilisierte Zellen aus dem Knochenmark migrieren ins ZNS, wo diese dann einen Makrophagen- und Mikroglia-Phänotyp exprimieren. Die Autoren stellten eine klinische Verbesserung nach G-CSF-Behandlung fest und argumentieren für eine neuroprotektive Wirkung von G-CSF durch direkte Effekte auf ZNS-Zellen sowie auf die Modulation der zellulären Umgebung der neurovaskulären Nische¹³. Studien an Menschen haben gezeigt, dass G-CSF einen direkten Einfluss auf Monozyten hat und die Zytokinproduktion von Monozyten in die Richtung einer anti-inflammatorischen Polarisation lenken kann³⁷. Zudem beschrieb eine neuere Studie über G-CSF-Gaben an gesunden Menschen die Expansion eines reifen Monozyten-Subtyps, das starke immunsuppressive Eigenschaften hat³⁸. Neuronale Zellen und deren Stammzellen exprimieren G-CSF-Rezeptoren und eine G-CSF-Behandlung führt zu einem neuronalen Phänotyp dieser Stammzellen¹¹. Daher scheint es denkbar, dass Effekte von G-CSF auf HSPC auch als ein Proxy für eine biologische, zelluläre Aktivität von G-CSF auf neuronale Zellen dienen können.

4.5 G-CSF beeinflusste Zytokinspiegel, die mit der Überlebenszeit assoziiert waren

Neuroinflammation trägt zur Pathogenese von ALS bei¹. Neben der Inflammation im ZNS sind periphere Zytokine und andere inflammatorische Marker bei ALS verändert und

Zytokinspiegel können als Biomarker eingesetzt werden³⁹. Diese Arbeit zeigt, dass die vor dem Behandlungsbeginn gemessenen Zytokinspiegel mit der Überlebenszeit korrelierten (Table 2, Figure 5) und in den beiden Überlebensgruppen verschieden waren (Table 2). Fünftägige Behandlungszyklen mit G-CSF führten zu unmittelbaren Veränderungen mehrerer Zytokinspiegel und konnten der schädlichen Immunantwort bei ALS teils entgegenwirken (Table 3, Supplement Figure S3).

Die initialen Spiegel von 11 Zytokinen waren mit der Überlebenszeit assoziiert und 8 von ihnen wurden durch die Behandlung mit G-CSF beeinflusst. Allerdings, wie die etwas niedrigen R^2 -Werte zeigten, konnten die Korrelationsmodelle nur einen kleinen Teil der Varianz erklären. Obwohl die Zytokinvergleiche bei Patienten mit längerem und kürzerem Überleben der Korrektur für mehrfaches Testen nicht standhalten konnten, wurden die Daten weiter exploriert, da sie bei einer späteren Hypothesenerstellung hilfreich und trotz der kleinen Anzahl untersuchter Patienten biologisch relevante Befunde zeigen könnten. Zudem veränderte G-CSF mehrere Zytokine, die bei Inflammation, Angiogenese und vaskulären Schäden involviert sind, und die alle nach Korrekturen für mehrfache Testungen evident blieben (Tables 2 und 3).

Der Spiegel von TNF-beta vor Behandlungsbeginn korrelierte negativ mit der Überlebenszeit und war höher bei Patienten mit einer kürzeren Überlebenszeit. Die G-CSF-Applikation führte zu einer Reduktion von TNF-beta, ein pro-inflammatorisches Zytokin und Zelltodanreger, der im ALS-Serum erhöht ist²⁸. Eine TNF-alpha-Erhöhung bei Patienten mit kürzerem Überleben zeigte sich lediglich als statistischer Trend. G-CSF führte zu einer Erhöhung dieses Spiegels. TNF-alpha ist bei ALS erhöht^{28,39-42} und korreliert mit der Krankheitsdauer⁴³. Unklar ist jedoch seine Rolle bei der Erkrankung und die beiden TNF-alpha-Rezeptoren, entweder mit Inflammation oder Neuroprotektion assoziiert, haben bezüglich des Überlebens bei ALS entgegengesetzte Effekte⁴⁴. Eine Aktivierung kann, je nach Subtyp und Kontext zu Neuroprotektion und Neurogenese⁴⁵, Reduktion von oxidativem Stress⁴⁶ und glutamaterger Exzitotoxizität⁴⁷ führen. Eine Häufigkeitszunahme von ALS nach Langzeitgabe von TNF-alpha Inhibitoren bei rheumatischer Arthritis wurde auf eine verminderte TNF-alpha mediierte Neuroprotektion zurückgeführt⁴⁸. Höhere IL-7 Spiegel vor dem Behandlungsbeginn waren mit einer kürzeren Überlebenszeit assoziiert und wurden nach der Gabe von G-CSF reduziert. Das pro-inflammatorische Zytokin IL-7 ist sowohl im Liquor⁴⁹ als auch im Serum²⁸ von ALS-Patienten erhöht. Eine negative Korrelation zwischen dem initialen MCP-1 Spiegel und der Überlebenszeit ergab sich als statistischer Trend. Eine Reduktion von MCP-1 nach der Gabe von G-CSF²⁴ konnte aktuell bestätigt werden. MCP-1 ist ein

prominentes pro-inflammatorisches Zytokin, das die mikrogliale Rekrutierung im ZNS nach einer Verletzung erhöht und die ALS-Erkrankung vorantreiben kann⁵⁰. Es korreliert mit einer schnelleren Krankheitsprogression⁵¹ und ALS-Patienten zeigen sowohl erhöhte Serumspiegel^{28,51,52} als auch eine Zunahme der Proteinexpression im Rückenmark²⁸. Als weiterer statistischer Trend zeigte sich eine negative Korrelation zwischen dem initialen INF-gamma-Spiegel und der Überlebenszeit. Die Applikation von G-CSF führte zu einer Abnahme des INF-gamma Spiegels. Dies ist bereits bei gesunden Menschen bekannt⁵³. Es wird angenommen, dass INF-gamma, ein Kennzeichen von pro-inflammatorischen Zellen, einen relevanten Beitrag zum Untergang von Motoneuronen bei ALS leistet⁵⁴. ALS-Patienten haben erhöhte Serumspiegel von INF-gamma^{43,51,55}, die mit der Krankheitsprogression^{43,55} und einem kürzeren Überleben korrelieren⁵¹.

Das pro-inflammatorische Zytokin IL-16 korrelierte positiv mit der Überlebenszeit und erhöhte sich nach der Verabreichung von G-CSF. IL-16 erfüllt auch eine immunmodulatorische Rolle und führt zur Expansion von regulatorischen T-Zellen (Treg)⁵⁶. Tregs sind bei ALS erniedrigt und dies ist mit einer schnellen Krankheitsprogression und einem kürzeren Überleben assoziiert⁵⁷. Daher kann die G-CSF-bedingte Erhöhung von IL-16 vorteilhaft sein. Ein anderes pro-inflammatorisches Zytokin, IL-17A, korrelierte als statistischer Trend positiv mit der Überlebenszeit, wurde aber durch die Gabe von G-CSF nicht verändert. IL-17A ist sowohl im Serum^{51,58,59} als auch im Liquor⁶⁰ von ALS-Patienten erhöht. Chió et al. stellten nach der Verabreichung von G-CSF eine Reduktion von IL-17A im Liquor, aber nicht im Serum von ALS-Patienten fest²⁴. IL-8 korrelierte als statistischer Trend zwar mit der Überlebenszeit, wurde aber durch G-CSF-Gaben nicht beeinflusst. IL-8 wird von vielen Zellen als Antwort auf Inflammation produziert, und höhere Plasma-⁴⁰ und Liquorspiegel⁶¹ sind bei ALS bekannt. MDC war mit einer längeren Überlebenszeit assoziiert, wurde von G-CSF jedoch nicht moduliert. MDC ist ein anti-inflammatorisches Zytokin, dessen Expression im Rückenmark, passend zu einem vermeintlich schützenden Effekt, bei ALS-Patienten reduziert ist²⁸. Darüber hinaus waren Marker von Angiogenese, wie Tie-2 und PIGF, mit der Überlebenszeit assoziiert. Initiale Tie-2-Spiegel waren bei länger überlebenden Patienten erhöht und nahmen nach den G-CSF-Gaben weiter zu. Die Angiogenese wird durch das Angiopoietin-1/Tie-2 System mediiert⁶². Die Stimulation der Angiogenese durch einen anderen Pro-Angiogenesefaktor, VEGF, führt zur Zunahme von Neurogenese⁶³. Die G-CSF-Behandlung ging mit einer Zunahme von PIGF einher. PIGF korrelierte als statistischer Trend mit der Überlebenszeit und war bei Patienten mit einer längeren Überlebenszeit erhöht. PIGF stützt die Angiogenese⁶⁴ und kann ein Marker für die angiogene Nische sein.

Die Spiegel der folgenden 18 Zytokine wurden durch die Verabreichung von G-CSF signifikant verändert, waren aber nicht mit der Überlebenszeit assoziiert. Wie Untersuchungen bei gesunden Menschen gezeigt haben⁶⁵ führte G-CSF zu einer deutlichen Erhöhung von IL-10. Dieses anti-inflammatorische Zytokin ist bei ALS-Patienten mit einer milden Symptomatik oder langsamen Progression erhöht⁴⁹. Die G-CSF-Applikation ging mit einer Reduktion der Spiegel der pro-inflammatorischen Zytokinen MCP-4, TARC, Eotaxin-1 und Eotaxin-3 einher. MCP-4^{28,61}, TARC²⁸ und Eotaxin-1⁶¹ sind im ALS-Serum erhöht. Eotaxin-1 ist zudem mit Alzheimerdemenz⁶⁶, Alterung und Hemmung der Neurogenese bei Mäusen⁶⁷ assoziiert. Außerdem konnte eine Zunahme der pro-inflammatorischen Zytokine CRP, SAA, IP-10, IL-15, IL-12/IL-23p40 und MIP1-beta nach der Applikation von G-CSF festgehalten werden. Die Akute-Phase-Proteine CRP und SAA sind bei ALS-Patienten erhöht^{28,68}. IP-10 ist negativ mit der Krankheitsprogressionsrate korreliert⁶⁹; eine Erhöhung nach der Behandlung mit G-CSF ist bereits beschrieben worden²⁴. IL-15^{28,51,70} und MIP1-beta²⁸ sind im ALS-Serum erhöht. MIP1-beta teilt den Rezeptor (CCR5) mit MIP1-alpha und MIP1-alpha ist bei ALS erhöht und wird als neuroprotektiv betrachtet⁷¹. Da MIP1-beta negativ mit der Krankheitsschwere und der Progressionsrate korreliert, kann es bei ALS einen neuroprotektiven Effekt ausüben⁶⁹. IL-12/IL-23p40 beschreibt die p40 Subeinheit, die von den Zytokinen IL-12 und IL-23 geteilt wird und gilt als ein pro-inflammatorischer Marker. Dennoch beobachteten wir nach der Behandlung mit G-CSF keine Erhöhung von Zytokinen, die von IL-12/IL-23p40 induziert werden (z.B. INF-gamma oder IL-17A). Neben der Neuroinflammation ist eine Beeinträchtigung von neurotropher Unterstützung ein Kennzeichen von ALS. Die Spiegel von VEGF-A und Flt-1 waren nach der G-CSF-Gabe erhöht, die von VEGF-C, VEGF-D und bFGF waren reduziert. Die Spiegel von VEGF-A und bFGF, zwei gewöhnliche neurotrophe und ggf. neuroprotektive Faktoren bei ALS⁵¹, sind im ALS-Liquor erhöht⁶⁰. VEGF-A stützt die Neurogenese und die neurale Entwicklung; darüber hinaus lockt VEGF-A HSPCs an und ist mit einem längeren Überleben bei ALS assoziiert⁵¹. Nach der Behandlung mit G-CSF stellten wir zudem eine Erhöhung von ICAM-1 und VCAM-1 fest. Die Rolle dieser zellulären Adhäsionsmoleküle, die am Leukozytentransport am vaskulären Endothelium beteiligt sind⁷², ist bei ALS jedoch noch nicht geklärt.

Für ALS gilt, dass eine nur kurze Zeitverzögerung bis hin zur Diagnosestellung mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist, da dies wahrscheinlich auf eine aggressivere Erkrankung hinweist⁷³. Passend hierzu stellten wir eine kürzere Latenz zwischen der Diagnosestellung und dem Behandlungsbeginn bei Patienten mit einer kürzeren Überlebensdauer fest; eine Tatsache, die möglicherweise auf eine schnellere Krankheitsprogression bei diesen

Patienten hinweist. Demzufolge ist es denkbar, dass der Behandlungsbeginn bei Patienten mit längerem Überleben zu einem späteren Zeitpunkt der individuellen pathophysiologischen Krankheitsentwicklung stattfand. Dies kann als Erklärung dafür dienen, dass einige pro-inflammatorische Zytokine wie z.B. IL-16, IL-17A und IL-8 mit einer längeren Überlebenszeit assoziiert waren. Dennoch ist die Rolle von inflammatorischen Markern bei ALS weiterhin unklar und unsere Ergebnisse können auch dafür ein Indiz sein, dass Inflammation nicht ausschließlich eine negative Auswirkung auf die Erkrankung ausübt⁶⁸. Die gezeigte Verbindung zwischen Zytokinen und der Überlebenszeit hebt aber die Möglichkeit dieser Marker in der individuellen prognostischen Einschätzung des Überlebens hervor. Demnach steht zur Diskussion, ob unterschiedliche Zytokine als Biomarker für eine initiale Patientenstratifikation, zur Prädiktion vom klinischen Verlauf sowie zur Beobachtung von Behandlungsansprechen und Krankheitsprogression herangezogen werden können.

Ein indirekter Mechanismus, mit dem G-CSF neuroprotektive Effekte bietet, kann durch eine Polarisierung des Immunsystems in Richtung eines eher anti-inflammatorischen Zustandes erfolgen¹⁰. Die vorliegende Arbeit beobachtete eine Erhöhung anti-inflammatorischer Zytokine und neurotropher Faktoren sowie eine Reduktion pro-inflammatorischer Zytokine. Allerdings wurde auch die Erhöhung einiger pro-inflammatorischer Zytokine festgehalten. Dies könnte auf die pleiotropen Effekte von G-CSF und möglicherweise auf eine unspezifische Zytokinreaktion nach der Verabreichung hinweisen. Insgesamt scheinen die Effekte von G-CSF auf die peripheren Zytokinspiegel und auf ALS vielseitig zu sein und sollten in einer prospektiven Studie erfasst werden.

4.6 Limitierung, Schlussfolgerung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit setzt sich mit der retrospektiven Analyse individueller und experimentaler Therapieversuche auseinander. Das Ziel dieser Therapieversuche war es, bei der unweigerlich infausten ALS-Diagnose eine möglicherweise vorteilhafte off-label Behandlung mit G-CSF zu ermöglichen. Um die Patientensicherheit zu gewährleisten, fanden während der individuellen Therapieversuche und im Rahmen der klinischen Routine regelmäßige ambulante Vorstellungen mit klinischen und laborchemischen Routineuntersuchungen statt. Nach erfolgter Behandlung der Patienten wurde beschlossen, zur weiteren Sicherheitsüberprüfung immunologische Aspekte aus eingefrorenen Rückstellproben zu erfassen. Dies ermöglichte eine dynamische Beobachtung von inflammatorischen Markern, die sich durch die G-CSF-Gaben sowie durch die ALS-Erkrankung selbst über Zeit veränderten. Dennoch sollte jeder Versuch, die geschilderten Befunde der lediglich 36 behan-

delten Patienten zu generalisieren, mit Vorsicht erfolgen. Die Interpretation der Zytokin-spiegel, die vor dem Behandlungsbeginn erfasst wurden muss berücksichtigen, dass sich die Patienten in kovarianten Faktoren wie Alter, Geschlecht, bulbärer vs. spinaler Krankheits-anfang und klinischem Status (ALSFRS-R) unterschieden. Zudem waren die individuellen G-CSF-Behandlungen mit unterschiedlichen Dosierungen und Applikationsmodi sehr heterogen. Da sich Zytokin-spiegel während der Krankheitsprogression ändern ist es auch relevant, dass die Kohorte eine große Heterogenität in der Latenz zwischen dem Zeitpunkt der Diagnose-stellung und dem Behandlungsbeginn zeigte. All diese Aspekte führen zu einer reduzierten statistischen Stärke, was auch eine Erklärung für die beobachtete Variation und moderate Korrelation zwischen Zytokinen und Überlebenszeit bieten kann. Trotz der kleinen Patienten-gruppe und der großen Krankheitsheterogenität wurden die Zytokinunterschiede zwischen den lange und kurz überlebenden Patienten beobachtet. Daher könnten sie, auch wenn sie der Korrektur für multiple Testungen nicht standhielten, von biologischer Relevanz sein und ggf. bei der Erstellung zukünftiger Hypothesen Hilfestellung leisten.

Die vorliegende Arbeit charakterisiert die klinische Antwort von ALS-Patienten unter lang anhaltender Verabreichung von G-CSF. Sie konnte zeigen, dass individuelle Therapie-versuche mit G-CSF sicher sind und von ALS-Patienten gut vertragen werden. G-CSF konnte HSPC ins Blut mobilisieren und eine höhere Menge mobilisierter Stammzellen war mit einer längeren Überlebenszeit assoziiert. Demzufolge könnte die Mobilisation von Stammzellen ein möglicher therapeutischer Biomarker für mit G-CSF-behandelte ALS-Patienten sein. Periphere Zytokine sind für den Krankheitsverlauf von ALS relevant. In dieser Arbeit wurden TNF-beta, MDC, IL-16, IL-7 und Tie-2 als Zytokine entdeckt, deren Serumspiegel vor Behandlungsbeginn Hinweise auf ein mögliches Ansprechen auf G-CSF und die Überlebens-zeit liefern könnten. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine lang andauernde Behandlung mit G-CSF zu bleibenden Zytokinveränderungen im Serum führt. Zytokine sind potenzielle Biomarker, die bei der prognostischen Einschätzung und bei der frühen Erfassung eines möglichen Behandlungseffektes von G-CSF bei ALS-Patienten eingesetzt werden könnten. Die hier vorgestellten Befunde sollten in einer prospektiven, randomisierten und kontrollierten Studie validiert werden.

III. Literaturverzeichnis

1. Hardiman, O. *et al.* Amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Rev. Dis. Primers* 3, 17071–19 (2017).
2. Alonso, A., Logroscino, G., Jick, S. S. & Hernán, M. A. Incidence and lifetime risk of motor neuron disease in the United Kingdom: a population-based study. *Eur. J. Neurol.* 16, 745–751 (2009).
3. Traxinger, K., Kelly, C., Johnson, B. A., Lyles, R. H. & Glass, J. D. Prognosis and epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: Analysis of a clinic population, 1997–2011. *Neurology: Clinical Practice* 3, 313–320 (2013).
4. Lacomblez, L., Bensimon, G., Leigh, P. N., Guillet, P. & Meininger, V. Dose-ranging study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. Amyotrophic Lateral Sclerosis/Riluzole Study Group II. *The Lancet* 347, 1425–1431 (1996).
5. Becher, B., Spath, S. & Goverman, J. Cytokine networks in neuroinflammation. *Nature Publishing Group* 17, 49–59 (2017).
6. Demetri, G. D. & Griffin, J. D. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood* 78, 2791–2808 (1991).
7. Welte, K. *et al.* Purification and biochemical characterization of human pluripotent hematopoietic colony-stimulating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 1526–1530 (1985).
8. Anderlini, P. Effects and safety of granulocyte colony-stimulating factor in healthy volunteers. *Curr. Opin. Hematol.* 16, 35–40 (2009).
9. Hartung, T. Anti-inflammatory effects of granulocyte colony-stimulating factor. *Curr. Opin. Hematol.* 5, 221–225 (1998).
10. Wallner, S. *et al.* The Granulocyte-colony stimulating factor has a dual role in neuronal and vascular plasticity. *Front. Cell Dev. Biol.* 3, 1–13 (2015).
11. Schneider, A. *et al.* The hematopoietic factor G-CSF is a neuronal ligand that counteracts programmed cell death and drives neurogenesis. *J. Clin. Invest.* 115, 2083–2098 (2005).
12. Henriques, A., Pitzer, C., Dupuis, L. & Schneider, A. G-CSF protects motoneurons against axotomy-induced apoptotic death in neonatal mice. *BMC Neurosci* 11, 25 (2010).
13. Dietrich, J. *et al.* Bone marrow drives central nervous system regeneration after radiation injury. *J. Clin. Invest.* 128, 281–293 (2018).
14. Koda, M. *et al.* Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) mobilizes bone marrow-derived cells into injured spinal cord and promotes functional recovery after compression-induced spinal cord injury in mice. *Brain Research* 1149, 223–231 (2007).
15. Xiao, B.-G., Lu, C.-Z. & Link, H. Cell biology and clinical promise of G-CSF: immunomodulation and neuroprotection. *J. Cell. Mol. Med.* 11, 1272–1290 (2007).
16. Schneider, A., Kuhn, H.-G. & Schäbitz, W.-R. A role for G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) in the central nervous system. *Cell Cycle* 4, 1753–1757 (2005).
17. Henriques, A. *et al.* CNS-targeted viral delivery of G-CSF in an animal model for ALS: improved efficacy and preservation of the neuromuscular unit. *Mol. Ther.* 19, 284–292 (2011).
18. Schneider, A. *et al.* Granulocyte-colony stimulating factor improves outcome in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 131, 3335–3347 (2008).
19. Pollari, E. *et al.* Granulocyte colony stimulating factor attenuates inflammation in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuroinflammation* 8, 74 (2011).
20. Zhang, Y. *et al.* Preliminary investigation of effect of granulocyte colony stimulating

- factor on amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler* 10, 430–431 (2009).
21. Nefussy, B. *et al.* Recombinant human granulocyte-colony stimulating factor administration for treating amyotrophic lateral sclerosis: A pilot study. *Amyotroph Lateral Scler* 11, 187–193 (2010).
 22. Grassinger, J. *et al.* Safety and feasibility of long term administration of recombinant human granulocyte-colony stimulating factor in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Cytokine* 67, 21–28 (2014).
 23. Duning, T. *et al.* G-CSF Prevents the Progression of Structural Disintegration of White Matter Tracts in Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Pilot Trial. *PLoS ONE* 6, e17770 (2011).
 24. Chiò, A. *et al.* Repeated courses of granulocyte colony-stimulating factor in amyotrophic lateral sclerosis: Clinical and biological results from a prospective multicenter study. *Muscle Nerve* 43, 189–195 (2011).
 25. Vu, L. T. & Bowser, R. Fluid-Based Biomarkers for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurotherapeutics* 1–16 (2017). doi:10.1007/s13311-016-0503-x
 26. Cedarbaum, J. M. *et al.* The ALSFRS-R: a revised ALS functional rating scale that incorporates assessments of respiratory function. *Journal of the Neurological Sciences* 169, 13–21 (1999).
 27. Banks, W. A. The blood-brain barrier in neuroimmunology: Tales of separation and assimilation. *Brain, Behavior, and Immunity* 44, 1–8 (2015).
 28. Peters, S. *et al.* The TGF- β System As a Potential Pathogenic Player in Disease Modulation of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front Neurol* 8, 181–20 (2017).
 29. Ransohoff, R. M. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science* 353, 777–783 (2016).
 30. Roberts, A. W. G-CSF: A key regulator of neutrophil production, but that's not all! *Growth Factors* 23, 33–41 (2005).
 31. Martins, A., Han, J. & Kim, S. O. The multifaceted effects of granulocyte colony-stimulating factor in immunomodulation and potential roles in intestinal immune homeostasis. *IUBMB Life* 62, 611–617 (2010).
 32. Hartung, T. *et al.* Effect of granulocyte colony-stimulating factor treatment on ex vivo blood cytokine response in human volunteers. *Blood* 85, 2482–2489 (1995).
 33. Henriques, A., Pitzer, C. & Schneider, A. Neurotrophic growth factors for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis: where do we stand? *Front Neurosci* 4, 32 (2010).
 34. Skokowa, J., Dale, D. C., Touw, I. P., Zeidler, C. & Welte, K. Severe congenital neutropenias. *Nat. Rev. Dis. Primers* 3, 17032 (2017).
 35. Dale, D. C. *et al.* Long-Term Effects of G-CSF Therapy in Cyclic Neutropenia. *N. Engl. J. Med.* 377, 2290–2292 (2017).
 36. Sobrino, T. *et al.* Cd34+progenitor cells likely are involved in the good functional recovery after intracerebral hemorrhage in humans. *J. Neurosci. Res.* 89, 979–985 (2011).
 37. Saito, M. *et al.* Granulocyte colony-stimulating factor directly affects human monocytes and modulates cytokine secretion. *Exp. Hematol.* 30, 1115–1123 (2002).
 38. D'Aveni, M. *et al.* G-CSF mobilizes CD34+ regulatory monocytes that inhibit graft-versus-host disease. *Sci Transl Med* 7, 281ra42–281ra42 (2015).
 39. Hu, Y. *et al.* Increased peripheral blood inflammatory cytokine levels in amyotrophic lateral sclerosis: a meta-analysis study. *Scientific Reports* 1–9 (2017). doi:10.1038/s41598-017-09097-1
 40. Lu, C.-H. *et al.* Systemic inflammatory response and neuromuscular involvement in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 3, e244–11 (2016).
 41. Poloni, M. *et al.* Circulating levels of tumour necrosis factor-alpha and its soluble

- receptors are increased in the blood of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci. Lett.* 287, 211–214 (2000).
42. Cereda, C. *et al.* TNF and sTNFR1/2 plasma levels in ALS patients. *Journal of Neuroimmunology* 194, 123–131 (2008).
 43. Babu, G. N. *et al.* Elevated Inflammatory Markers in a Group of Amyotrophic Lateral Sclerosis Patients from Northern India. *Neurochem. Res.* 33, 1145–1149 (2008).
 44. Tortarolo, M. *et al.* Review Article Amyotrophic Lateral Sclerosis, a Multisystem Pathology: Insights into the Role of TNF. *Mediators Inflamm.* 1–16 (2017). doi:10.1155/2017/2985051
 45. Figiel, I. Pro-inflammatory cytokine TNF-alpha as a neuroprotective agent in the brain. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 68, 526–534 (2008).
 46. Fischer, R. *et al.* A TNF Receptor 2 Selective Agonist Rescues Human Neurons from Oxidative Stress-Induced Cell Death. *PLoS ONE* 6, e27621–11 (2011).
 47. Dolga, A. M. *et al.* TNF- α mediates neuroprotection against glutamate-induced excitotoxicity via NF- κ B-dependent up-regulation of K Ca_{2.2} channels. *Journal of Neurochemistry* 1–10 (2008). doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05701.x
 48. Börjesson, A., Grundmark, B., Olaisson, H. & Waldenlind, L. Is there a link between amyotrophic lateral sclerosis and treatment with TNF-alpha inhibitors? *Ups. J. Med. Sci.* 118, 199–200 (2013).
 49. Furukawa, T. *et al.* CSF cytokine profile distinguishes multifocal motor neuropathy from progressive muscular atrophy. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2, e138–9 (2015).
 50. Henkel, J. S. *et al.* Presence of dendritic cells, MCP-1, and activated microglia/macrophages in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue. *Annals of Neurology* 55, 221–235 (2004).
 51. Guo, J., Yang, X., Gao, L. & Zang, D. Evaluating the levels of CSF and serum factors in ALS. *Brain Behav* 7, e00637–8 (2017).
 52. Baron, P. *et al.* Production of monocyte chemoattractant protein-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 32, 541–544 (2005).
 53. Rodríguez-Cortés, O. *et al.* Granulocyte colony-stimulating factor produces a decrease in IFN γ and increase in IL-4 when administered to healthy donors. *J Clin Apher* 25, 181–187 (2010).
 54. Aebischer, J. *et al.* IFN γ triggers a LIGHT-dependent selective death of motoneurons contributing to the non-cell-autonomous effects of mutant SOD1. *Cell Death Differ.* 18, 754–768 (2011).
 55. Liu, J., Gao, L. & Zang, D. Elevated Levels of IFN- γ in CSF and Serum of Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis. *PLoS ONE* 10, e0136937–11 (2015).
 56. McFadden, C. *et al.* Preferential migration of T regulatory cells induced by IL-16. *J. Immunol.* 179, 6439–6445 (2007).
 57. Henkel, J. S. *et al.* Regulatory T-lymphocytes mediate amyotrophic lateral sclerosis progression and survival. *EMBO Mol Med* 5, 64–79 (2013).
 58. Fiala, M. *et al.* IL-17A is increased in the serum and in spinal cord CD8 and mast cells of ALS patients. *Journal of Neuroinflammation* 7, 76 (2010).
 59. Rentzos, M. *et al.* Interleukin-17 and interleukin-23 are elevated in serum and cerebrospinal fluid of patients with ALS: a reflection of Th17 cells activation? *Acta Neurol. Scand.* 122, 425–429 (2010).
 60. Mitchell, R. M. *et al.* A CSF biomarker panel for identification of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 72, 14–19 (2009).
 61. Kuhle, J. *et al.* Increased levels of inflammatory chemokines in amyotrophic lateral sclerosis. *Eur. J. Neurol.* 16, 771–774 (2009).
 62. Zacharek, A. *et al.* Angiopoietin1/TIE2 and VEGF/FLK1 Induced by MSC Treatment

- Amplifies Angiogenesis and Vascular Stabilization after Stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 27, 1684–1691 (2007).
63. Schanzer, A. *et al.* Direct stimulation of adult neural stem cells in vitro and neurogenesis in vivo by vascular endothelial growth factor. *Brain Pathol.* 14, 237–248 (2004).
 64. Takahashi, H. & Shibuya, M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin. Sci.* 109, 227–241 (2005).
 65. Fidyk, W. *et al.* Evaluation of proinflammatory and immunosuppressive cytokines in blood and bone marrow of healthy hematopoietic stem cell donors. *Cytokine* (2017). doi:10.1016/j.cyto.2017.09.001
 66. Bettcher, B. M. *et al.* MCP-1 and eotaxin-1 selectively and negatively associate with memory in MCI and Alzheimer's disease dementia phenotypes. *Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring* 3, 91–97 (2016).
 67. Villeda, S. A. *et al.* The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature* 477, 90–94 (2011).
 68. Lunetta, C. *et al.* Serum C-Reactive Protein as a Prognostic Biomarker in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *JAMA Neurol* 74, 660–667 (2017).
 69. Tateishi, T. *et al.* CSF chemokine alterations related to the clinical course of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuroimmunology* 222, 76–81 (2010).
 70. Rentzos, M. *et al.* Interleukin-15 and interleukin-12 are elevated in serum and cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Eur. Neurol.* 63, 285–290 (2010).
 71. Yang, X., Gao, L., Wu, X., Zhang, Y. & Zang, D. Increased levels of MIP-1 α in CSF and serum of ALS. *Acta Neurol. Scand.* 134, 94–100 (2015).
 72. Haraldsen, G., Kvale, D., Lien, B., Farstad, I. N. & Brandtzaeg, P. Cytokine-regulated expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in human microvascular endothelial cells. *J. Immunol.* 156, 2558–2565 (1996).
 73. Chiò, A. *et al.* Prognostic factors in ALS: A critical review. *Amyotroph Lateral Scler* 10, 310–323 (2009).

IV. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

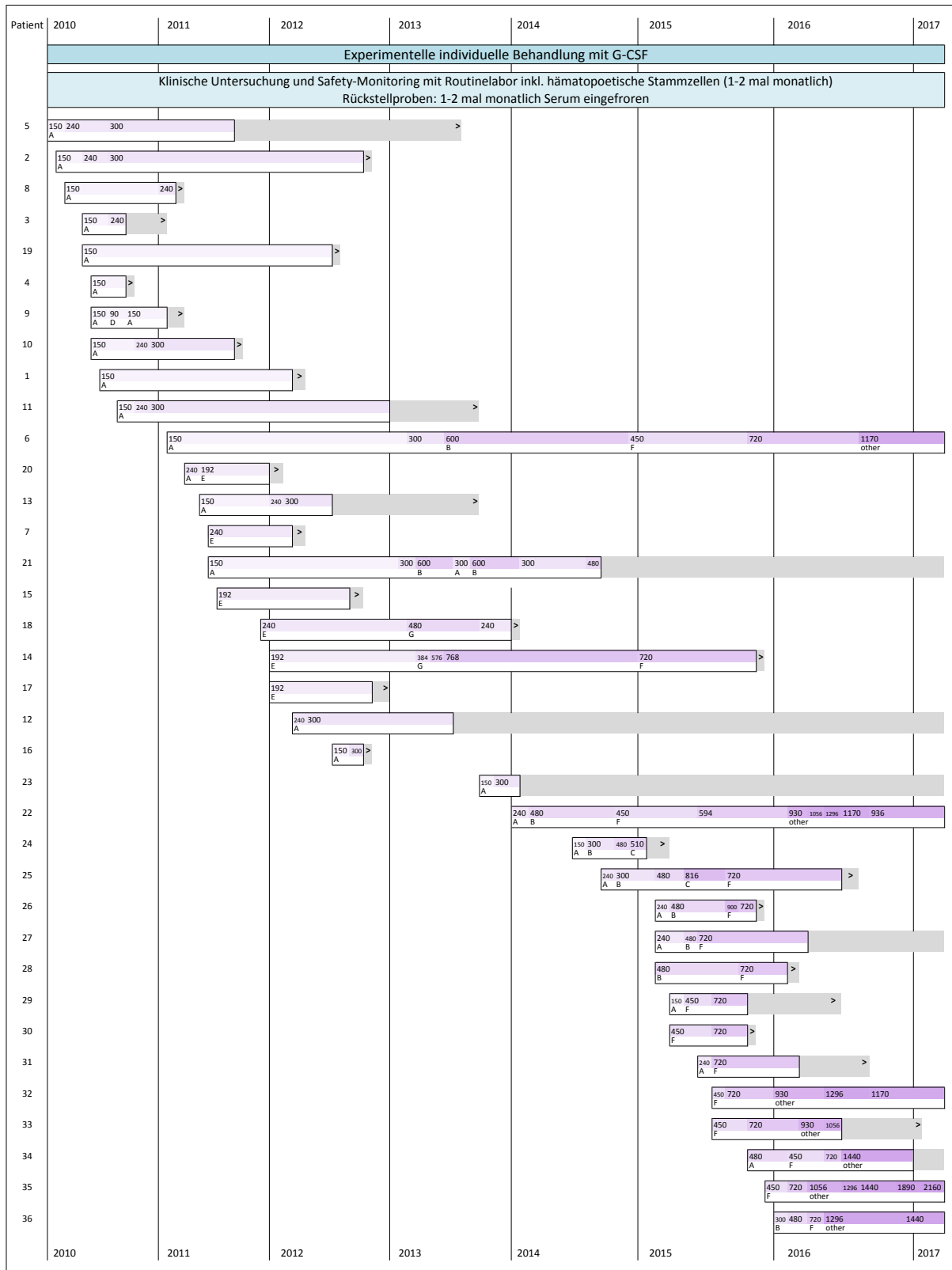


Abbildung 1: Darstellung der individuellen G-CSF-Gaben und des Safety-Monitorings.

Ein- bis zweimal monatlich erfolgten poliklinische Patientenuntersuchungen mit Erhebung von Blutbild, klinischer Chemie und hämatopoetischer Stammzellen aus dem Serum im Rahmen der klinischen Routine. Zudem wurden ein- bis zweimal monatlich Rückstellproben aus dem Serum eingefroren und nachträglich untersucht. Eine retrospektive Evaluation der erhobenen klinischen und laborchemischen Befunde fand ab März 2017 statt.

Eingerahmt ist die Länge der individuellen G-CSF-Gabe, die zwischen Jan. 2010 und März 2017 erfolgte. Die lila Balken geben die monatliche Dosis in Mio. IE wider, die zusätzlich durch die steigende Farbtintensität dargestellt wird.

Die unterschiedlichen Applikationsmodi sind mit Buchstaben zusammengefasst, G-CSF wurde entweder als gepulster, mehrtägiger Behandlung (A, B, C und D) oder an einzelnen Tagen durchgehend verabreicht (E, F, G und other):

„A“: G-CSF ein-/zweimal täglich über 5 aufeinanderfolgende Tage pro Monat;

„B“: wie in „A“ mit einmaliger Wiederholung;

„C“: wie in „B“ mit Gabe jeden 2. Tag zwischen den 5-Tagesgaben;

„D“: Gabe an 3 Tagen pro Monat;

„E“: Gabe ein-/zweimal täglich an einem Tag pro Woche;

„F“: Gabe jeden 2. Tag;

„G“ und „other“: andere Kombination von Gaben an einzelnen Tagen pro Woche.

Die grauen Balken zeigen das Überleben nach Abschluss der G-CSF-Gaben, „>“ gibt den Sterbezeitpunkt an.

Weitere Abbildungen und Tabellen sind in der Originalarbeit (Kapitel V) dargestellt.

V. Originalarbeit

Title

Biomarker Supervised G-CSF (Filgrastim) Response in ALS Patients

Authors

Siw Johannesen¹, Bettina Budeus², Sebastian Peters¹, Sabine Iberl³, Anne-Louise Meyer¹, Tina Kammermaier¹, Eva Wirkert, Tim-Henrik Bruun¹, Verena C. Samara⁴, Wilhelm Schulte-Mattler¹, Wolfgang Herr³, Armin Schneider², Jochen Grassinger³, Ulrich Bogdahn¹

Affiliations

¹Department of Neurology, University Hospital Regensburg, Regensburg, Germany

²lifedatascience consulting, Schriesheim, Germany

³Department of Hematology, Internal Medicine III, University Hospital Regensburg, Regensburg, Germany

⁴Stanford Neuroscience Health Center, Palo Alto, CA, USA

Published in

Frontiers in Neurology

26. 11. 2018

Impact Factor: 3.508



Biomarker Supervised G-CSF (Filgrastim) Response in ALS Patients

*Siw Johannesen*¹, *Bettina Budeus*², *Sebastian Peters*¹, *Sabine Iberl*³, *Anne-Louise Meyer*¹, *Tina Kammermaier*¹, *Eva Wirkert*¹, *Tim-Henrik Bruun*¹, *Verena C. Samara*⁴, *Wilhelm Schulte-Mattler*¹, *Wolfgang Herr*³, *Armin Schneider*², *Jochen Grassinger*³ and *Ulrich Bogdahn*^{1*}

¹ Department of Neurology, University Hospital Regensburg, Regensburg, Germany, ² Lifedatascience Consulting, Schriesheim, Germany, ³ Department of Hematology, Internal Medicine III, University Hospital Regensburg, Regensburg, Germany, ⁴ Stanford Neuroscience Health Center, Palo Alto, CA, United States

OPEN ACCESS

Edited by:

Peter Bede,
Trinity College, Dublin, Ireland

Reviewed by:

Giorgia Querin,
INSERM U1146 Laboratoire
d'Imagerie Biomédicale, France
Foteini Christidi,
National and Kapodistrian University
of Athens Medical School, Greece

*Correspondence:

Ulrich Bogdahn
uli.bogdahn@ukr.de

Specialty section:

This article was submitted to
Neurodegeneration,
a section of the journal
Frontiers in Neurology

Received: 20 September 2018

Accepted: 29 October 2018

Published: 26 November 2018

Citation:

Johannesen S, Budeus B, Peters S,
Iberl S, Meyer A-L, Kammermaier T,
Wirkert E, Bruun T-H, Samara VC,
Schulte-Mattler W, Herr W,
Schneider A, Grassinger J and
Bogdahn U (2018) Biomarker
Supervised G-CSF (Filgrastim)
Response in ALS Patients.
Front. Neurol. 9:971.
doi: 10.3389/fneur.2018.00971

Objective: To evaluate safety, tolerability and feasibility of long-term treatment with Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF), a well-known hematopoietic stem cell factor, guided by assessment of mobilized bone marrow derived stem cells and cytokines in the serum of patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS) treated on a named patient basis.

Methods: 36 ALS patients were treated with subcutaneous injections of G-CSF on a named patient basis and in an outpatient setting. Drug was dosed by individual application schemes (mean 464 Mio IU/month, range 90-2160 Mio IU/month) over a median of 13.7 months (range from 2.7 to 73.8 months). Safety, tolerability, survival and change in ALSFRS-R were observed. Hematopoietic stem cells were monitored by flow cytometry analysis of circulating CD34⁺ and CD34⁺CD38⁻ cells, and peripheral cytokines were assessed by electrochemoluminescence throughout the intervention period. Analysis of immunological and hematological markers was conducted.

Results: Long term and individually adapted treatment with G-CSF was well tolerated and safe. G-CSF led to a significant mobilization of hematopoietic stem cells into the peripheral blood. Higher mobilization capacity was associated with prolonged survival. Initial levels of serum cytokines, such as MDC, TNF-beta, IL-7, IL-16, and Tie-2 were significantly associated with survival. Continued application of G-CSF led to persistent alterations in serum cytokines and ongoing measurements revealed the multifaceted effects of G-CSF.

Conclusions: G-CSF treatment is feasible and safe for ALS patients. It may exert its beneficial effects through neuroprotective and -regenerative activities, mobilization of hematopoietic stem cells and regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines as well as angiogenic factors. These cytokines may serve as prognostic markers when measured at the time of diagnosis. Hematopoietic stem cell numbers and cytokine levels are altered by ongoing G-CSF application and may potentially serve as treatment biomarkers for early monitoring of G-CSF treatment efficacy in ALS in future clinical trials.

Keywords: amyotrophic lateral sclerosis, granulocyte-colony stimulating factor, cytokines, hematopoietic stem and progenitor cells, HSPC, treatment

INTRODUCTION

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a life threatening neurodegenerative disorder characterized by premature loss of upper and lower motoneurons in the adult brain and spinal cord (1). The life time risk of ALS is below one in 400 individuals (2), the incidence is 2–3 per 100,000 in Europe (3). The unmet medical need in ALS patients is underlined by a median survival of 29.8 months from symptom onset, and of 15.8 months from diagnosis (4). Only modest treatment effects have been observed by riluzole (5) and edaravone (6).

In view of the great heterogeneity of disease etiology, neuronal damage likely results from many different pathologic changes, including neuroinflammation (3). Neurodegenerative processes with altered homeostasis, protein accumulation and cell death generates neuroinflammation, and central nervous system (CNS)-resident immune cells such as astrocytes and microglia trigger neuroinflammation and neurodegeneration (7). Inflammation may arise reactive to ALS-related CNS alterations, but also play an initial role and trigger both onset of disease and further accelerate progression of ALS (3). A complex, cytokine-mediated crosstalk between CNS and systemic immune cells regulates immune responses to either pro- or anti-inflammatory states, which evolve over time (7).

Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) is a 20-kDa glycoprotein and a well characterized growth factor that plays a key role in production, mobilization, and differentiation of hematopoietic stem cells (8, 9). It is a widely used compound for treatment of neutropenia and for mobilization of CD34⁺ hematopoietic stem cells prior to bone marrow transplantation. G-CSF enhances immunocompetence and has systemic anti-inflammatory effects (10). G-CSF is safe and well tolerated; most common side effects are moderate bone pain and musculoskeletal pain in 20–30% of patients, rarely splenomegaly and allergic reactions (11). Aside from hematopoietic functions, G-CSF acts as a neuronal growth factor in the CNS and possesses neuroprotective and -regenerative properties (12, 13). G-CSF passes the intact blood brain barrier, and its receptor is widely expressed within the CNS (12). G-CSF is thought to be neuroprotective through anti-apoptotic effects (12, 14), it induces neural differentiation, supports neurogenesis, contributes to re-endothelialization and arteriogenesis (12, 15). Systemic G-CSF induced hematopoietic stem cells may contribute on a direct cellular level in neurodegeneration by migration to the CNS (16, 17), where they may offer trophic support and modulate the local CNS immune system (17, 18). Observing G-CSF induced systemic hematopoietic stem cells may also shed light upon direct G-CSF effects on neural cells and stem cells as a surrogate system. Furthermore, G-CSF modulates monocyte function and attenuates the neuroinflammatory cascade (13). An interesting bone marrow-brain connection has been shown as G-CSF induced bone marrow derived cells migrate to CNS and express microglial phenotype in a mouse model of cranial irradiation. This was associated with a better functional outcome and suggested to facilitate neuroprotection by direct effects on resident CNS cells as well as modulation of cellular microenvironment in neurovascular niches (15). Angiogenic

factors may promote neurogenesis through direct effects on neuronal cells (19) and indirectly by angiogenic support of the highly vascularized neurogenic zones. G-CSF improved motor function and survival in mouse models of ALS (20–22). Small trials with G-CSF treatment in ALS patients demonstrated excellent tolerability and safety (23–25), with modulation of immune parameters (26), and possible minor benefits detected by neuroimaging (27). In summary, G-CSF exerts multiple physiological effects within the CNS and may be a potent modulator of different functions relevant to ALS pathophysiology (13). Importantly, from *in vitro*, mouse model and human exploratory evidence the mode of action most relevant for potential treatment effects cannot with certainty be concluded.

Due to the paucity of available treatment options we provided individual, off-label G-CSF treatment to ALS patients. G-CSF, considering its multimodal systemic and CNS effects, may be a promising treatment option in view of the etiopathological and clinical heterogeneity of ALS. Biomarkers are measurable indicators of disease and/or intervention and may be useful in monitoring long-term degenerative or reparative processes within the CNS. In view of the above-discussed complexity of ALS, it seems unlikely that a single biomarker can sufficiently reflect treatment effects on disease progression. We therefore used a panel of pro- and anti-inflammatory blood parameters, angiogenic factors, as well as hematopoietic stem cell markers. Monitoring pro-differentiation and -mobilization effects on hematopoietic stem cells may serve as a proxy for G-CSF activity on neural stem cells in individual patients and/or reflect direct and indirect beneficial effects of mobilized hematopoietic stem cells. Observing a panel of peripheral cytokines may reveal system wide immune and inflammatory status relevant for peripheral-CNS crosstalk.

G-CSF is known to be a safe stem-cell mobilizing agent. We investigated whether the number of mobilized hematopoietic stem cells is different in G-CSF treated ALS patients of longer versus shorter survival. Secondly, we were interested in whether baseline cytokine levels are associated with survival of G-CSF treated ALS patients. Lastly, we sought to explore hematopoietic stem cells and cytokine level alterations during G-CSF treatment.

METHODS

Patients, Procedures and Ethics

Treatment with G-CSF was offered to 36 patients seen at the University of Regensburg with definite or probable ALS according to the revised El Escorial criteria (28). As this was not a prospective clinical trial, the use of formal exclusion criteria was not considered appropriate. However, neither patients with a current or past history of neurologic disease other than ALS, nor patients participating in any interventional study were offered this treatment option. Individual treatment of ALS patients and retrospective evaluation was done after written informed consent. The ethics committee of the University of Regensburg approved a retrospective analysis (ethics approval: 15-101-0106 and 14-101-0011). The principles of the Declaration of Helsinki (World Medical Association, revised version 2013) were strictly

adhered to. Survival was defined as the time between diagnosis and death from confirmed ALS-related complications, including suicide.

ALS patients were treated with subcutaneous injections of recombinant human G-CSF (Filgrastim) on an outpatient basis. Dose and application modes were adapted individually upon initiation and over time (Figure 1; Table S1). Adaption was made with the intent to maximize patient wellbeing and safety in the presence of any emerging safety signals, and with the aim of increasing efficacy as monitored by levels of mobilized hematopoietic stem cells, a potential individual marker of biological activity of G-CSF. This resulted in heterogeneous treatment schemes. The intervention and evaluation was initiated in January 2010 and is still ongoing. The data were analyzed up to March 2017. The treatment was provided by the hospital and not funded by a pharmacological company or other external source. No external or internal funding sources were involved in patient selection, study design, data analysis or interpretation.

Patient safety was analyzed at baseline (initiation of treatment) followed by monthly control visits with clinical examinations, blood counts, cytokines, blood smears and estimation of bone marrow function. We conducted baseline spleen sonography with follow-ups upon dose escalation. Clinical ALS progression was monitored using the established ALSFRS-R (29). If patients were not able to continue visits and treatment, patient survival was monitored by phone calls to patients, their families and general practitioners.

Changes in pro- and anti-inflammatory immune profiles were evaluated at baseline, at 3 months, and then every 6 months throughout treatment by multiplex electrochemoluminescence with the panel assay V-PLEX Human Biomarker 40-Plex Kit (MesoScale Discovery[®], Maryland, USA). This industry standard panel has been validated in different immune related and non-immune diseases (manufacturer's information). In patients receiving G-CSF on five consecutive days, evaluations of cytokine levels in the peripheral blood were conducted twice a month, before (day 0) and after G-CSF application (day 7).

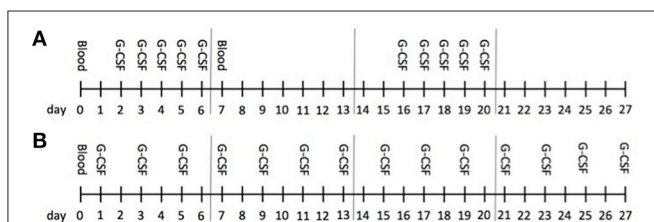


FIGURE 1 | Treatment course. The monthly protocol is illustrated; this schedule was repeated and individually adapted over the long-term treatment. G-CSF was administered subcutaneously. Mainly, patients received G-CSF either as a 5-day bolus (A) once (1st week) or twice (1st and 3rd week) or continuously (B) on single days up to every second day; G-CSF was administered in one or two doses á day. Blood was obtained before treatment onset at baseline (d0) and then once á month (d0) in patients receiving G-CSF continuously, and before (d0) as well as after a 5-day treatment (d7) in patients on bolus application. Cytokines were analyzed at d0 in both groups and at d7 in bolus treatment in the first month (baseline), then at the 3rd and 6th month during ongoing treatment.

In patients receiving G-CSF twice a week or every second day, analyses were conducted on a monthly basis 1 day after application. Peripheral blood serum was collected during regular visits at the hospital and immediately stored at -20°C for cytokine assays. For each assay, $25\ \mu\text{l}$ of serum samples were used and test carried out in duplicates, according to the manufacturer's instructions.

We analyzed white blood cells including cell differentiation, platelet and red blood cell counts, and hemoglobin levels with an automatic cell counter (Sysmex[®], Kobe, Japan). Peripheral blood smears were done on a 3-month basis by light microscopy. Peripheral blood CD34^{+} and $\text{CD34}^{+}\text{CD38}^{-}$ hematopoietic stem and progenitor cells (HSPC) were analyzed by flow cytometry as earlier described by our group (25). In short, 1 ml donor blood was lysed in 9 ml NH_4Cl lysis buffer and cells were then stained for 30 min at 4°C with combinations of anti-CD45-FITC (clone HI30, BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA), CD34-APC (clone 581, Biolegend, San Diego, CA, USA) and CD38-PE (clone HIT2, BioLegend) monoclonal antibodies. Analysis was performed on a Becton Dickinson CALIBUR flow cytometer (BD, East Rutherford, NJ, US).

Calculations and Statistics

Findings of immune parameters from three time points, baseline (initiation of treatment), 3 months and 6 months were selected for analysis. As patients did not always visit the outpatient clinic on the exact days of the given time points, the time points had to be defined as time periods. When assessing the ALSFRS-R at baseline, data from day of treatment initiation ± 28 days were included. For baseline measures of blood counts, stem cell mobilization parameters and cytokines, only data obtained before the first G-CSF application were selected. The 3-month time point was defined as day 45–134 and the 6-month time point as ranging from day 135 to 224. If patients visited more than once during these time periods, the day closest to the intended time point was selected.

The immediate effects of G-CSF treatment on peripheral levels of cytokines, hematopoietic stem cells and blood counts were assessed by comparing respective levels 2 days before and 1 day after a 5-day treatment course with G-CSF. We then explored different patterns of immune responses depending on individual survival. Survival time was defined as time elapsed from day of diagnosis to day of death or day of last observation in the case of censoring. For this purpose, G-CSF treated patients were divided into two groups based on their survival being longer or shorter than 30 months from diagnosis, as this was a time point that separated the patients into two equal-sized groups. At the point of database closure, patients who were still alive were censored and included in the “long survival” group if they had been observed for over 30 months ($n = 7$). Patients who were alive and had not yet been observed for over 30 months were not considered for this analysis ($n = 3$). The same censoring was applied for correlation analysis. We then retrospectively analyzed baseline levels of cytokines, hematopoietic stem cells and blood counts in the long and short survivor groups and further correlated survival with cytokines upon treatment initiation.

R or GraphPad Prism 7 was employed for statistical analysis and graph design. Correlations were analyzed using two-tailed Pearson correlation and presented with correlation coefficient (r), coefficient of determination (R^2) and p -value. Comparisons were made with Mann-Whitney test and paired Wilcoxon test. Data were considered significant at $p \leq 0.05$. A trend was noted at $p \leq 0.1$. Comparisons were corrected for multiple testing by false discovery rate approach (FDR, two-stage step-up method of Benjamin, Krieger and Yekutieli with desired FDR (Q) at 10%) and considered a discovery at FDR-adjusted p -value (q) < 0.1 . We used an Area Under the Curve (AUC) approach to estimate mobilization of hematopoietic stem cells after G-CSF treatment over time. Stem cell measurements before and after G-CSF dosing were available for patients on the 5-day treatment scheme. For better comparability regarding long and short survival times after diagnosis, we selected patients with ongoing 5-day treatment over the first 4 months. All patient measurements were used in the calculation. If patients had fewer data points, their mean AUC value calculated from all data points was applied (in the case of one patient). The AUC value was calculated with the *auc* function of the R-package “flux” (Juraski, Koebsch, Guenther and Beetz, 2014). The baseline value at day 0 or from any day prior to treatment start was used as threshold for the calculation.

RESULTS

Demographics, Intervention and Safety

36 caucasian ALS patients (25 male, 11 female, 28 limb onset, 8 bulbar onset, mean age 51.9 years, mean ALSFRS-R on initiation 38/48) were treated with G-CSF in addition to riluzole treatment. We here report on individual treatment on a named patient basis—consequently, treatment schemes were heterogeneous. Dose and application modes were adapted individually upon initiation and over time (Table S1). In summary, G-CSF was injected subcutaneously in a dose-range from 90 to 2160 Mio IU per month (900–21,600 $\mu\text{g}/\text{month}$), with a mean dose of 464 Mio IU/month (4,640 $\mu\text{g}/\text{month}$). Application modes ranged from once weekly to every second day in an ongoing individually tailored manner. The median duration of treatment was 13.7 months (mean 16.7 months; range from 2.7 to 73.8 months) (Table 1, Figure 1).

Long-term outpatient treatment with G-CSF was generally well tolerated in ALS patients and compliance was excellent. Minor adverse events were mild to moderate bone pain after G-CSF injection and leukocytosis. One patient experienced an episode with heat sensation, lightheadedness, and 15 min. of dyspnea on 1 day of drug application 39 months into G-CSF treatment. Due to the possibility of drug-related intolerance or mild allergic reaction, G-CSF was discontinued in this patient; antibodies against G-CSF were not detectable. This patient was switched from Filgrastim to Pegfilgrastim, a PEGylated form of recombinant human G-CSF, from his 46th to 53rd month after initiation, and then ended the off-label treatment without further adverse reactions. As expected, mild to moderate splenomegaly evolved during ongoing G-CSF treatment in most patients. Without any further symptoms or complications, the mean spleen width increased from 4.3 to 4.9 cm and length from

10.7 to 12.1 cm during treatment. There were no severe adverse events (SAE), and no signs for pre-malignant transformation in peripheral blood smears.

Baseline hematology showed no abnormalities in our patients. G-CSF mobilizes neutrophil leukocytes as well as CD34^+ and $\text{CD34}^+\text{CD38}^-$ hematopoietic stem and progenitor cells (HSPC) from the bone marrow into the peripheral blood. Leukocyte counts increased significantly in all treated patients, from an initial mean of $6.9 \times 10^3/\mu\text{l}$ to $48.2 \times 10^3/\mu\text{l}$ (range 8.3–118.7 $\times 10^3/\mu\text{l}$, $p < 0.0001$) after G-CSF application. A predicted increase in the average percentage of neutrophils (from 64.8 to 87.3%, $p < 0.0001$) was accompanied by a relative decrease in lymphocytes (from 24.1 to 7.0%, $p < 0.0001$), monocytes (from 8.8 to 4.7%, $p < 0.0001$) and eosinophils (from 1.8 to 0.7%, $p < 0.0001$) as well as a small decrease in red blood cell count (from 5.03 to $4.83 \times 10^3/\mu\text{l}$, $p < 0.0001$), hemoglobin level (from 14.9 to 14.4 g/dl, $p < 0.0001$) and hematocrit (from 44.2 to 43.6, $p = 0.0362$) during monitoring (all comparisons by paired t -test, two-tailed p -value. Figure S1). There were no significant changes in basophiles and platelet count during monitoring. The fold increase of CD34^+ and $\text{CD34}^+\text{CD38}^-$ HSP cells in peripheral blood served as an indicator of mobilization efficiency and was determined by comparing cells at baseline to cells after mobilization. The mobilization efficacy was heterogeneous with high intra- and inter-personal variability (data not shown).

G-CSF-Mediated Stem Cell Mobilization Was Associated With Survival of ALS Patients

Twenty-six of thirty-six G-CSF treated patients deceased between January 2010 and March 2017. 10 patients were alive, of which 6 were still treated with G-CSF. The patient who had suffered from a possible allergic reaction was regularly seen at the clinic. Three patients ended G-CSF treatment at days 82, 420 and 427, and were all lost to follow up. The overall median survival of deceased patients was 24.2 months from diagnosis (mean 25.5; range 3.9–56.6 months). For further analysis, patients were divided into two equally sized groups by survival being longer or shorter than 30 months from diagnosis. Patients, who were alive at the time of database closure, were considered for this analysis had they been observed for at least 30 months. The mean (median) survival differed in the two survival groups: 46.59 (39.55) months, SD 16.34 and 17.04 (18.30) months, SD 8.16 (two-tailed p -value < 0.0001 ; Mann-Whitney t -test). The ALSFRS-R slope over time was significantly flatter in longer surviving patients (Wilcoxon test, $p = 0.00086$; Figure 2). Long survivors were younger (mean age 46.8 vs. 56.5 y, unpaired t -test, $p = 0.0163$) and had a longer latency between diagnosis and treatment onset (mean 333 vs. 163 days, unpaired t -test, $p = 0.0377$). Their clinical function upon treatment initiation was not significantly different (mean ALSFRS-R 38.6/48 vs. 37.3/48). Further, longer surviving patients were less frequently female (18.8 vs. 47.1%), but had similar occurrence of bulbar onset of disease (18.8 vs. 17.6%) (Table 1).

G-CSF is known to mobilize HSPC into the peripheral circulation. CD34^+ and $\text{CD34}^+\text{CD38}^-$ HSPC were evaluated in the sera of patients 2 days before (day 0) and 1 day after

TABLE 1 | Demographics and intervention in G-CSF treated ALS patients.

ALS patient	Age (years)	Gender	ALSFRS-R baseline	Site of onset	Time diagnosis to treatment (days)	Dose G-CSF (mean; range (MioIE/month))	Treatment duration (months)	Survival (months) from diagnosis
1	50	F	38	Limb	498	150 (150–150)	19	36.2
2	42	M	32	Limb	619	280 (150–300)	31	52.2
3	77	M	21	Limb	759	173 (150–240)	5	33.4
4	68	F	39	Bulbar	29	150 (150–150)	3	3.9
5	67	M	33	Limb	439	260 (150–300)	20	56.6
6	26	M	33	Limb	486	485 (150–1170)	74	89.7*
7	50	F	33	Limb	536	240 (240–240)	7	25.4
8	73	M	41	Limb	270	166 (150–240)	11	21.4
9	50	M	28	Limb	393	133 (90–150)	7	21.4
10	56	M	37	Limb	770	242 (150–300)	14	40.0
11	41	M	38	Limb	24	287 (150–300)	27	36.3
12	35	F	40	Bulbar	115	296 (240–300)	14	63.7*
13	48	F	46	Limb	38	216 (150–300)	14	29.7
14	43	M	44	Limb	61	561 (192–768)	45	47.3
15	65	F	32	Limb	81	192 (192–192)	14	18.3
16	51	F	42	Limb	101	225 (150–300)	3	6.4
17	60	F	38	Limb	21	192 (192–192)	9	11.5
18	58	M	44	Limb	45	311 (240–480)	25	25.4
19	46	M	46	Limb	249	150 (150–150)	26	34.7
20	50	M	-	Limb	1	198 (192–240)	8	8.0
21	27	M	44	Limb	53	301 (150–600)	39	71.3*
22	45	M	48	Limb	26	666 (240–1296)	37	39.1*
23	55	M	40	Bulbar	26	263 (150–300)	3	41.9*
24	61	M	44	Limb	66	375 (150–510)	5	9.2
25	60	M	40	Bulbar	135	602 (240–816)	19	23.0
26	65	F	30	Bulbar	122	563 (240–900)	7	11.3
27	43	F	41	Limb	338	628 (240–720)	14	35.7*
28	60	M	42	Limb	23	589 (480–720)	11	12.1
29	45	F	28	Limb	493	535 (150–720)	6	29.6
30	47	M	29	Limb	396	585 (450–720)	5	19.3
31	50	M	40	Limb	23	667 (240–720)	8	13.7
32	39	M	41	Bulbar	343	1015 (450–1170)	20	31.7*
33	56	M	42	Bulbar	525	744 (450–1056)	11	35.6
34	59	M	38	Bulbar	52	1044 (450–1440)	14	#
35	69	M	39	Limb	62	1344 (450–2160)	16	#
36	35	M	38	Limb	288	1141 (300–1440)	14	#
Mean (SD)	51.9 (12.2)	11 F 25 M	38/48 (6.1)	28 Limb 8 Bulbar	236.3 (231.4)	222.7 (104.1)	16.7 (14.4)	25.5 (14.3) in deceased patients

Patients marked by # or * were alive upon closure of data admission. Patients who had been observed for less than 30 months at time of closure of data admission are marked by #. The sign * indicates patients, who at time of closure of data admission, had been observed more than 30 months from diagnosis. Baseline ALSFRS-R was not available in one patient, marked by -.

(day 7) a 5-day treatment course with G-CSF at baseline, 3 months and 6 months. G-CSF led to a sustained increase of CD34⁺ and CD34⁺CD38⁻ HSPC at all time points (Figure 3). In patients treated with ongoing 5-day courses of G-CSF *t*-tests

displayed no significant reductions in mobilization of CD34⁺ and CD34⁺CD38⁻ HSPC when comparing the respective levels after G-CSF treatment at baseline and after 3 and 6 months of treatment (mean number of CD34⁺/ml at baseline 30307,

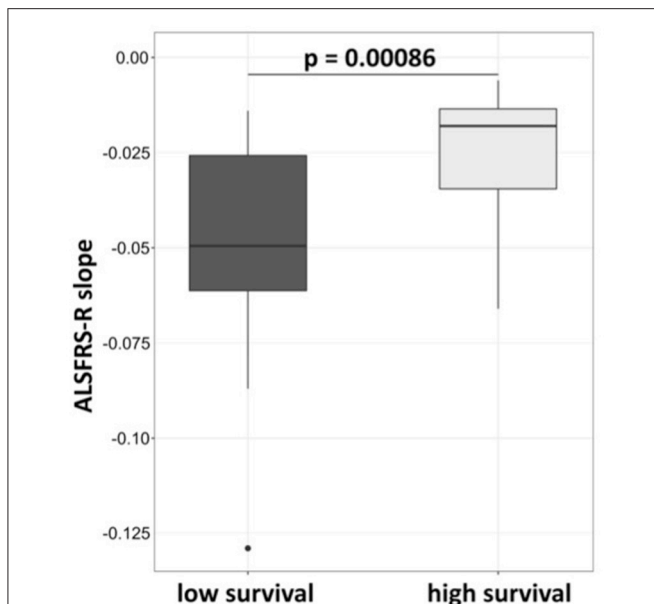


FIGURE 2 | ALSFRS-R decline is less rapid in patients who survive longer than 30 months. Patients were assigned to high survival group at survival longer or at 30 months, and to low survival group at survival below 30 months from diagnosis. The slope was calculated by robust calculation of the ALSFRS-R measurements. Median slope in the high survival group was -0.019 and -0.05 in the low survival group. Wilcoxon test, p -value 0.00086 .

at 3 months 35250, at 6 months 22017; mean number of CD34⁺CD38⁻/ml at baseline 3092, at 3 months 2089, at 6 months 1632, all Wilcoxon paired t -test, all p -values not significant; **Figure S2**). However, we found a different capacity to mobilize hematopoietic stem cells in patients surviving longer or shorter than 30 months from diagnosis. This was analyzed by Area Under the Curve (AUC) approach to mobilized CD34⁺CD38⁻ cells within the first year of G-CSF treatment in 19 available patients, who all received ongoing 5-day treatment. Longer surviving patients displayed a significantly superior mobilization of CD34⁺CD38⁻ cells under G-CSF application at 1 year of treatment. At 4 months this difference was borderline significant (trend) (**Figure 4**).

Short and Long-Term Survivors Differed in Their Baseline Cytokine Levels

Survival in months from diagnosis was negatively correlated with baseline serum levels of the cytokine TNF-beta. MCP-1 and INF-gamma were, as a trend, negatively correlated with survival as well. IL-16 baseline levels displayed a positive correlation with survival. MDC, IL-8, IL-17A, and PIGF were, as a trend, positively correlated with survival (**Table 2, Figure 5**). We then dichotomized G-CSF treated patients according to their survival of either more or less than 30 months from diagnosis, and analyzed cytokines at baseline. Patients who survived longer than 30 months from diagnosis had significantly higher baseline levels of MDC and Tie-2. For IL-16, IL-17A, and PIGF we found similar trends. On the other hand, there were significantly higher baseline levels of TNF-beta and IL-7

in patients who survived less than 30 months from diagnosis. TNF-alpha and MCP-1 displayed similar trends. However, when correcting the cytokine comparisons in long and short survival for multiple testing, none of these findings remained significant [as assessed by the FDR-adjusted p -values (q -values) in **Table 2**].

G-CSF Treatment Modulated Serum Cytokine Levels of ALS Patients Over Time

The direct effects of G-CSF on cytokine levels were evaluated by comparing cytokine levels 2 days prior to and 1 day after ongoing 5-day G-CSF application in a subgroup of patients allowing this analysis. These immediate effects were determined at three different time points (baseline, 3 and 6 months after treatment initiation). Due to individual application modes, 5-day G-CSF applications with corresponding blood samples were available for 18 patients at baseline, for 17 patients at 3 months, and for 14 patients at 6 months of ongoing G-CSF treatment.

We found G-CSF to have an immediate effect on the level of various cytokines (**Table 3, Figure S3**). The serum level of IL-10 increased after 5 days of G-CSF treatment at baseline, 3 months and 6 months compared to its respective level before G-CSF application, however, at 3 months only as a trend. The levels of IL-16, Tie-2, TNF-alpha, MIP1-beta, IL-15, IP-10, VCAM, ICAM-1, and of Flt-1 were significantly increased after G-CSF treatment at all above-mentioned time points. The levels of TARC, IL-7, INF-gamma, and MCP-1 were decreased at all above-mentioned time points. There was an increase in SAA, IL-12/IL-23p40, CRP, and VEGF-A levels after G-CSF at baseline and 6 months, the latter at 6 months only as a trend. The levels of VEGF-C and PIGF were increased after G-CSF at 6 months, that of PIGF also at 3 months as a trend. There was a decrease of Eotaxin-1, Eotaxin-3 and VEGF-D after G-CSF application at baseline and 3 months. TNF-beta was decreased at baseline, at 6 months by a trend. MCP-4 was decreased at 6 months, at baseline by a trend. The level of bFGF was decreased after G-CSF application at 3 months and 6 months.

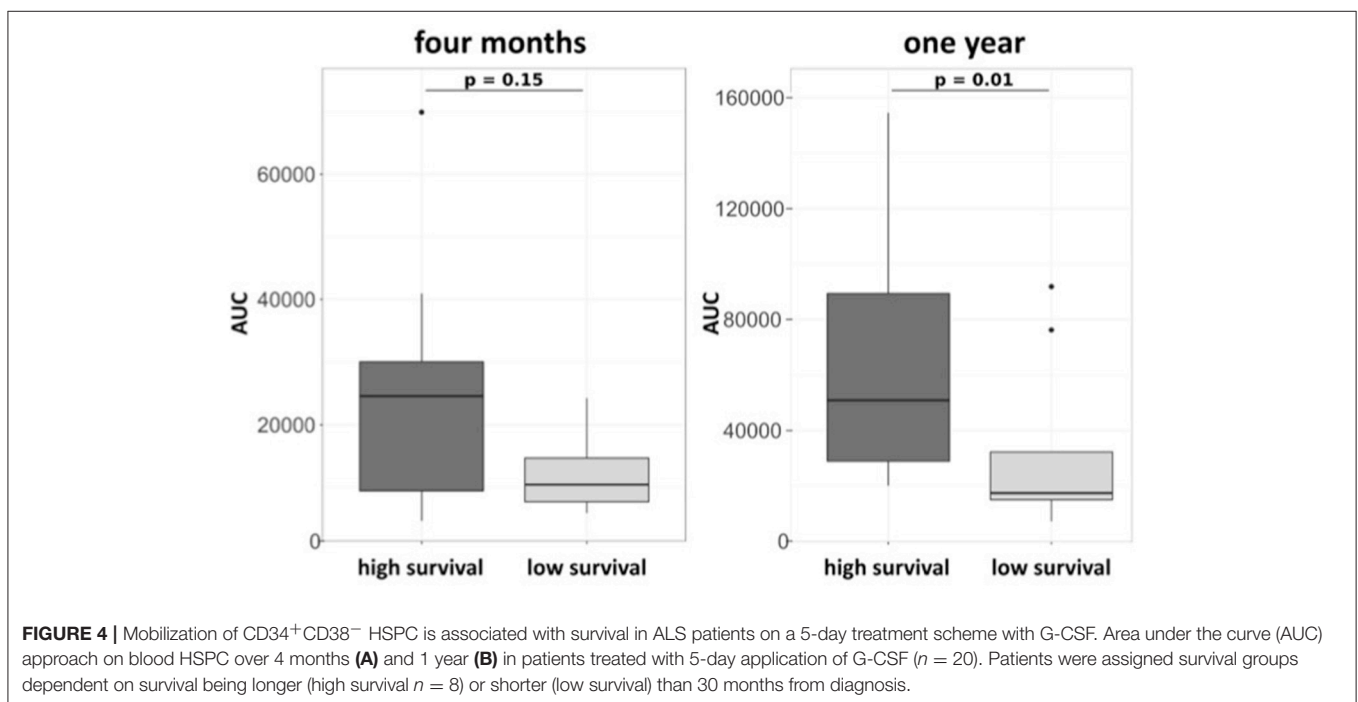
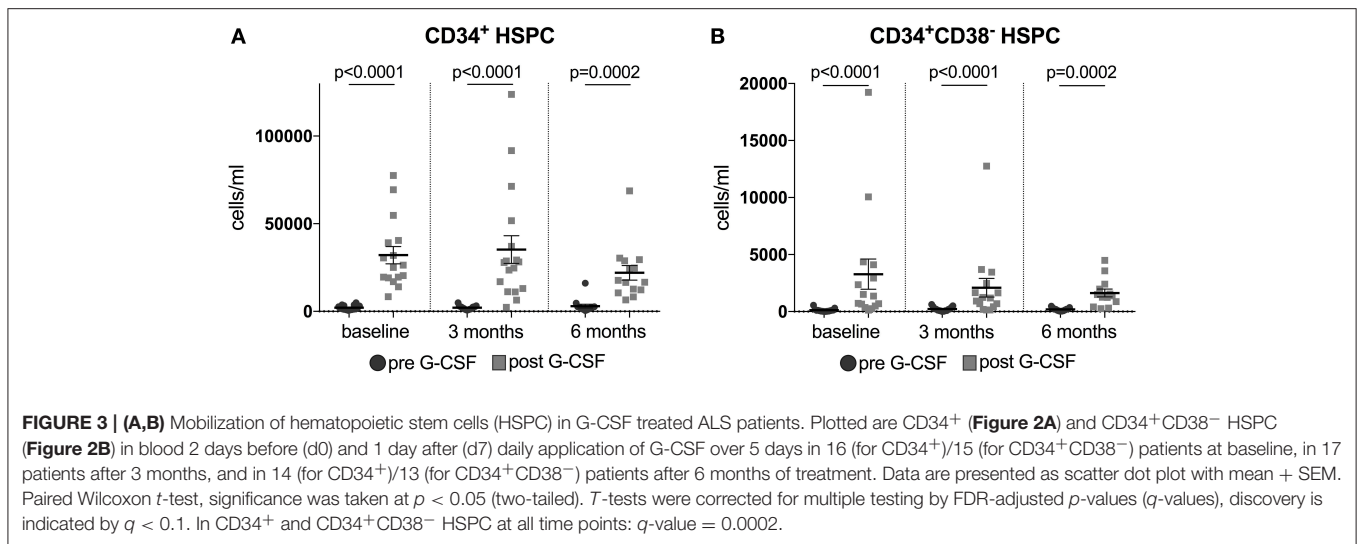
DISCUSSION

Our Main Findings

Long term and individually adapted off-label treatment with G-CSF in 36 ALS patients was well tolerated and safe. The number of G-CSF-mobilized hematopoietic stem cells, as measured by AUC, was associated with longer survival. Initial levels of serum cytokines, such as MDC, TNF-beta, IL-7, IL-16, and Tie-2 were significantly associated with survival, indicating the potential of prognostic application of these immune markers in G-CSF treated ALS patients. Continued application of G-CSF led to persistent alterations in various serum cytokines and ongoing measurements revealed the multifaceted effects of G-CSF.

ALS as a Neuroinflammatory Disease

ALS has been recognized as a multifactorial disease. Neurodegenerative processes trigger neuroinflammation



and vice versa. Neuroinflammation with microglial activation, infiltration of peripheral immune cells into the CNS, and alterations in cytokine levels are pathological features in ALS. Cytokines are mediators of the immune communication that may cross the blood-brain barrier (BBB) and provide a mechanism by which the peripheral immune system may directly influence the CNS (30). In a recent study, we demonstrated a pro-inflammatory immune response with elevated inflammatory cytokines both in serum during disease and post-mortem in the CNS of ALS patients (31). However, immune response in ALS cannot be clearly dichotomized to a purely pro- or anti-inflammatory state, as cytokines are often pleiotropic, and their

function may change over time and depend on concentration and specific disease context. Possibly, cytokine response in early ALS may be an attempt to restore homeostatic balance, whereas chronic exposure to pro-inflammatory cytokines might lead to cell destruction and loss of neuronal function. The latter supports a self-sustaining inflammatory process and possibly accelerates disease progression (7). Neuroinflammation and systemic inflammatory stimuli with their influence upon the CNS offer targets for therapeutic intervention in ALS (32). Analysis of peripheral blood is a feasible alternative for ongoing measurements of immune mediated and pathophysiological relevant parameters (33).

TABLE 2 | Cytokine levels at baseline in relation to survival.

Cytokine	Level in long survival	Correlation			Comparison (t-test)			
		r-value	R ² -value	p-value	Median long survival	Median short survival	p-value	q-value
ANTI-INFLAMMATORY								
MDC	↑	0.3269	0.1069	0.0726	939	227	0.0494	0.3088
PRO-INFLAMMATORY								
TNF-β	↓	-0.4981	0.2481	0.0043	0.535	0.830	0.0038	0.1254
IL-7	↓	-	-	-	17	27	0.0171	0.2640
TNF-α	↓	-	-	-	2.5	3.0	0.0638	0.3088
MCP-1	↓	-0.3414	0.1166	0.0601	278	957	0.0544	0.3088
INF-γ	↓	-0.3264	0.1065	0.0731	-	-	-	-
IL-16	↑	0.4449	0.1979	0.0122	262	133	0.0655	0.3088
IL-8	↑	0.3492	0.1219	0.0542	-	-	-	-
IL-17A	↑	0.3749	0.1406	0.0710	2.58	0.68	0.0912	0.3421
ANGIOGENESIS								
Tie-2	↑	-	-	-	5762	4492	0.0240	0.2640
PIGF	↑	0.3277	0.1074	0.0719	33.8	31.7	0.0933	0.3421

Cytokine levels in pg/ml before first G-CSF application in ALS patients. Arrows indicate cytokine levels in patients with long compared to short survival. Then cytokine levels at baseline were correlated with survival. Next, Mann-Whitney test was calculated to assess differences in baseline cytokine levels in patients with survival longer or shorter than 30 months from diagnosis. Number of patients at baseline: 31 (16 long survival). Significance is indicated by bold marking when $p < 0.05$ (two-tailed p-value), trend when $p < 0.1$. T-tests were corrected for multiple testing by FDR-adjusted p-values (q-values), discovery is indicated by $q < 0.1$.

G-CSF in ALS

ALS is a multifactorial disease. Targeting common pathologic features such as neuro-inflammation and -degeneration may thus be beneficial for all ALS patients. Although G-CSF is an established, well-tolerated and safe growth factor for mobilization of hematopoietic stem and precursor cells (34), there is accumulating evidence that it is also a potent modulator of multiple CNS functions relevant to ALS (13). G-CSF modulates the immune response (35), it promotes anti-inflammatory and decreases pro-inflammatory mediators (36). Small clinical trials with G-CSF in ALS patients have delivered inconclusive results. Treatment with G-CSF was associated with a decrease in pro-inflammatory cytokine levels in serum and cerebrospinal fluid (CSF) of ALS patients (26), and minor benefits were detected by neuroimaging (27). But promising evidence for efficacy of G-CSF in ALS animal models has not yet been translated to ALS patients. It seems likely that a successful clinical translation requires higher dose, more frequent application and longer exposure to G-CSF as well as extended observation times (37). The latter is of crucial importance when aiming at structural and functional improvements or support of neurogenesis.

G-CSF Treatment in ALS Is Safe and Well Tolerated

Application of G-CSF in oncological indications is usually limited to treatment cycles, and the only clinical experience with life-long G-CSF therapy has accumulated with patients suffering from severe congenital neutropenia and cyclic neutropenia (38,

39). To our knowledge, we first reported on long-term G-CSF treatment in a CNS indication (25). We found G-CSF application to be generally well tolerated in ALS patients, with mild to moderate bone pain and leukocytosis after G-CSF applications as frequent minor adverse events. As this was off-label, experimental treatment of individual ALS patients, we had no control group for assessment of survival. If we only observe *deceased* patients and leave those still alive out, then the mean survival of these 26 patients at 25.5 months from diagnosis indicates no harm by G-CSF in ALS.

Stem Cell Mobilization Is Efficient and Associated With Longer Survival in G-CSF Treated ALS Patients

G-CSF is a well-known mobilizer of hematopoietic stem cells (8, 9). In all patients treated with G-CSF for five consecutive days, G-CSF increased mobilization of hematopoietic stem cells (CD34⁺ and CD34⁺ CD38⁻) into the peripheral blood. Interestingly, we found an association between stem cell mobilization and survival. Patients who survived longer than 30 months from diagnosis mobilized more CD34⁺CD38⁻ hematopoietic stem cells than patients with shorter survival, as measured by Area Under the Curve after G-CSF treatment up to 1 year (Figure 4). Higher levels of circulating hematopoietic stem cells are associated with better clinical outcome and less structural damage after intracerebral hemorrhage in humans (40). The mechanism of how hematopoietic stem cells may contribute to neurodegenerative disease is yet unclear. Migration and

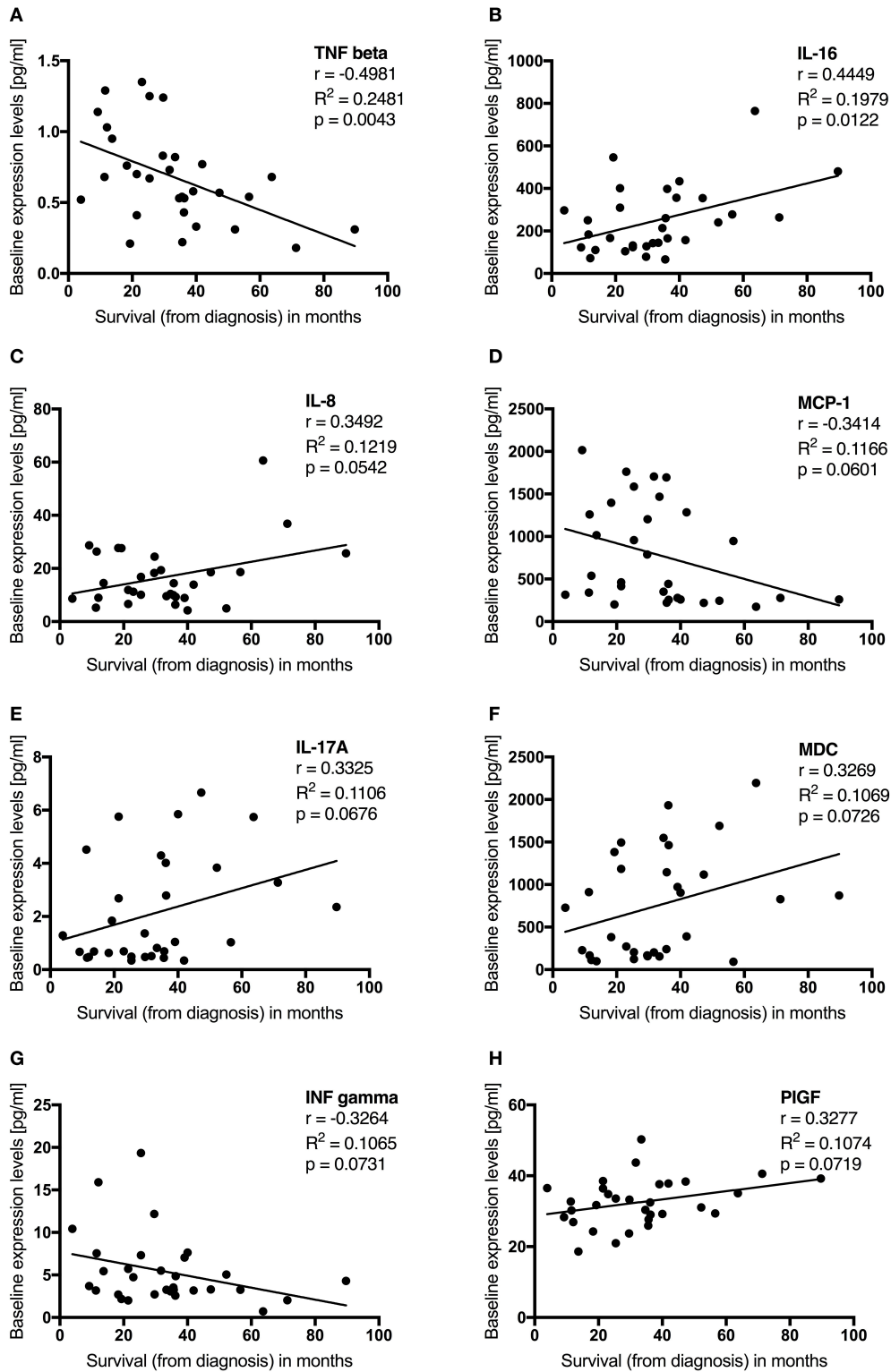


FIGURE 5 | (A–D) Baseline cytokine levels are associated with survival in G-CSF treated ALS patients. Plotted are initial cytokine levels of TNF beta **(A)**, IL-16 **(B)**, IL-8 **(C)**, MCP-1 **(D)**, IL-17A **(E)**, MDC **(F)**, ING gamma **(G)**, and PIGF **(H)** in pg/ml before first G-CSF application in 31 patients. Survival was assessed in months from diagnosis and censored upon data admission in living patients ($n = 7$). Displayed is Pearson r , the coefficient of determination (R^2), p -value (two-tailed) significant at $p < 0.05$, trend at $p < 0.1$.

TABLE 3 | Cytokine levels before and after G-CSF treatment at different time points.

Cytokine	Direction	Treatment start			3 months			6 months		
		Fold change d0-d7	p-value	q-value	Fold change d0-d7	p-value	q-value	Fold change d0-d7	p-value	q-value
ANTI-INFLAMMATORY										
IL-10	↑	1.95	0.0016	0.0018	1.24	0.0856	0.0371	2.02	0.0004	0.0007
PRO-INFLAMMATORY										
TNF-β	↓	0.83	0.0208	0.0112	-	-	-	0.85	0.0591	0.0268
INF-γ	↓	0.81	0.0214	0.0113	0.78	0.0182	0.0104	0.62	0.0009	0.0014
IL-7	↓	0.66	0.0003	0.0006	0.80	0.0011	0.0014	0.80	0.0107	0.0075
MCP-1	↓	0.83	0.0120	0.0080	0.77	0.0007	0.0012	0.79	0.0107	0.0075
MCP-4	↓	0.94	0.0599	0.0268	0.92	0.0150	0.0089	-	-	-
TARC	↓	0.87	0.0304	0.0148	0.86	0.0032	0.0030	0.80	0.0166	0.0097
Eotaxin-1	↓	0.88	0.0139	0.0085	0.93	0.0079	0.0059	-	-	-
Eotaxin-3	↓	0.83	0.0034	0.0030	0.78	0.0034	0.0030	-	-	-
CRP	↑	4.45	0.0010	0.0014	-	-	-	3.99	0.0085	0.0062
SAA	↑	2.96	0.0008	0.0013	-	-	-	2.03	0.0353	0.0168
TNF-α	↑	1.77	< 0.0001	0.0003	1.50	0.0046	0.0038	1.79	0.0004	0.0007
IP-10	↑	1.50	0.0002	0.0004	1.34	0.0067	0.0052	1.40	0.0134	0.0085
IL-15	↑	1.14	0.0022	0.0022	1.24	0.0208	0.0112	1.24	0.0016	0.0018
IL-12/IL-23p40	↑	1.24	0.0047	0.0038	-	-	-	1.19	0.0052	0.0041
IL-16	↑	3.14	< 0.0001	0.0003	3.66	0.0011	0.0014	3.78	0.0002	0.0004
MIP1-β	↑	3.38	< 0.0001	0.0003	4.63	0.0013	0.0015	2.91	0.0001	0.0003
ANGIOGENESIS										
VEGF-A	↑	1.39	0.0010	0.0014	-	-	-	1.32	0.0580	0.0268
Tie-2	↑	1.27	< 0.0001	0.0003	1.18	0.0032	0.0030	1.19	0.0134	0.0085
Flt-1	↑	1.45	< 0.0001	0.0003	1.32	0.0026	0.0026	1.33	0.0001	0.0003
PlGF	↓	-	-	-	-	-	-	1.14	0.0203	0.0112
VEGF-C	↓	-	-	-	-	0.0984	0.0420	0.86	0.0017	0.0017
VEGF-D	↓	0.88	0.0139	0.0085	0.94	0.0110	0.0075	-	-	-
bFGF	↓	-	-	-	0.72	0.0232	0.0121	0.81	0.0040	0.0035
VASCULAR INJURY										
VCAM	↑	1.40	< 0.0001	0.0003	1.28	0.0267	0.0134	1.41	0.0001	0.0003
ICAM-1	↑	1.30	< 0.0001	0.0003	1.23	0.0305	0.0148	1.31	0.0001	0.0003

Paired Wilcoxon t-test. Arrows indicate direction, and fold change gives effect size of cytokine modulation when comparing respective levels 2 days before (d0) and 1 day after (d7) daily application of G-CSF over 5 days. Number of evaluable patients at baseline: 18, at 3 months: 17, and at 6 months: 14. Significance is indicated by bold marking when $p < 0.05$ (two-tailed p-value), trend when $p < 0.1$. T-tests were corrected for multiple testing by FDR-adjusted p-values (q-values), discovery is indicated by $q < 0.1$. Non-significant and non-trend findings are marked by -.

subsequent trans-differentiation of bone marrow derived cells within the CNS is controversially discussed (18). However, G-CSF increases the number of hematopoietic stem cells translocated to the damaged CNS (16, 17). There, hematopoietic stem cells modulate the immune system, they may interact with local cells, and produce neurotrophic factors, which promote

growth of neural progenitors and survival (17, 18). A recent study in mice exposed to cranial irradiation demonstrated that G-CSF augments neurogenesis; bone marrow derived G-CSF-responsive cells migrate to the CNS, where they express macrophage and microglia phenotypes. The authors found that G-CSF treatment led to an improved functional outcome, thus arguing for the

neuroprotective mechanisms of G-CSF on brain repair (15). Human studies have demonstrated G-CSF to directly affect monocytes and to modulate monocyte cytokine secretion toward an anti-inflammatory polarization (41). A recent study applying G-CSF in healthy humans described expansion of a mature variant monocyte subtype displaying strong immunosuppressive properties (42). Next to neural cells, also neural stem cells have G-CSF receptors and G-CSF treatment induces a neural phenotype of these cells (12). Effects of G-CSF on hematopoietic stem cells may therefore serve as a proxy for biological cellular activity of G-CSF on neural cells.

Cytokine Levels Are Associated to Survival and Affected by G-CSF

Neuroinflammation contributes to the pathogenesis of ALS (3). Apart from CNS inflammation, peripheral cytokines and other inflammatory markers are affected in ALS, and cytokine levels may serve as biomarkers (43). We found that different cytokines at baseline were correlated with survival (Table 2, Figure 5). When dichotomizing patients depending on individual survival being longer or shorter than 30 months from diagnosis, we detected different peripheral cytokine levels at baseline (Table 2). In general, five-day treatment courses with G-CSF exerted immediate effects on cytokine levels and were able to partly counteract the harmful immune response in ALS (Table 3, Figure S3).

The initial levels of 11 cytokines were associated with survival, of which 8 were altered by G-CSF application. However, the correlation models, as indicated by the rather low R^2 -values, could only explain smaller parts of the variance. Even though the cytokine comparisons in long and short survival did not withstand correction for multiple testing, we decided to explore the findings because they might help to generate hypotheses for further studies and show biologically important findings in spite of the small number of patients tested. Moreover, G-CSF led to change in many inflammatory cytokines, as well as cytokines involved in angiogenesis and vascular injury, of which all significant changes remained so after testing for multiple comparison (Tables 2, 3).

Initial TNF-beta (LTA, lymphotoxin-alpha) levels negatively correlated with survival and were found at higher levels in shorter surviving ALS patients upon treatment initiation. G-CSF application led to reduction in TNF-beta, a pro-inflammatory cytokine and common cell death effector found to be increased in ALS sera (31). TNF-alpha was borderline increased in patients with shorter survival (trend) and G-CSF led to an increase in its serum levels. TNF-alpha is elevated in ALS (31, 43–46) and correlates with disease duration (47). But its role in ALS is unclear and the two TNF-alpha receptors, either associated with inflammation or neuroprotection, have opposing effects concerning survival in ALS (48). Dependent on subtype and context, activation can lead to neuroprotection and neurogenesis (49), reduced oxidative stress (50) and glutamate excitotoxicity (51). An increased occurrence of ALS after long-term use of TNF-alpha inhibitors in rheumatic arthritis, is suggested to be a consequence of deficient TNF-alpha mediated neuronal

protection (52). Higher initial levels of IL-7 were associated with shorter survival, and reduced after ongoing treatment with G-CSF. IL-7 is considered a pro-inflammatory cytokine, and is increased in CSF (53) and serum (31) of ALS patients. MCP-1 (CCL2) was borderline correlated (trend) with shorter survival of ALS patients. We confirmed a reduction of MCP-1 levels in ALS after treatment with G-CSF (26). MCP-1 is a prominent pro-inflammatory cytokine that can enhance microglial recruitment to the CNS after injury, which may exacerbate ALS progression (54). MCP-1 correlates with faster disease progression (55) and ALS patients have elevated MCP-1 serum levels (31, 55, 56) and increased protein expression within spinal cord (31). INF-gamma was borderline negatively correlated with survival in our patients (trend). As known from healthy donors (57), INF-gamma levels were decreased by G-CSF. As a hallmark of proinflammatory cells, INF-gamma is proposed to contribute to motor neuron death in ALS (58). ALS patients have higher INF-gamma serum levels (47, 55, 59), that correlate with disease progression (47, 59) and shorter survival (55).

On the other hand, the pro-inflammatory marker IL-16 was positively correlated with survival and increased after G-CSF application. IL-16 also holds an immunomodulatory role by expansion of regulatory T cells (Treg) (60), that at lower levels in ALS, are associated with rapid disease progression and shorter survival (61). Thus, G-CSF related increase in IL-16 might be beneficial for ALS patients. Another pro-inflammatory cytokine, IL-17A, was borderline correlated with longer survival (trend) but not altered by G-CSF treatment. IL-17A has been reported elevated in serum (55, 62, 63) and CSF (64) of ALS patients. After G-CSF treatment, Chió et al. found a reduction of IL-17A in the CSF, but not in serum of ALS patients (26). IL-8 was borderline correlated with longer survival (trend), and not altered by G-CSF treatment. IL-8 is produced by several cells in response to inflammation, and higher plasma (44) and CSF levels (65) are known in ALS. MDC (CCL22) was associated with longer survival, however, not modulated by G-CSF treatment. MDC is an anti-inflammatory cytokine, and consistent with a proposed protective effect, ALS patients have lower MDC protein expression in the spinal cord (31). Further, angiogenic factors, such as Tie-2 and PIGF were associated with survival. Tie-2 was elevated in longer surviving patients and G-CSF led to an increase in its serum levels. Angiogenesis is mediated by the angiopoietin-1/Tie-2 system (66), and stimulation of angiogenesis by another pro-angiogenic factor, VEGF, is found to increase neurogenesis (19). G-CSF treatment led to an increase in PIGF, and PIGF was as a trend both correlated with survival and elevated in longer surviving patients. PIGF supports angiogenesis (67), and may be a marker for the angiogenic niche.

The following 18 cytokines were significantly altered by G-CSF, however, not associated with survival. As known from healthy donors (68), IL-10 was markedly increased after G-CSF treatment. This anti-inflammatory cytokine is elevated in ALS-patients with mild symptoms or slow progression (53). G-CSF application led to reduced systemic levels of the pro-inflammatory cytokines MCP-4 (CCL13), TARC, Eotaxin-1 (CCL11), and Eotaxin-3 (CCL26). MCP-4 (31, 65), TARC (31)

and Eotaxin-1 (65) are elevated in ALS serum. The latter is further associated with Alzheimer's dementia (69), aging and inhibition of neurogenesis in mice (70). We also noticed increase in levels of the pro-inflammatory cytokines CRP, SAA, IP-10 (CXCL10), IL-15, IL-12/IL-23p40, and MIP1-beta after G-CSF application. The acute-phase proteins CRP and SAA have been described as elevated in ALS patients (31, 71). IP-10 is negatively correlated with disease progression rate (72) and increase after G-CSF treatment has been described (26). IL-15 (31, 55, 73) and MIP1-beta (31) are elevated in serum of ALS patients. MIP1-beta shares receptor (CCR5) with MIP-alpha, which is elevated and considered neuroprotective in ALS (74). MIP-1 beta is negatively correlated with disease severity and progression rate, and thus might exert neuroprotective effects in ALS (72). IL-12/IL-23p40 describes the p40 subunit shared by the cytokines IL-12 and IL-23, and is considered a pro-inflammatory marker. However, we noted no increase in cytokines induced by IL-12/IL-23p40, such as INF-gamma and IL-17A, after G-CSF treatment. Aside from neuroinflammation, impaired neurotrophic support is a hallmark of ALS. Levels of VEGF-A and Flt-1 were increased, whereas VEGF-C, VEGF-D, and bFGF levels were decreased after G-CSF application. VEGF-A and bFGF, two common neurotrophic and possibly protective factors in ALS (55), are both increased in ALS CSF (64). Further, VEGF-A supports neurogenesis and neural development and is an attractant for HSPC that has been associated with longer survival in ALS (55). We found an increase in ICAM-1 and VCAM-1 after G-CSF treatment. At the vascular endothelium these cellular adhesion molecules are involved in leukocyte transport (75), but their role in ALS is unclear.

In ALS, a short time delay for diagnosis is associated with inferior prognosis as these patients are likely to have a more aggressive disease (76). Accordingly, we observed a briefer latency between diagnosis and treatment initiation in patients with shorter survival, which might reflect a more rapid progression of disease in these patients. Hence, longer surviving patients presumably initiated treatment at a later pathophysiological stage of their disease. This might offer an explanation for the fact that levels of some pro-inflammatory cytokines such as IL-16, IL-17A, and IL-8 were associated with longer survival. However, the role of inflammatory markers in ALS is unclear and our findings may also indicate that inflammation does not only negatively impact the disease (71). The remaining relation between cytokines and survival seen in our cohort highlights the importance of these markers in predicting individual survival. Thus, different cytokines may be used as biomarkers for initial patient stratification, predicting later clinical course, monitoring treatment response and progression of disease.

Possible direct effects of G-CSF upon the CNS were not assessed, as we did not obtain post-mortem analysis of deceased patients. Neuroimaging studies conducted on our G-CSF treated patient cohort (77) did not directly address possible G-CSF related structural effects—we also had no patient control group without G-CSF treatment. One indirect mode of action by which G-CSF exerts neuroprotective effects may be through polarization of the immune system toward an anti-inflammatory

state (13). We observed an increase in anti-inflammatory cytokines and neurotrophic factors as well as a decrease in pro-inflammatory cytokines. However, we also captured an increase in some pro-inflammatory cytokines, which might be due to the pleiotropic effects of G-CSF and possibly reflect an unspecific cytokine reaction after application. Overall, the effects of G-CSF on peripheral cytokine levels and ALS appear to be versatile and should be assessed in a prospective clinical study.

Strengths and Limitations

This retrospective analysis has several limitations. Firstly, we have not conducted a controlled clinical trial and thus, there was no placebo-arm. Rather, the aim of the intervention was to offer individual ALS patients a potentially beneficial off-label treatment with G-CSF. Evaluation of respiratory function was driven by clinical indication and not systematically assessed. Hence, we did not regularly screen for respiratory deficits upon treatment initiation. The same applied to assessment of cognitive function. In addition, we did not systematically analyze for ALS-specific gene mutations. Such factors have predictive value concerning prognosis (78), the lack of initial screening of respiratory and cognitive function as well as genetic background might impede interpretation of the data. Given the objective of evaluating safety of G-CSF and the absence of a control group, in this paper we assessed survival from time of diagnosis, and not from treatment initiation. The latency between symptom onset and diagnosis was not assessed in this report. This is a limitation, as quantification of diagnostic delay - being associated with longer survival (78), could have offered prognostic implications. During the experimental treatment, patients were routinely seen on an outpatient basis to monitor safety and blood samples were regularly obtained. This enabled a dynamic observation of alterations in neuroinflammation due to ALS disease and treatment with G-CSF over time. However, with only 36 G-CSF treated patients caution should be applied in trying to generalize our findings. Moreover, application and dosing schemes for G-CSF treatment were decided upon on an individual patient level and thus complicated the establishment of dose-effect relationships. When we analyze cytokine levels upon treatment initiation in our patient cohort retrospectively, we have to take into account that these patients differ concerning covariant factors such as age, gender, bulbar vs. spinal-onset, and functional status (ALSFRS-R). Given the small number of patients treated with G-CSF, a statistical evaluation of the predictive value of these subpopulations was not reasonable. There was also great heterogeneity in the latency between time of diagnosis and treatment initiation. Cytokine levels alter during progression of disease. Altogether, these aspects lead to a reduced statistical power, which may also provide an explanation for the variation and modest correlation seen between initial cytokine levels and survival. Moreover, we found that cytokine comparisons in long and short surviving patients did not withstand correction for multiple testing. These signals may be of biological relevance, as they were detected in spite of a small number of patients and great disease heterogeneity, and thus may assist in hypothesis generation for future studies.

CONCLUSION

Altogether, we found that long term G-CSF treatment is feasible and safe for ALS patients. G-CSF efficiently mobilized hematopoietic stem cell into peripheral blood, and the amount of mobilized stem cells was associated with longer survival. Thus, stem cell mobilization could be a potential biomarker to monitor treatment response to G-CSF. Peripheral cytokines are relevant in the course of disease in ALS. We identified TNF-beta, MDC, IL-16, IL-7, and Tie-2 as cytokines whose baseline levels may predict G-CSF treatment response and survival. Additionally, long term G-CSF treatment led to sustained alterations of multiple cytokines in peripheral blood. Thus, cytokines represent potential biomarkers for survival prediction and for early monitoring of G-CSF treatment in ALS, all of which need further validation in a prospective controlled randomized trial.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

SJ care for ALS patients, conception of intervention, analysis, interpretation, wrote the manuscript. UB clinical responsibility for intervention. UB, WS-M, and VS care for ALS patients, conception of intervention and analysis, revision of the manuscript. T-HB conception of intervention and analysis, revision of the manuscript. BB contribution to analysis, revision

of the manuscript. A-LM care for ALS patients, revision of the manuscript. TK organization of care and disposition of patient material. SP and EW performed cytokine experiments, revision of the manuscript. SI and JG performed and analyzed HSPC experiments, revision of the manuscript. AS and WH revision of the manuscript.

FUNDING

Biomarker analysis was funded by BMBF grant GO-Bio CampoNeuro, and BayMWiT grant CrossTalk.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to all participating patients and their families. The authors are thankful to Andrei Khomenko (MD), Dobri Baldaranov (MD), Jenni Rösl (MD) and Ohnmar Hsam (MD) for sustained treatment of patients, and to Ines Kobor (MS) for assistance in maintenance of the database.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fneur.2018.00971/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Hardiman O, van den Berg LH, Kiernan MC. Clinical diagnosis and management of amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Rev Neurol*. (2011) 7:639–49. doi: 10.1038/nrneuro.2011.153
- Alonso A, Logrosino G, Jick SS, Hernán MA. Incidence and lifetime risk of motor neuron disease in the United Kingdom: a population-based study. *Eur J Neurol*. (2009) 16:745–51. doi: 10.1111/j.1468-1331.2009.02586.x
- Hardiman O, Al-Chalabi A, Chiò A, Corr EM, Logrosino G, Robberecht W, et al. Amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Dis Primers*. (2017) 3:17071–19. doi: 10.1038/nrdp.2017.71
- Traxinger K, Kelly C, Johnson BA, Lyles RH, Glass JD. Prognosis and epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: Analysis of a clinic population, 1997–2011. *Neurology* (2013) 3:313–20. doi: 10.1212/CPJ.0b013e3182a1b8ab
- Lacomblez L, Bensimon G, Leigh PN, Guillet P, Meininger V. Dose-ranging study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. Amyotrophic Lateral Sclerosis/Riluzole Study Group II. *Lancet* (1996) 347:1425–31. doi: 10.1016/S0140-6736(96)91680-3
- Abe K, Aoki M, Tsuji S, Itoyama Y, Sobue G, Togo M, et al. Safety and efficacy of edaravone in well defined patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol*. (2017) 16:505–12. doi: 10.1016/S1474-4422(17)30115-1
- Becher B, Spath S, Goverman J. Cytokine networks in neuroinflammation. *Nature Publishing Group* (2017) 17:49–59. doi: 10.1038/nri.2016.123
- Demetri GD, Griffin JD. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood*. (1991) 78:2791–808.
- Welte K, Platzer E, Lu L, Gahrilove JL, Levi E, Mertelsmann R, et al. Purification and biochemical characterization of human pluripotent hematopoietic colony-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. (1985) 82:1526–30. doi: 10.1073/pnas.82.5.1526
- Hartung T. Anti-inflammatory effects of granulocyte colony-stimulating factor. *Curr Opin Hematol*. (1998) 5:221–5. doi: 10.1097/00062752-199805000-00013
- Root RK, Dale DC. Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: comparisons and potential for use in the treatment of infections in nonneutropenic patients. *J Infect Dis*. (1999) 179 (Suppl 2):S342–52. doi: 10.1086/513857
- Schneider A, Krüger C, Steigleder T, Weber D, Pitzer C, Laage R, et al. The hematopoietic factor G-CSF is a neuronal ligand that counteracts programmed cell death and drives neurogenesis. *J Clin Invest*. (2005) 115:2083–98. doi: 10.1172/JCI23559
- Wallner S, Peters S, Pitzer C, Resch H, Bogdahn U, Schneider A. The Granulocyte-colony stimulating factor has a dual role in neuronal and vascular plasticity. *Front Cell Dev Biol*. (2015) 3:1–13. doi: 10.3389/fcell.2015.00048
- Henriques A, Pitzer C, Dupuis L, Schneider A. G-CSF protects motoneurons against axotomy-induced apoptotic death in neonatal mice. *BMC Neurosci*. (2010) 11:25. doi: 10.1186/1471-2202-11-25
- Dietrich J, Baryawno N, Nayyar N, Valtis YK, Yang B, Ly I, et al. Bone marrow drives central nervous system regeneration after radiation injury. *J Clin Invest*. (2018) 128:281–93. doi: 10.1172/JCI90647
- Koda M, Nishio Y, Kamada T, Someya Y, Okawa A, Mori C, et al. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) mobilizes bone marrow-derived cells into injured spinal cord and promotes functional recovery after compression-induced spinal cord injury in mice. *Brain Research*. (2007) 1149:223–31. doi: 10.1016/j.brainres.2007.02.058
- Xiao B-G, Lu C-Z, Link H. Cell biology and clinical promise of G-CSF: immunomodulation and neuroprotection. *J Cell Mol Med*. (2007) 11:1272–90. doi: 10.1111/j.1582-4934.2007.00101.x
- Schneider A, Kuhn H-G, Schäbitz W-R. A role for G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) in the central nervous system. *Cell Cycle*. (2005) 4:1753–7. doi: 10.4161/cc.4.12.2213
- Schanzer A, Wachs FP, Wilhelm D, Acker T, Cooper-Kuhn C, Beck H, et al. Direct stimulation of adult neural stem cells in vitro and neurogenesis in vivo by vascular endothelial growth factor. *Brain Pathol*. (2004) 14:237–48. doi: 10.1111/j.1750-3639.2004.tb00060.x
- Henriques A, Pitzer C, Dittgen T, Klugmann M, Dupuis L, Schneider A. CNS-targeted viral delivery of G-CSF in an animal model for ALS: improved efficacy and preservation of the neuromuscular unit. *Mol Ther*. (2011) 19:284–92. doi: 10.1038/mt.2010.271

21. Schneider A, Pitzer C, Henriques A, Kruger C, Plaas C, Kirsch F, et al. Granulocyte-colony stimulating factor improves outcome in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* (2008) 131:3335–47. doi: 10.1093/brain/awn243
22. Pollari E, Savchenko E, Jaronen M, Kanninen K, Malm T, Wojciechowski S, et al. Granulocyte colony stimulating factor attenuates inflammation in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroinflamm.* (2011) 8:74. doi: 10.1186/1742-2094-8-74
23. Zhang Y, Wang L, Fu Y, Song H, Zhao H, Deng M, et al. Preliminary investigation of effect of granulocyte colony stimulating factor on amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler.* (2009) 10:430–1. doi: 10.3109/17482960802588059
24. Nefussy B, Artamonov I, Deutsch V, Naparstek E, Nagler A, Drory VE. Recombinant human granulocyte-colony stimulating factor administration for treating amyotrophic lateral sclerosis: a pilot study. *Amyotroph Lateral Scler.* (2010) 11:187–93. doi: 10.3109/17482960902933809
25. Grassinger J, Khomenko A, Hart C, Baldaranov D, Johannesen S, Mueller G, et al. Safety and feasibility of long term administration of recombinant human granulocyte-colony stimulating factor in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Cytokine* (2014) 67:21–8. doi: 10.1016/j.cyto.2014.02.003
26. Chiò A, Mora G, Bella VL, Caponnetto C, Mancardi G, Sabatelli M, et al. Repeated courses of granulocyte colony-stimulating factor in amyotrophic lateral sclerosis: clinical and biological results from a prospective multicenter study. *Muscle Nerve* (2011) 43:189–95. doi: 10.1002/mus.21851
27. Duning T, Schiffbauer H, Warnecke T, Mohammadi S, Floel A, Kolpatzik K, et al. G-CSF Prevents the progression of structural disintegration of white matter tracts in amyotrophic lateral sclerosis: a pilot trial. *PLoS ONE* (2011) 6:e17770. doi: 10.1371/journal.pone.0017770
28. Brooks BR, Miller RG, Swash M, Munsat TL, World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases. El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord.* (2000) 1:293–9. doi: 10.1080/146608200300079536
29. Cedarbaum JM, Stambler N, Malta E, Fuller C, Hilt D, Thurmond B, et al. The ALSFRS-R: a revised ALS functional rating scale that incorporates assessments of respiratory function. *J Neurol Sci.* (1999) 169:13–21. doi: 10.1016/S0022-510X(99)00210-5
30. Banks WA. The blood-brain barrier in neuroimmunology: tales of separation and assimilation. *Brain Behav Immun.* (2015) 44:1–8. doi: 10.1016/j.bbi.2014.08.007
31. Peters S, Zitzelsperger E, Kuespert S, Iberl S, Heydn R, Johannesen SW, et al. The TGF- β System As a Potential Pathogenic Player in Disease Modulation of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front Neurol.* (2017) 8:181–20. doi: 10.3389/fneur.2017.00669
32. Ransohoff RM. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science* (2016) 353:777–83. doi: 10.1126/science.aag2590
33. Vu LT, Bowser R. Fluid-based biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis. *Neurotherapeutics* (2017) 14:119–34. doi: 10.1007/s13311-016-0503-x
34. Roberts AW. G-CSF: A key regulator of neutrophil production, but that's not all! *Growth Factors* (2005) 23:33–41. doi: 10.1080/08977190500055836
35. Martins A, Han J, Kim SO. The multifaceted effects of granulocyte colony-stimulating factor in immunomodulation and potential roles in intestinal immune homeostasis. *IUBMB Life* (2010) 62:611–7. doi: 10.1002/iub.361
36. Hartung T, Döcke WD, Gantner F, Krieger G, Sauer A, Stevens P, et al. Effect of granulocyte colony-stimulating factor treatment on ex vivo blood cytokine response in human volunteers. *Blood.* (1995) 85:2482–9. Available online at: <http://www.bloodjournal.org/content/85/9/2482>
37. Henriques A, Pitzer C, Schneider A. Neurotrophic growth factors for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis: where do we stand? *Front Neurosci.* (2010) 4:32. doi: 10.3389/fnins.2010.00032
38. Skokowa J, Dale DC, Touw IP, Zeidler C, Welte K. Severe congenital neutropenias. *Nat Rev Dis Primers* (2017) 3:17032. doi: 10.1038/nrdp.2017.32
39. Dale DC, Bolyard A, Marrero T, Makaryan V, Bonilla M, Link DC, et al. Long-term effects of G-CSF therapy in cyclic neutropenia. *N Engl J Med.* (2017) 377:2290–2. doi: 10.1056/NEJM1709258
40. Sobrino T, Arias S, Pérez-Mato M, Agulla J, Brea D, Rodríguez-Yáñez M, et al. Cd34⁺ progenitor cells likely are involved in the good functional recovery after intracerebral hemorrhage in humans. *J Neurosci Res.* (2011) 89:979–85. doi: 10.1002/jnr.22627
41. Saito M, Kiyokawa N, Taguchi T, Suzuki K, Sekino T, Mimori K, et al. Granulocyte colony-stimulating factor directly affects human monocytes and modulates cytokine secretion. *Exp Hematol.* (2002) 30:1115–23. doi: 10.1016/S0301-472X(02)00889-5
42. D'Aveni M, Rossignol J, Coman T, Sivakumaran S, Henderson S, Manzo T, et al. G-CSF mobilizes CD34⁺ regulatory monocytes that inhibit graft-versus-host disease. *Sci Transl Med.* (2015) 7:281ra42–2. doi: 10.1126/scitranslmed.3010435
43. Hu Y, Cao C, Qin X-Y, Yu Y, Yuan J, Zhao Y, et al. Increased peripheral blood inflammatory cytokine levels in amyotrophic lateral sclerosis: a meta-analysis study. *Sci Rep.* (2017) 7:9094. doi: 10.1038/s41598-017-09097-1
44. Lu C-H, Allen K, Oei F, Leoni E, Kuhle J, Tree T, et al. Systemic inflammatory response and neuromuscular involvement in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* (2016) 3:e244–11. doi: 10.1212/NXI.0000000000000244
45. Poloni M, Facchetti D, Mai R, Micheli A, Agnoletti L, Francolini G, et al. Circulating levels of tumour necrosis factor-alpha and its soluble receptors are increased in the blood of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett.* (2000) 287:211–4. doi: 10.1016/S0304-3940(00)01177-0
46. Cereda C, Baiocchi C, Bongioanni P, Cova E, Guareschi S, Metelli MR, et al. TNF and sTNFR1/2 plasma levels in ALS patients. *J Neuroimmunol.* (2008) 194:123–31. doi: 10.1016/j.jneuroim.2007.10.028
47. Babu GN, Kumar A, Chandra R, Puri SK, Kalita J, Misra UK. Elevated inflammatory markers in a group of amyotrophic lateral sclerosis patients from Northern India. *Neurochem Res.* (2008) 33:1145–9. doi: 10.1007/s11064-007-9564-x
48. Tortarolo M, Coco Lo D, Veglianesi P, Vallarola A, Giordana MT, Marcon G, et al. Review article amyotrophic lateral sclerosis, a multisystem pathology: insights into the role of TNF. *Mediators Inflamm.* (2017) 2017:2985051. doi: 10.1155/2017/2985051
49. Figiel I. Pro-inflammatory cytokine TNF-alpha as a neuroprotective agent in the brain. *Acta Neurobiol Exp.* (2008) 68:526–34.
50. Fischer R, Maier O, Siegemund M, Wajant H, Scheurich P, Pfizenmaier K. A TNF receptor 2 selective agonist rescues human neurons from oxidative stress-induced cell death. *PLoS ONE* (2011) 6:e27621–11. doi: 10.1371/journal.pone.0027621
51. Dolga AM, Granic I, Blank T, Knaus H-G, Spiess J, Luiten PGM, et al. TNF- α mediates neuroprotection against glutamate-induced excitotoxicity via NF- κ B-dependent up-regulation of K Ca2.2 channels. *J Neurochem.* (2008) 107:1158–67. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05701.x
52. Börjesson A, Grundmark B, Olsson H, Waldenlind L. Is there a link between amyotrophic lateral sclerosis and treatment with TNF-alpha inhibitors? *Ups J Med Sci.* (2013) 118:199–200. doi: 10.3109/03009734.2013.785999
53. Furukawa T, Matsui N, Fujita K, Nodera H, Shimizu F, Miyamoto K, et al. CSF cytokine profile distinguishes multifocal motor neuropathy from progressive muscular atrophy. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* (2015) 2:e138. doi: 10.1212/NXI.0000000000000138
54. Henkel JS, Engelhardt JI, Siklós L, Simpson EP, Kim SH, Pan T, et al. Presence of dendritic cells, MCP-1, and activated microglia/macrophages in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue. *Ann Neurol.* (2004) 55:221–35. doi: 10.1002/ana.10805
55. Guo J, Yang X, Gao L, Zang D. Evaluating the levels of CSF and serum factors in ALS. *Brain Behav.* (2017) 7:e00637–8. doi: 10.1002/brb3.637
56. Baron P, Bussini S, Cardin V, Corbo M, Conti G, Galimberti D, et al. Production of monocyte chemoattractant protein-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve.* (2005) 32:541–4. doi: 10.1002/mus.20376
57. Rodríguez-Cortés O, Vela-Ojeda J, López-Santiago R, Montiel-Cervantes L, Reyes-Maldonado E, Estrada-García I, et al. Granulocyte colony-stimulating factor produces a decrease in IFN γ and increase in IL-4 when administered to healthy donors. *J Clin Apher.* (2010) 25:181–7. doi: 10.1002/jca.20234
58. Aebischer J, Cassina P, Otsmane B, Mouden A, Seilhean D, Meininger V, et al. IFN γ triggers a LIGHT-dependent selective death of motoneurons contributing to the non-cell-autonomous effects of mutant SOD1. *Cell Death Differ.* (2011) 18:754–68. doi: 10.1038/cdd.2010.143

59. Liu J, Gao L, Zang D. Elevated levels of IFN- γ in CSF and Serum of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS ONE* (2015) 10:e0136937. doi: 10.1371/journal.pone.0136937
60. McFadden C, Morgan R, Rahangdale S, Green D, Yamasaki H, Center D, et al. Preferential migration of T regulatory cells induced by IL-16. *J Immunol.* (2007) 179:6439–45. doi: 10.4049/jimmunol.179.10.6439
61. Henkel JS, Beers DR, Wen S, Rivera AL, Toennis KM, Appel JE, et al. Regulatory T-lymphocytes mediate amyotrophic lateral sclerosis progression and survival. *EMBO Mol Med.* (2013) 5:64–79. doi: 10.1002/emmm.201201544
62. Fiala M, Chattopadhyay M, La Cava A, Tse E, Liu G, Lourenco E, et al. IL-17A is increased in the serum and in spinal cord CD8 and mast cells of ALS patients. *J Neuroinflamm.* (2010) 7:76. doi: 10.1186/1742-2094-7-76
63. Rentzos M, Rombos A, Nikolaou C, Zoga M, Zouvelou V, Dimitrakopoulos A, et al. Interleukin-17 and interleukin-23 are elevated in serum and cerebrospinal fluid of patients with ALS: a reflection of Th17 cells activation? *Acta Neurol Scand.* (2010) 122:425–9. doi: 10.1111/j.1600-0404.2010.01333.x
64. Mitchell RM, Freeman WM, Randazzo WT, Stephens HE, Beard JL, Simmons Z, et al. A CSF biomarker panel for identification of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* (2009) 72:14–9. doi: 10.1212/01.wnl.0000333251.36681.a5
65. Kuhle J, Lindberg RLP, Regeniter A, Mehling M, Steck AJ, Kappos L, et al. Increased levels of inflammatory chemokines in amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurol.* (2009) 16:771–4. doi: 10.1111/j.1468-1331.2009.02560.x
66. Zacharek A, Chen J, Li A, Cui X, Li Y, Roberts C, et al. Angiopoietin1/TIE2 and VEGF/FLK1 induced by MSC treatment amplifies angiogenesis and vascular stabilization after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* (2007) 27:1684–91. doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600475
67. Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci.* (2005) 109:227–41. doi: 10.1042/CS20040370
68. Fidyk W, Mitrus I, Ciomber A, Smagur A, Chwieduk A, Głowala-Kosinska M, et al. Evaluation of proinflammatory and immunosuppressive cytokines in blood and bone marrow of healthy hematopoietic stem cell donors. *Cytokine.* (2017) 102:181–6. doi: 10.1016/j.cyto.2017.09.001
69. Bettcher BM, Fitch R, Wynn MJ, Lalli MA, Eloffson J, Jastrzab L, et al. MCP-1 and eotaxin-1 selectively and negatively associate with memory in MCI and Alzheimer's disease dementia phenotypes. *Alzheim Dement.* (2016) 3:91–7. doi: 10.1016/j.dadm.2016.05.004
70. Villeda SA, Luo J, Mosher KI, Zou B, Britschgi M, Bieri G, et al. The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature* (2011) 477:90–4. doi: 10.1038/nature10357
71. Lunetta C, Lizio A, Maestri E, Sansone VA, Mora G, Miller RG, et al. Serum C-Reactive protein as a prognostic biomarker in amyotrophic lateral sclerosis. *JAMA Neurol.* (2017) 74:660–7. doi: 10.1001/jamaneurol.2016.6179
72. Tateishi T, Yamasaki R, Tanaka M, Matsushita T, Kikuchi H, Isobe N, et al. CSF chemokine alterations related to the clinical course of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroimmunol.* (2010) 222:76–81. doi: 10.1016/j.jneuroim.2010.03.004
73. Rentzos M, Rombos A, Nikolaou C, Zoga M, Zouvelou V, Dimitrakopoulos A, et al. Interleukin-15 and interleukin-12 are elevated in serum and cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Eur Neurol.* (2010) 63:285–90. doi: 10.1159/000287582
74. Yang X, Gao L, Wu X, Zhang Y, Zang D. Increased levels of MIP-1 α in CSF and serum of ALS. *Acta Neurol Scand.* (2015) 134:94–100. doi: 10.1111/ane.12513
75. Haraldsen G, Kvale D, Lien B, Farstad IN, Brandtzaeg P. Cytokine-regulated expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in human microvascular endothelial cells. *J Immunol.* (1996) 156:2558–65. Available online at: <http://www.jimmunol.org/content/156/7/2558.long>
76. Chiò A, Logrosino G, Hardiman O, Swigler R, Mitchell D, Beghi E, et al. Prognostic factors in ALS: a critical review. *Amyotroph Lateral Scler.* (2009) 10:310–23. doi: 10.3109/17482960802566824
77. Wirth AM, Khomenko A, Baldaranov D, Kobor I, Hsam O, Grimm T, et al. Combinatory biomarker use of cortical thickness, MUNIX, and ALSFRS-R at baseline and in longitudinal courses of individual patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Front Neurol.* (2018) 9:614. doi: 10.3389/fneur.2018.00614
78. Westeneng H-J, Debray TPA, Visser AE, van Eijk RPA, Rooney JPK, Calvo A, et al. Prognosis for patients with amyotrophic lateral sclerosis: development and validation of a personalised prediction model. *Lancet Neurol.* (2018) 17:423–33. doi: 10.1016/S1474-4422(18)30089-9

Conflict of Interest Statement: UB holds patents for clinical application of G-CSF in ALS, Orphan Drug Status is granted for EU and US by EMA and FDA—all within NeuroVision Pharma GmbH, Murnau, Germany.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Johannesen, Budeus, Peters, Iberl, Meyer, Kammermaier, Wirkert, Bruun, Samara, Schulte-Mattler, Herr, Schneider, Grassinger and Bogdahn. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

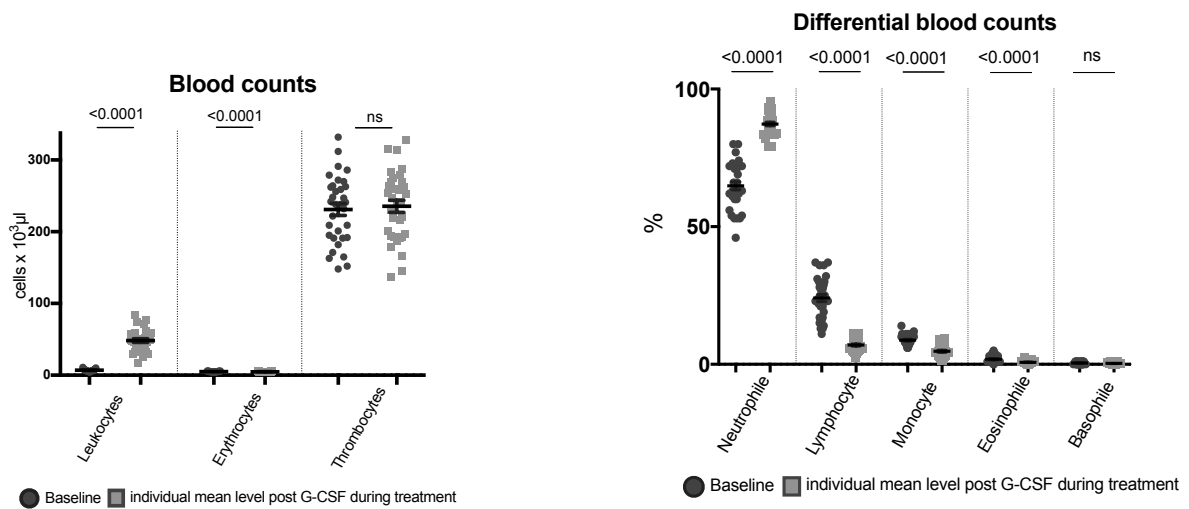


Figure S1: Effect of G-CSF on blood counts over time. Baseline indicates measurement before first G-CSF application, and is compared to individual mean level after G-CSF application over time (up to closure of data admission) in 33 patients (3 patients without baseline levels). Data are presented as scatter dot plot with mean + SEM. Paired t test, p-value (two-tailed) significant at $p < 0.05$.

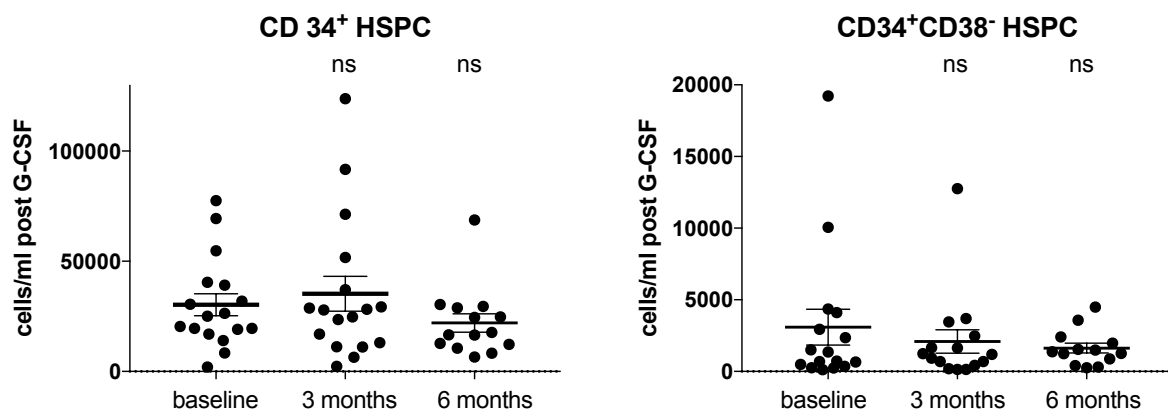
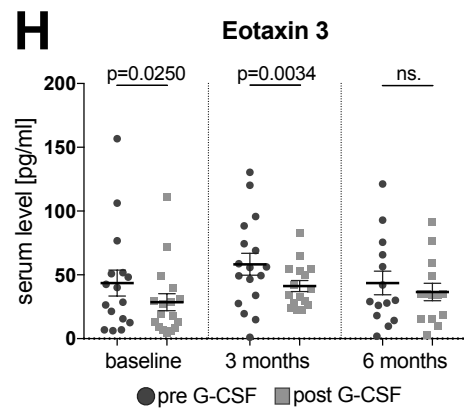
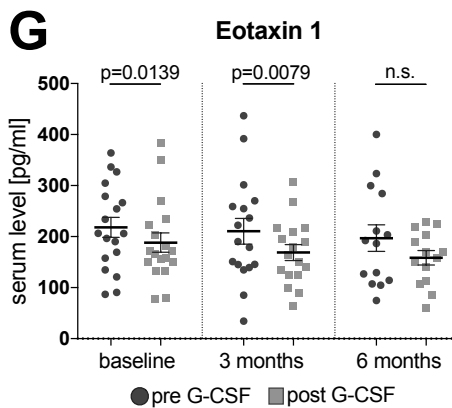
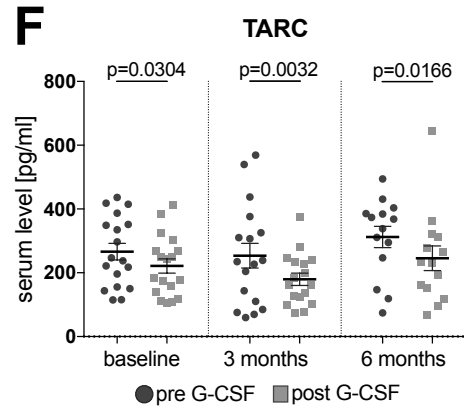
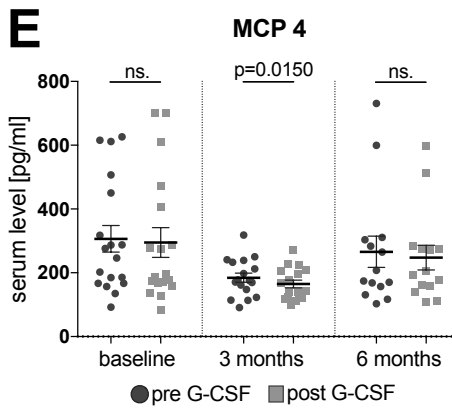
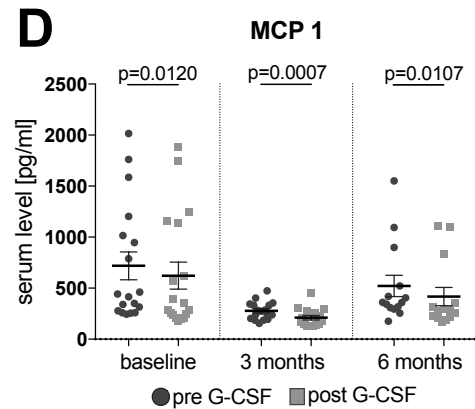
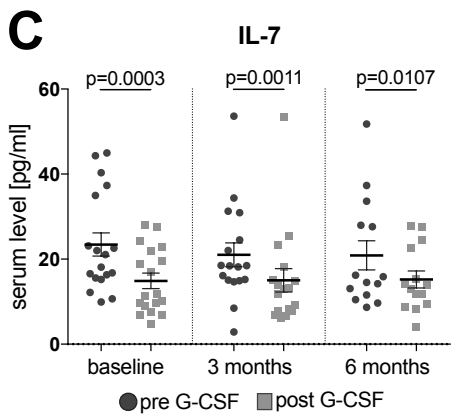
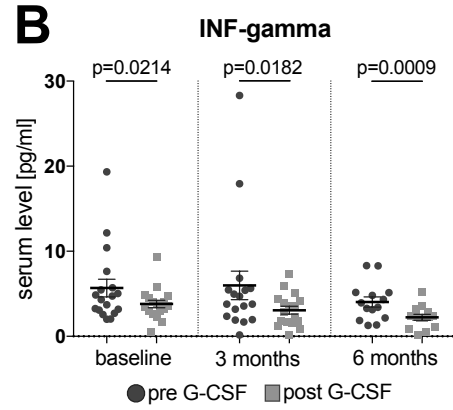
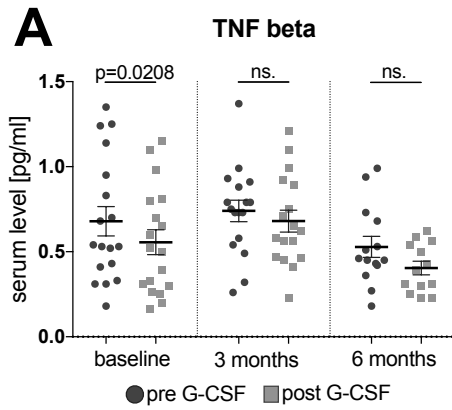
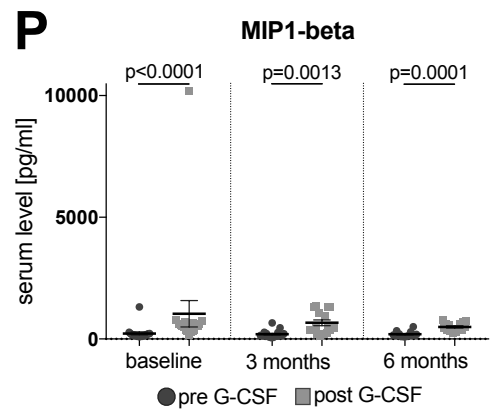
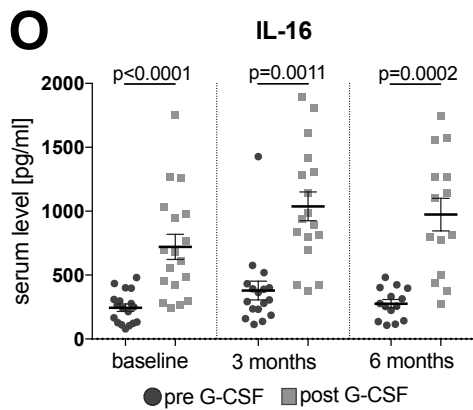
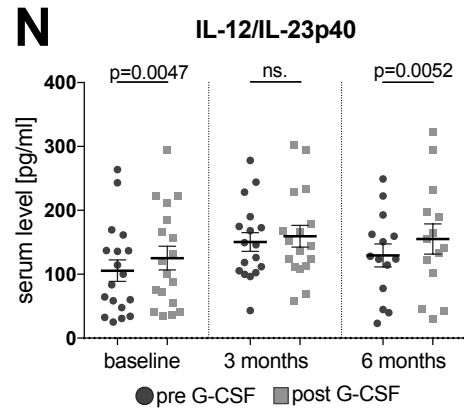
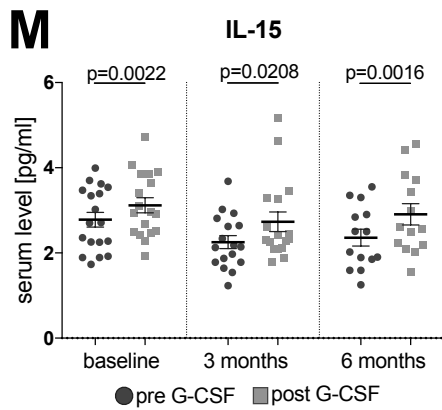
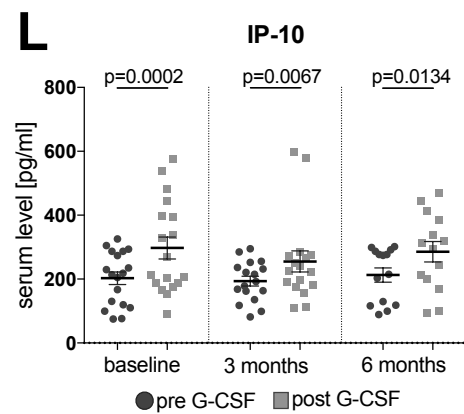
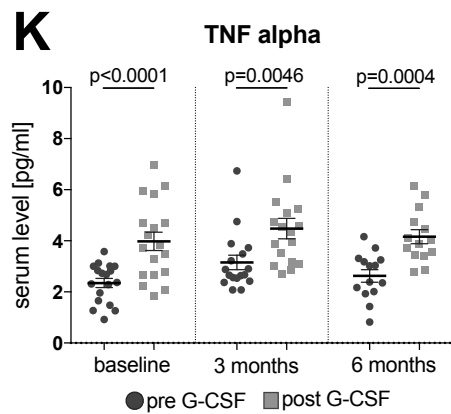
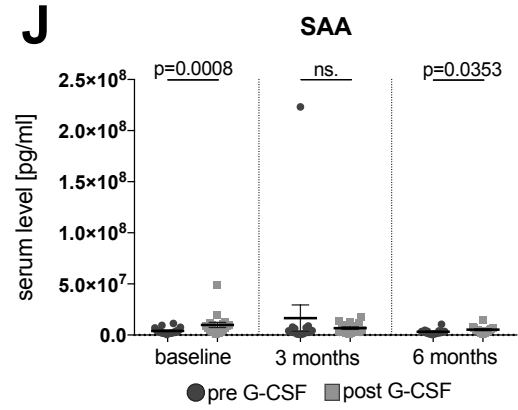
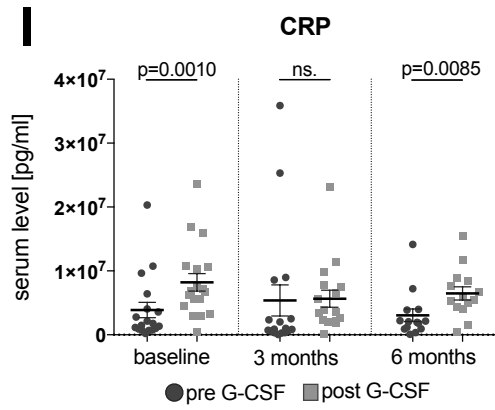
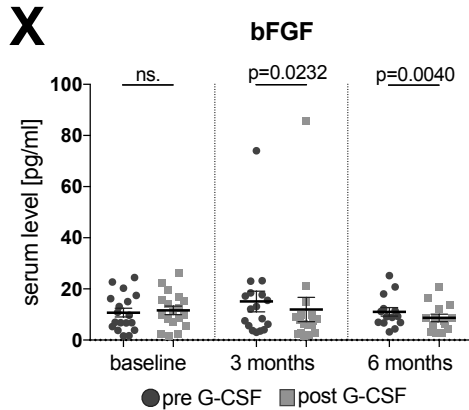
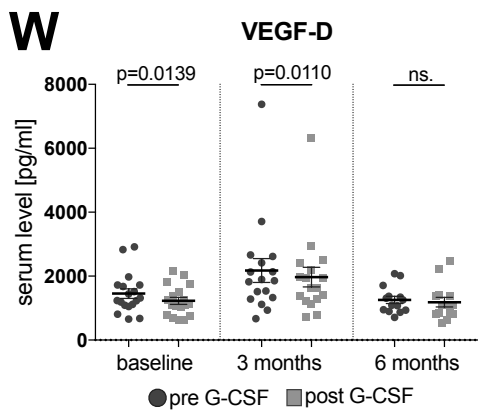
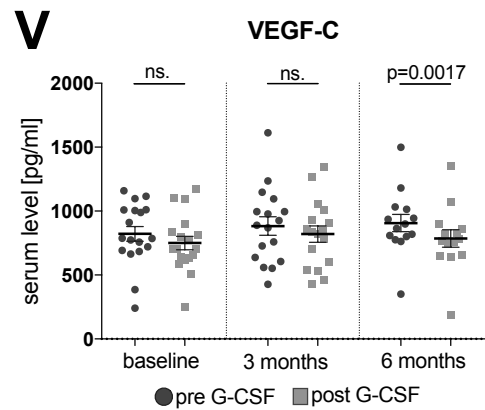
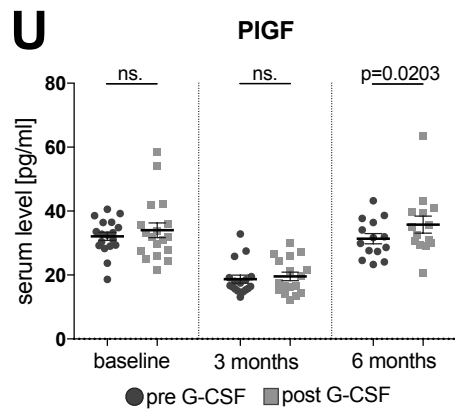
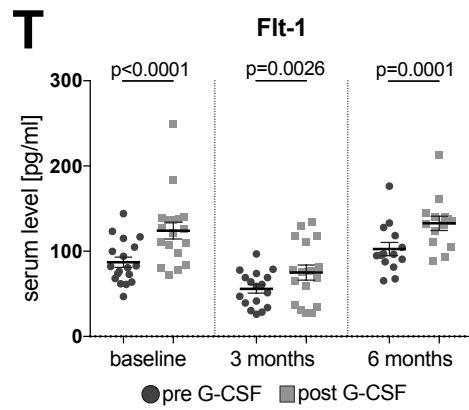
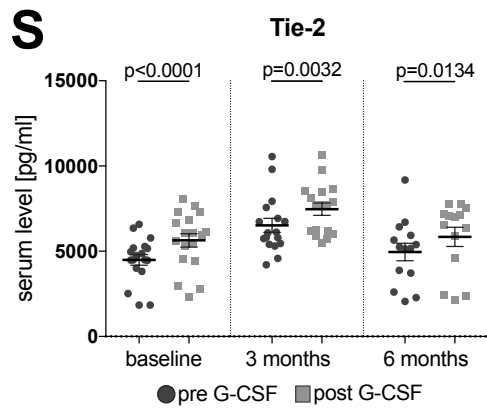
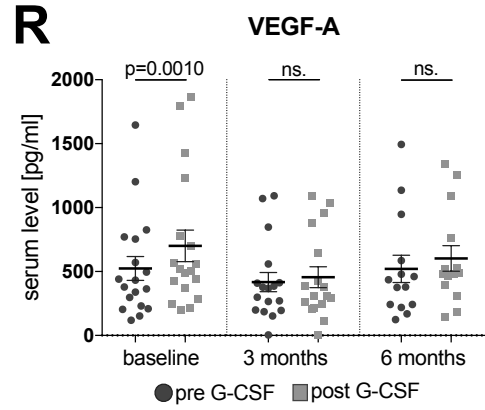
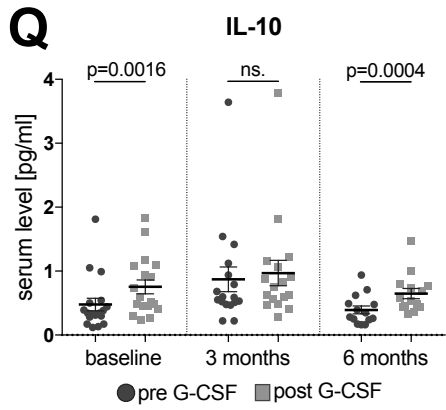


Figure S2: Hematopoietic stem cells (HSPC) after G-CSF at three time points in 17, 17 and 14 patients ($\text{CD}34^+$) and 16, 15 and 13 patients ($\text{CD}34^+\text{CD}38^-$) on five day treatment. Comparison between baseline post G-CSF level and levels at 3 and 6 months by Wilcoxon paired t test. Data are presented as scatter dot plot with mean + SEM. Paired t test, p-value (two-tailed) significant at $p < 0.05$.







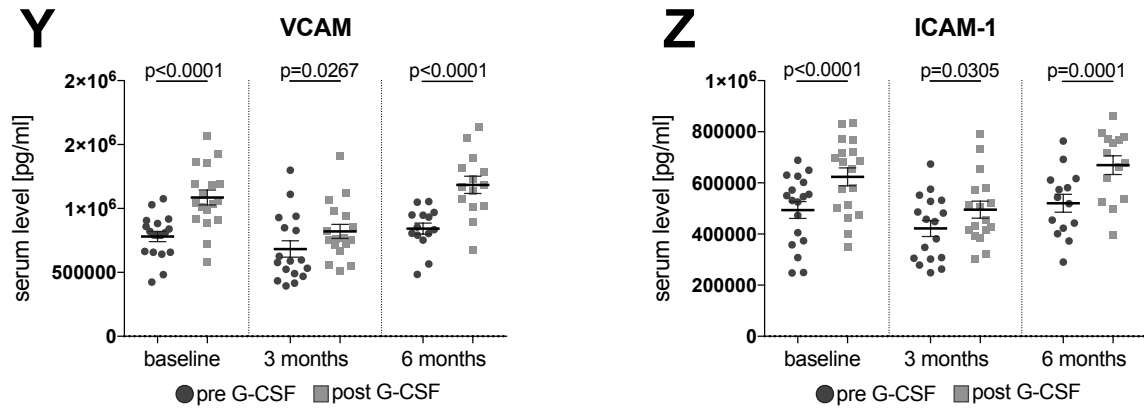


Figure S3: Immediate effect of G-CSF on cytokine levels (A-P pro-inflammatory and Q anti-inflammatory cytokines, R-X markers of angiogenesis, and Y-Z vascular injury) assessed by comparing levels (pg/ml) two 2 days before and 1 day after five-day G-CSF application at baseline (18 patients), after 3 months (17 patients), and after 6 months (14 patients) during ongoing treatment. Data are presented as scatter dot plot with mean + SEM. Paired Wilcoxon, p-value (two-tailed) significant at $p < 0.05$. T-tests were corrected for multiple testing by FDR-adjusted p-values (q-values, given in Table 3).

ALS patient		1 st month		2 nd month		3 rd month		4 th month		5 th month		6 th month	
1	Dose Application	150	A	150	A	150	A	150	A	150	A	150	A
2	Dose Application	150	A	150	A	150	A	150	A	240	A	240	A
3	Dose Application	150	A	150	A	150	A	150	A				
4	Dose Application	150	A	150	A	150	A	150	A				
5	Dose Application	150	A	150	A	240	A	240	A	240	A	240	A
6	Dose Application	150	A	150	A	150	A	150	A	150	A	150	A
7	Dose Application	240	E	240	E	240	E	240	E	240	E	240	E
8	Dose Application	150	A	150	A	150	A	150	A	150	A	150	A
9	Dose Application	150	A	150	A	90	D	90	D	150	A	150	A
10	Dose Application	150	A	150	A	150	A	150	A	150	A	240	A
11	Dose Application	150	A	150	A	240	A	300	A	300	A	300	A
12	Dose Application	240	A	300	A	300	A	300	A	300	A	300	A
13	Dose Application	150	A	150	A	150	A	150	A	150	A	150	A
14	Dose Application	192	E	192	E	192	E	192	E	192	E	192	E
15	Dose Application	192	E	192	E	192	E	192	E	192	E	192	E
16	Dose Application	150	A	300	A								
17	Dose Application	192	E	192	E	192	E	192	E	192	E	192	E
18	Dose Application	240	E	240	E	240	E	240	E	240	E	240	E

ALS patient		1 st month		2 nd month		3 rd month		4 th month		5 th month		6 th month	
19	Dose Application	150	A	150	A	150	A	150	A	150	A	150	A
20	Dose Application	240	A	192	E	192	E	192	E	192	E	192	E
21	Dose Application	150	A	150	A	150	A	150	A	150	A	150	A
22	Dose Application	240	A	240	A	480	A	480	A	480	B	480	B
23	Dose Application	150	A	300	A	300	A	300	A	300	A	510	510
24	Dose Application	150	A	300	B	300	B	480	B	510	C	510	C
25	Dose Application	240	A	300	B	300	B	300	B	300	B	480	B
26	Dose Application	240	A	480	B	480	B	480	B	480	B	900	F
27	Dose Application	240	A	240	A	480	B	720	F	720	F	720	F
28	Dose Application	480	B	480	B	480	B	480	B	480	B	480	B
29	Dose Application	150	A	450	F	450	F	720	F	720	F	720	F
30	Dose Application	450	F	450	F	450	F	720	F	720	F	720	F
31	Dose Application	240	A	720	F	720	F	720	F	720	F	720	F
32	Dose Application	450	F	720	F	720	F	720	F	720	F	720	F
33	Dose Application	450	F	450	F	450	F	720	F	720	F	720	F
34	Dose Application	480	A	450	F	450	F	720	F	1440	F	1440	F
35	Dose Application	450	F	450	G	720	G	720	F	1056	G	1056	G
36	Dose Application	300	B	480	B	480	B	720	F	1296	G	1296	G

Table S1: Dose and application over the first 6 months of G-CSF treatment. Illustration of the heterogeneity in treatment with individual doses and application modes, and change within single patients over time. Doses of G-CSF are given as cumulative monthly dose (Mio IU). Application with five-day treatment is indicated by a darker grey color and application on single days by a brighter grey color. Application termed “A”: G-CSF once or twice á day over five consecutive days á month. “B”: treatment as in “A” repeated once. “C”: treatment as in “B” with G-CSF application every second day between the five-day treatments. “D”: G-CSF on 3 days á month. “E”: G-CSF once or twice á day on a single day á week. “F”: G-CSF every second day. “G”: other combination of G-CSF on single days á week.

VI. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Ulrich Bogdahn für seine hervorragende Unterstützung, seine Aufmunterung, seine Geduld und Zugänglichkeit für Fragen und Diskussionen. Auch Wilhelm Schulte-Mattler bin ich sehr dankbar. Er war nicht nur in der oberärztlichen Betreuung der ALS-Sprechstunde eine tolle Unterstützung, sondern auch im wissenschaftlichen Diskurs. Ebenfalls herzlich bedanken möchte ich mich beim gesamten ALS-Team. In unserer Gruppe genoss ich nicht nur die Anregungen und Diskussionen, sondern auch die freundschaftliche Atmosphäre. Ich bin meinen Freunden sehr dankbar für deren langjährige Unterstützung und insbesondere für die wichtige und schöne Ablenkung – sie haben mir immer wieder bestärkende und erholsame Momente geschenkt. Einen großen Dank richte ich an meine Schwiegereltern, Angelika und Wilhelm Sanner, die bereits seit der Studienzeit bestärkend und hilfsbereit an meiner Seite standen. Insbesondere möchte ich mich bei meinen Eltern, Paula Wollebæk und Stig Arve Johannesen, sowie bei Einar Gudlaugsson bedanken. Sie haben mich all die Jahre uneingeschränkt unterstützt, bestärkt und mich stets aufgemuntert, meine Ziele zu verfolgen. Meine größte Dankbarkeit richtet sich an meine Ehefrau, Lisa Sanner, die mich durch die lange Zeit stets unterstützend, motivierend und verständnisvoll begleitet hat, ihr möchte ich meine Arbeit widmen.

Regensburg, November 2018

VII. Lebenslauf

