

## **Jahrestagung, 13. bis 16. Juli 2006 in Cincinnati/Ohio, USA** **Duchenne-Muskeldystrophie: Die Wege zur Therapie werden kürzer.**

**Face it! Live it! Change it!** Dies war das Motto der Jahrestagung des *Parent Project Muscular Dystrophy* (PPMD), die vom 13. bis 16. Juli 2006 in Cincinnati/Ohio in den USA stattfand. Sechsendreißig Wissenschaftler und klinische Experten für Muskelkrankheiten sprachen zunächst über die Duchenne-Muskeldystrophie und die verschiedenen Wege zu einer Therapie (Face it!), dann über die medizinische Betreuung der kranken Jungen (Live it!), und schließlich über ihre neuesten Forschungsergebnisse, die einer wirksamen Behandlung immer näherkommen (Change it!). Ich, *Günter Scheuerbrandt*, ein deutscher Biochemiker, wurde von *Patricia Furlong*, der Gründerin und Präsidentin des PPMD gebeten, diesen Bericht für Euch zu schreiben, die kranken Jungen und ihre Familien, die jeden erfolgreichen Schritt auf dem Weg zu einer wirksamen Behandlung kennen möchten.

Der Bericht enthält Zusammenfassungen nur der wissenschaftlichen Vorträge, denn ich bin kein klinischer Spezialist. Der Bericht ist keine wissenschaftliche Veröffentlichung, und er ist so geschrieben, daß Ihr ihn hoffentlich versteht. Die meisten wissenschaftlichen Ausdrücke werden am Anfang erklärt und andere später, wenn sie zum ersten Mal benutzt werden.

Alle Wissenschaftler, deren Vorträge ich besprochen habe, hatten die Gelegenheit, die erste Version meines Textes zu sehen und zu korrigieren, wenn das nötig war, und alle haben dies getan. Deshalb sollte es im Bericht kaum Fehler geben.

Am Anfang jeder Zusammenfassung nenne ich die Wissenschaftler nur mit ihrem Namen ohne ihre Titel, die meisten sind Professoren und alle haben entweder einen medizinischen (MD) oder wissenschaftlichen (PhD) Dokortitel oder beide. Und fast alle sind die Leiter von Laboratorien, das heißt, sie haben Kollegen, Assistenten und Studenten, die in einem *Team*, einer Arbeitsgruppe, gemeinsam an den besprochenen Projekten arbeiten. Es ist nicht möglich, alle ihre Namen zu nennen.

Die korrekte Übersetzung von *exon skipping* ist *Überspringen von Exons*. Aber der englische Ausdruck ist kürzer und wird auch beim Deutschsprechen von den Wissenschaftlern gern gebraucht, so daß ich ihn auch hier einfach wie zwei verbundene deutsche Substantive benutze: *das Exon-Skipping*. Und selbst das Verb *to skip* konjugiere ich wie ein deutsches Verb: z.B. *skippen* und *geskippt*.

Diese schlimme Krankheit, Duchenne-Muskeldystrophie, verliert langsam ihre Kraft, das wurde deutlich, nachdem wir die Vorträge über so viele neue Forschungsergebnisse hörten. Sie wird langsam Schritt für Schritt besiegt von engagierten Menschen, die für uns in vielen Ländern arbeiten. Der folgende Text wird es zeigen.

### **Einleitung**

Der Bericht beginnt mit Abschnitten über einige Grundlagen darüber, wie die Gene Proteine machen, warum Dystrophin so wichtig ist, welche Forschungswege beschränkt werden und wie *Exon-Skipping* funktioniert, mit dem man, meiner Meinung nach, zur Zeit am weitesten vorangekommen ist. Auf dem Treffen gaben *Lee Sweeney* von der Universität von Pennsylvania in Philadelphia, *Dominic Wells* vom Imperial College in London, und *Steve Wilton* von der Universität von West-Australien in Perth ausführliche Erklärungen zu allen vier Themen. Ich habe viele, aber nicht alle ihrer Erklärungen in den ersten Abschnitten erwähnt, jedoch ohne ihre Beiträge auseinanderzuhalten. Nach dieser Einleitung werden die Vorträge einzeln besprochen, in manchen Fällen mit zusätzlichen Erklärungen.

**Wie machen die Gene Proteine?** Gene sind funktionelle Einheiten des genetischen Materials **Deoxyribonukleinsäure**, international abgekürzt **DNA**. Ihre Struktur sieht wie eine verdrehte Leiter aus, die *Doppelhelix*. Jede Stufe dieser Leiter besteht aus jeweils zwei von vier verschiede-

nen kleinen Molekülen, den **Basen Adenin, Guanin, Thymin** und **Cytosin**, abgekürzt A, G, T, C. Aus Raumgründen können die Stufen nur zwei verschiedene Basenkombinationen enthalten, die **Basenpaare** A-T und G-C. Deshalb ist die **Sequenz**, die Reihenfolge dieser Basen auf einem Strang der Leiter *komplementär* zur Sequenz des anderen Stranges. Die Sequenz der Basen, der "genetischen Buchstaben", ist die genetische Information für die Entwicklung und Erhaltung eines lebenden Organismus, die von Generation zu Generation weitergegeben wird.

Die meisten Gene enthalten die Information für die Konstruktion von **Proteinen**. Im Zellkern wird die Instruktion der aktiven Gene **exprimiert**, sie wird kopiert, **transkribiert**, auf eine andere genetische Substanz, die "**pre-messenger**"-**Ribonukleinsäure** oder **pre-mRNA**, auch **Transkript** genannt. Die meisten Gene bestehen aus aktiven Regionen, den **Exons**, die die Information für die Herstellung der Proteine enthalten, und den "inaktiven" Regionen, den oft wesentlich längeren **Introns**, die jedoch wahrscheinlich wichtig für die Kontrolle der Gen-Aktivität

sind. Nach der Transkription werden die Introns aus der pre-mRNA entfernt und die Exons zur "**messenger**"-RNA, mRNA zusammengespleißt. Die mRNA wandert dann zu den Protein-synthetisierenden Strukturen, den **Ribosomen**, außerhalb des Zellkerns. Die Ribonukleinsäuren, RNAs, verwenden die Base U, *Uracil*, anstelle der sehr ähnlichen Base T der DNA. **Spleißstellen** sind bestimmte Sequenzen innerhalb der Exons und an den Exon-Intron-Grenzen, die für die präzise Entfernung der Intron-Sequenzen aus der pre-mRNA notwendig sind. Das Spleißen selbst wird von den **Spleißosomen**, einem Komplex vieler kurzer RNAs und Proteine ausgeführt.

In der Boten-RNA bedeuten, determinieren, immer drei aufeinanderfolgende Basen, ein **Codon**, *Triplet* oder "genetisches Wort", mit drei Ausnahmen, eine von 20 verschiedenen **Aminosäuren** gemäß des **genetischen Codes**. Es gibt keine Zwischenräume zwischen den Codons. In den Ribosomen werden die genetischen Instruktionen abgelesen und in die Sprache der Proteine übersetzt, die aus vielen, oft Tausenden, ihrer Bausteine, den Aminosäuren, aufgebaut sind. Die drei Ausnahmen sind die Codons UAA, UAG, UGA, die **Stopp-Codons** sind, an denen die Proteinsynthese aufhört

**Das Dystrophin-Gen und -Protein:** Duchenne- und Becker-Muskeldystrophie werden durch **Mutationen**, Schädigungen, des **Dystrophin-Gens** verursacht, das die Information für das Protein **Dystrophin** trägt. Mit einer Sequenz von 2.220.223 Basenpaaren ist es das bei weitem längste der bisher bekannten menschlichen Gene. Nur 11.058 Basen, 0,5%, in den 79 Exons des Dystrophin-Gens bestimmen die Sequenz der 3.685 Aminosäuren des "normalen" Dystrophin-Proteins in den Skelettmuskeln. Das Gen hat sieben oder möglicherweise acht verschiedene **Promoter**, Basensequenzen, an denen sich regulierende Proteine anlagern und dadurch das Gen aktivieren, indem sie die Transkription seiner Information ermöglichen, um schließlich sein Protein zu produzieren. Wegen der vielen Promoter und der Möglichkeit, den Spleißprozeß anders zu steuern, sog. "alternatives Spleißen", gibt es eine Reihe von anderen Dystrophin-Proteinen, die alle kürzer als das normale Dystrophin der Muskeln sind. Sie kommen in verschiedenen Organen vor, eines davon auch im Gehirn. Es ist nur 32% so lang als das normale, und es kann auch durch Mutationen ausgefallen oder verändert sein. Dies kann der Grund für die geistigen Probleme mancher Duchenne-Jungen sein.

**Wie groß sind das Dystrophin-Gen und sein Protein?** Die Doppelhelix-Struktur des Dystrophin-Gens ist 0,75 mm lang. Zusammen mit den anderen ungefähr 25.000 menschlichen Genen paßt sie in einen Zellkern von etwa 0,01 mm Durchmesser nur weil das genetische Material extrem kompakt gefaltet ist. Ein Molekül des normalen Dystrophin-Proteins ist viel kürzer als sein Gen, es ist 125 nm oder 0,000125 mm lang. Auf einen Zentimeter passen 80.000 aneinandergereihte Dystrophin-Proteine. Und in einem Gramm Muskelgewebe gibt es 114 Milliarden Dystrophin-Mioleküle. Dies dürfte deutlich machen, welche Aufgabe die Wissenschaftler haben: Um die Krankheit anzuhalten und die Muskeln wieder funktionsfähig zu machen, muß eine genügend große Zahl von neuen Dystrophinen wieder erscheinen, wenn das geschädigte Gen sie nicht mehr machen kann. Die neuen Moleküle müssen

nicht genau die normale Struktur haben, sie können kürzer sein, aber sie müssen richtig funktionieren. Und das bedeutet, daß viele Milliarden neue Dystrophin-Moleküle in jedem Gramm Muskel wiedererscheinen müssen und ein Kind hat viele Kilogramm Muskelgewebe.

**Die Aufgaben des Dystrophins:** Dystrophin wird für die mechanische Stabilität der Muskelzellen gebraucht. Es befindet sich auf der Innenseite der Muskelzellmembranen. Eines seiner Enden, der **C-Terminus**, ist durch eine Gruppe anderer Proteine, den **Dystrophin-Glykoprotein-Komplex**, in der Zellmembran verankert, und das andere Ende, der **N-Terminus**, ist mit den für die Kontraktion verantwortlichen Strukturen innerhalb der Muskelzellen verbunden. Der Mittelteil des Dystrophins, die **Stabregion**, besteht aus umeinandergedrehte und gefaltete Aminosäureketten. Wenn die Kontraktion der Muskelzelle das Dystrophin-Protein zwingt, seine Länge zu verändern, kann es sich wegen seiner gefalteten Struktur wie eine Feder oder ein Stoßdämpfer verhalten. Das Dystrophin überträgt dadurch die mechanische Energie, die von dem Aktin-Myosin-System erzeugt wird, auf die Muskelzellmembranen und die darüberliegenden Strukturen, das Bindegewebe und die Sehnen, in einer schonenden Art, die die Membranen nicht überdehnt.

Dystrophin hat noch mehr Aufgaben: Es organisiert die komplizierte Struktur des Dystrophin-Glycoprotein-Komplexes und die Anordnung vieler anderer Proteine. Es sorgt auch z.B. für die korrekte Kalzium-Konzentration in den Zellen und reguliert das Muskelwachstum. Viele Einzelheiten dieser komplizierten Zusammenhänge zwischen den zahlreichen Einzelteilen einer lebenden Zelle sind noch nicht bekannt.

Duchenne-Jungen haben kein oder sehr wenig Dystrophin in ihren Muskelfasern. Wenn seine schützende und organisierende Wirkung ausgefallen ist, zerreißt die Muskelkontraktion die Zellmembranen, so daß zuviel Kalzium in die Fasern eindringen kann. Das überschüssige Kalzium aktiviert dann Enzyme wie *Calpain* und andere Proteasen, die die Muskelproteine zerstören und zum Absterben der Zellen führen. Die Konsequenzen sind weitere Vorgänge wie Entzündungen und die Aktivierung der Fibroblasten, so daß es zur **Fibrose** kommt, der Entwicklung von Narbengewebe, das die Muskelregeneration verlangsamt und die typischen Symptome älterer Duchenne-Patienten verursacht.

Jungen mit der langsamer voranschreitenden Becker-Dystrophie haben weniger als normale Mengen von Dystrophin, das auch oft kürzer als normal ist. Es kann zwar immer noch seine Aufgaben erfüllen, jedoch nicht so effektiv wie das normale Protein.

Nicht nur die Skelettmuskeln sind von dem Fehlen des Dystrophins betroffen, wie **Andrew Hoey** diskutierte, sondern auch die glatten und die Herzmuskeln. Schädigungen der Herzmuskeln verursachen eine Kardiomyopathie und die Schwäche der glatten Muskulatur hat weitere Konsequenzen, z.B., die Blutgefäße geben weniger leicht nach, wenn der Blutdurchfluß zunimmt, das kann zu Atmungs- und anderen Problemen führen, und auch das Verdauungssystem ist betroffen, wenn die Darmbewegungen schwächer werden. Die Veränderungen eines einzigen Gens können also den ganzen Körper in Mitleidenschaft ziehen.

**Die Mutationen des Dystrophin-Gens:** Es gibt hauptsächlich drei Arten von Mutationen, die die Funktion des

Dystrophin-Gens beeinflussen: **Deletionen**, wenn ein oder mehrere ganze Exons des Gens fehlen, **Duplikationen**, wenn Teile des Gens wiederholt sind, und **Punktmutationen**, wenn einzelne Basenpaare ausgetauscht, entfernt oder eingefügt sind. Außerdem gibt es noch Inversionen, Richtungsänderungen der Gensequenz, und Mutationen in den Introns, die den normalen Spleißprozeß verändern.

Da die Drei-Buchstaben-Codons der mRNA in den Ribosomen eines nach dem anderen ohne Zwischenraum gelesen werden, bleibt das **Leseraster** erhalten, "**in-frame**", wenn die Mutation ganze Codons aus drei Buchstaben entfernt oder zugefügt hat. Das Dystrophin kann zwar noch produziert werden, aber es ist länger oder kürzer als normal. Wenn diese Änderungen nur unwichtige Strukturen

des Dystrophins betreffen, kann es immer noch zumindest teilweise seine Aufgaben erfüllen. Dann entsteht die gutartige Form der Dystrophie, **Becker-Muskeldystrophie**.

Wenn jedoch die Mutation das Leseraster um ein oder zwei Basen verschiebt, bleibt es nicht erhalten, es ist "**out-of-frame**". Dann werden eine Reihe von falschen Aminosäuren ab der Mutationsstelle in das wachsende Protein eingebaut bis schließlich ein neues, ein **vorzeitiges Stopp-Codon** erreicht wird. Das unfertige Dystrophin kann seine normale Funktion nicht erfüllen, es verschwindet, und es entwickelt sich die **Duchenne-Muskeldystrophie**. Am Ende dieses Berichtes wird im Einzelnen erklärt, wie ein vorzeitiges Stopp-Codon beim Skippen des Exons 46 auftritt.

## Die verschiedenen Wege zu einer Therapie der Duchenne-Muskeldystrophie.

Die Forschung versucht, Therapien für Duchenne-Muskeldystrophie auf zwei genetischen Wegen und mit einer Reihe von verschiedenen pharmakologischen Methoden zu entwickeln.

Der erste genetische Weg ist der Versuch, neue Dystrophin-Gene in die Kerne der Muskelzellen zu übertragen, die dann wieder die Produktion von Dystrophin steuern können. Viele Experimente mit Mäusen haben gezeigt, daß dieses Ziel erreicht werden kann, wenn man einen modifizierten, einen "gezähmten", Virus, den **Adeno-assoziierten Virus**, AAV, als Transport-Vehikel, als **Vektor** verwendet, um damit die aktiven Teile des Dystrophin-Gens, seine aneinandergelängten Exons - die **cDNA** - in die Muskelzellen einzubringen. Der AAV-Vektor ist aber nicht genügend groß, um die komplette cDNA mit allen 79 Exons zu transportieren. Nur cDNAs, die etwa ein Drittel so lang als normal sind, passen in ihn hinein. Das bedeutet, daß auch das neue Dystrophin nur etwa ein Drittel so groß ist als das normale. Wenn dieses verkürzte Dystrophin eine Struktur hat, die zu einer Becker-Dystrophie führen kann, dann würde eine solche Behandlung keine vollständige Heilung bringen, sondern nur eine Verlangsamung der schnellen Duchenne- in die mildere Becker-Dystrophie mit einer oft normalen Lebenserwartung. Da das neu übertragene genetische Material nicht in die Chromosomen der Zelle eingebaut wird, bleibt das mutierte Dystrophin-Gen unverändert. Es handelt sich also nicht um eine eigentliche Gentherapie.

Auf dem zweiten genetischen Weg mit dem **Exon-Skipping** wird das geschädigte Gen ebenfalls nicht verändert. Diese Methode greift nur in die Weitergabe der

genetischen Information vom Gen zum Protein ein. Das Spleißen der Exons der Vor-mRNA zur mRNA wird ganz gezielt geändert, so daß die gestörte, *out-of-frame* Information wieder lesbar, *in-frame*, gemacht wird. Das Ergebnis ist das gleiche wie bei der Gentransfer-Technik: Die Duchenne- wird zur Becker-Dystrophie verlangsamt. Eine vollkommen neue Behandlungsart mit "genetischen Medikamenten", die für verschiedene Patientengruppen speziell hergestellt werden müssen, kann diese Änderungen der Informations-Verarbeitung bewirken: Diese Medikamente heißen **Antisense-Oligoribonukleotide**, AONs.

Weil beide genetische Methoden so neu sind, muß die Forschung sehr vorsichtig vorgehen. Obgleich es verständlich ist, daß man neue Therapien schnell in die Klinik bringen möchte, ist es wichtig, daß keine Fehler vorkommen, die die Sicherheit beeinflussen, weil dies ein Rückschlag für das gesamte Gentherapie-Feld sein würde. Deshalb sind die Genehmigungsverfahren sehr streng und brauchen viel Zeit.

Mit pharmakologischen Methoden versucht man, die nichtgenetischen Konsequenzen des fehlenden Dystrophins zu vermeiden oder zumindest abzumildern, also die Zerstörung der Muskeln durch Protein-abbauende Enzyme, die Durchlässigkeit der Membranen, die Fibrose und die Entzündung. Es gibt bereits eine Reihe von zugelassenen Medikamenten gegen andere Krankheiten, von denen man annimmt, daß sie auch eine positive Wirkung auf die Duchenne-Dystrophie haben könnten. Im Abschnitt "Die pharmakologischen Wege" sind die neuesten Forschungsergebnisse zusammengefaßt, die bei dem Treffen in Cincinnati diskutiert wurden.

## Exon-Skipping

Die **Exon-Skipping**-Technik versucht, eine Duchenne-Mutation in eine Becker-Mutation abzuändern. Wenn die Mutation das **Leseraster** stört und so Duchenne-Dystrophie verursacht, kann es **korrigiert** werden, indem aus der mRNA ein oder mehrere Exons direkt vor oder hinter der Deletion oder Duplikation künstlich entfernt werden oder das Exon, das eine Punktmutation trägt.

Exons können aus der mRNA mit den **Antisense-Oligoribonukleotiden**, AONs, entfernt werden. Das sind kurze RNA-Strukturen von 20 bis 30 Nukleotiden, deren Sequenz so konstruiert ist, daß sie sich nur an die komplementäre Sequenz einer Spleißstelle innerhalb des zu über-

springenden Exons anlagern oder an seine Grenzen und *nirgendwo sonst*. "*Antisense*" bedeutet, daß die Basensequenz der AONs in entgegengesetzter Reihenfolge zur Zielsequenz in der pre-mRNA angeordnet ist. Diese AONs stören dadurch den Spleißmechanismus, so daß die angepeilten Exons nicht mehr in der mRNA enthalten sind, sie werden *geskippt*.

*Das Gen selbst mit seiner Mutation wird durch Exon-Skipping nicht verändert*, aber seine mRNA enthält nicht mehr die Information des oder der übersprungenen Exons. Da diese mRNA kürzer als normal ist, ist das neu entstehende Dystrophin-Protein auch kürzer, es enthält weniger

Aminosäuren. Wenn die fehlenden Aminosäuren Teil der nicht wichtigen Regionen des Dystrophins sind, z.B., der zentralen Stabstruktur, kann das kürzere Protein noch teilweise seine Rolle für die Stabilisierung der Muskelzellmembranen erfüllen. Das Ergebnis ist dann eine Abschwächung der schweren Duchenne-Symptome in die leichteren Symptome der Becker-Muskeldystrophie.

**Oligonukleotide** sind kurze Stücke der zwei Arten von Nucleinsäuren, DNA und RNA ("oligo" bedeutet *wenig*). Die beiden Stränge der DNA, Deoxyribonucleinsäure, bestehen jeweils aus einer Kette von sich abwechselnden Phosphat- und Deoxyribose-Einheiten, ihrem *Rückgrat*. **Deoxyribose** ist ein Zuckermolekül aus fünf Kohlenstoffatomen, und am zweiten Kohlenstoff fehlt das übliche Sauerstoffatom. Jede Zucker-Einheit trägt eine der vier genetischen Basen an ihrem ersten Kohlenstoffatom. **RNA**, Ribonucleinsäure, hat normale Ribose-Einheiten in seinem Rückgrat mit einem Sauerstoffatom an ihren zweiten Kohlenstoffatomen. **Nukleotide** sind die Bausteine beider Nucleinsäure-Arten. Jedes Nucleotid besteht aus einer Ribose, einer Base und einem Phosphat. Da es vier verschiedene Basen gibt, gibt also auch vier verschiedene **Ribonukleotide** und vier verschiedene **Deoxyribonukleotide**.

Die beiden Arten von Oligos oder AONs, die meistens für das Exon-Skippping verwendet werden, sind geschützte Oligoribonukleotide, damit sie in den Muskelzellen nicht von Nucleasen zerstört werden, von Enzymen, die Nucleinsäuren abbauen. Die Holländer verwenden **2'O-Methyl-Phosphothioate**, auch *2O-Methyls* genannt. Sie haben eine Methylgruppe, ein Kohlenstoff- mit drei Wasserstoffatomen, am Sauerstoff des zweiten Kohlenstoffs der Ribose-Einheiten. Außerdem haben sie ein Schwefelatom anstelle eines der Sauerstoffatome der Phosphatgruppen. Die **Morpholinos**, mit denen die britischen und australischen Forscher arbeiten, haben anstelle eines der Phosphat-Sauerstoffatome Dimethylamid - ein Stickstoffatom mit zwei Methylgruppen -, und alle Ribose-Einheiten sind durch Morpholin-Ringe ersetzt, die hauptsächlich aus sechs Atomen bestehen, vier Kohlenstoffatomen, einem Stickstoff- und einem Sauerstoffatom.

Mehr Einzelheiten werden im Interview mit Dr. *Wilton* am Ende dieses Berichtes diskutiert. Und auf der letzten Seite wird das Skippping von Exon 46 zur Wiederherstellung des Leserasters nach der Deletion von Exon 45 als Beispiel dieser Technik gezeigt.

**Exon-Skippping: Die ersten klinischen Versuche mit Duchenne-Jungen in den Niederlanden.** **Prosenza B.V.** ist eine Biotechnologie-Firma in Leiden in Holland, in der eine Therapie für Duchenne-Muskeldystrophie mit der Exon-Skippping-Technik entwickelt wird in Zusammenarbeit mit Dr. *Gertjan van Ommen* und Dr. *Judith van Deutekom* vom Medizinischen Zentrum der Universität Leiden. Prosenzas Präsident, **Gerard Platenburg**, teilte mit, daß am 8. Mai 2006 die beiden holländischen Kontrollkomitees - CCMO und IRB - die Genehmigung gaben für "eine erste Studie zur Bestimmung der Wirksamkeit, Sicherheit und Verträglichkeit einer einzelnen Dosis eines Antisense-Oligoribonukletids, AON, zur Wiederherstellung der Produktion von Dystrophin". Dies öffnete den Weg zum *ersten Exon-Skippping-Versuch am Menschen*, der jetzt begonnen wird.

Für diesen Versuch wurden sechs 8 bis 16 Jahre alte

Duchenne-Jungen, alle aus den Niederlanden, ausgewählt. Sie haben eine Dystrophin-Genmutation, die eine Leserasterverschiebung verursacht, welche durch das Skippping von Exon 51 rückgängig gemacht werden könnte. Nach intensiven klinischen Untersuchungen einschließlich einer Hautbiopsie, wird den Jungen das potentielle Medikament, ein 2O-Methyl-AON gegen Exon 51, in einer einzigen Injektion in den Tibialis-anterior-Muskel des Schienbeins gespritzt. Die Patienten erhalten ihre Injektionen hintereinander, d.h., erst nachdem keine Nebeneffekte bei einem Jungen auftreten, wird der nächste behandelt. Vier Wochen nach der Injektion wird eine Biopsie durchgeführt und das Muskelgewebe auf verkürztes Dystrophin-Protein untersucht. Mit diesem ersten Versuch soll vor allem bewiesen werden, daß Exon-Skippping sicher ist und in Duchenne-Patienten funktioniert, so wie es nach den vielen erfolgreichen vorklinischen Experimenten an Muskelzellkulturen und Tieren erwartet wird. Selbst wenn neues Dystrophin in dem behandelten Muskel gefunden wird, werden die Jungen keinen therapeutischen Vorteil von dieser lokalen Behandlung haben.

Die holländischen Wissenschaftler arbeiten mit den 2O-Methyls, weil sie mit diesem AON-Typ bereits lange Erfahrungen haben, nicht nur mit lokalen Injektionen direkt in das Muskelgewebe, sondern auch mit der systemischen Anwendung in lebenden Tieren. Zum Beispiel konnten sie zeigen, daß nach wiederholten Injektionen eines 2O-Methyls gegen das Maus-Exon 23 in die Schwanzvene von mdx-Mäusen größere und schon therapeutische Mengen von Dystrophin in allen Skelettmuskeln und auch in den Herzmuskeln gebildet wurde.

Die Tatsache, daß die 2O-Methyls auch in die Herzmuskeln gehen, ist wichtig, weil es mit den anderen intensiv getesteten AONs, den Morpholinos, bisher nicht möglich war, auch die Herzmuskeln zu behandeln.

Es konnte auch gezeigt werden, daß die 2O-Methyls schneller von dystrophischen als von normalen Muskeln aufgenommen werden, wahrscheinlich weil die dystrophischen Membranen "Löcher" haben. In den mdx-Mäusen bleibt die Wirkung des systemischen Skippings mit 2O-Methyls mehrere Monate lang erhalten. Dies ist ein Hinweis darauf, daß eine zukünftige Exon-Skippping-Therapie möglicherweise monatlich wiederholt werden müßte. Jedoch die genaue Dosis und die Zeitabstände der Behandlung müssen erst noch bestimmt werden.

Wegen dieser positiven präklinischen systemischen Ergebnisse, bereiten die holländischen Forscher bereits die nächste klinische Prüfung mit Duchenne-Jungen vor, die für 2007 vorgesehen ist. Dann wird man versuchen die Exons 51 und 46 durch die systemische Injektion der entsprechenden 2O-Methyl AONs zu skipppen.

Auf diese relativ kurzen Versuche werden Langzeitversuche über wahrscheinlich sechs Monate folgen, bei denen dann schon möglicherweise die Duchenne-Symptome der beteiligten Jungen deutlich verlangsamt werden können.

Die beiden Exons, die in den zwei ersten klinischen Versuchen geskippt werden, wurden ausgewählt, weil ein erfolgreiches Skippping von Exon 51 eine Therapie für bis zu 24% aller Duchenne-Jungen mit Deletionen sein würde und weil ein Skippping von Exon 45 allen Jungen mit einer Deletion des Exons 45 helfen würde, des am häufigsten deletierten Exons der Duchenne-Patienten (8% aller Deletionen).

Außer den AONs für das Skippen der Exons 51 und 46 hat Prosensa schon vier andere 2O-Methyls entwickelt und in genügend großen Mengen produziert. Mit diesen sechs AONs könnten über 50% aller Patienten mit Deletionen behandelt werden.

Falls alles planmäßig verläuft, wird es etwa vier bis fünf Jahre dauern, bis die 2O-Methyls für das Skippen der Exons 51 und 46 fertig sind und als Duchenne-Medikamente zur Verfügung stehen werden. Die vollständige Entwicklung weiterer AONs wird hoffentlich schneller gehen, weil die Erfahrung mit den beiden ersten die Zeit für die Zulassung des Testens der folgenden verkürzen wird.

Dr. Platenburg hofft, daß er über die Resultate des ersten Exon-Skippping-Versuchs auf dem nächsten Treffen des Parent-Projects 2007 berichten kann.

**Exon-Skippping: Vorbereitung einer klinischen Studie mit Duchenne-Jungen in England.** In England wurde das MDEX-Konsortium gegründet, um die Exon-Skippping-Technik weiterzuentwickeln und um klinische Studien durchzuführen, damit eine Therapie für alle Duchenne-Patienten so früh wie möglich zur Verfügung steht. In ihrer ersten klinischen Studie wollen die Wissenschaftler versuchen, das Exon 51 der mRNA in neun Duchenne-Jungen zu skippen. Die Mitglieder des Konsortiums sind *Francesco Muntoni, Kate Bushby, Jenny Morgan, Dominic Wells, George Dickson, Ian Graham, Matthew Wood* und *Jenny Versnel*, die alle aktiv an der Duchenne-Forschung beteiligt sind. Das englische Gesundheitsministerium und der Medical Research Council sind ebenfalls beteiligt.

Eine der MDEX-Mitglieder, *Kate Bushby* von der Universität von Newcastle upon Tyne, diskutierte die Einzelheiten des geplanten klinischen Versuchs und teilte mit, daß es dabei eine enge Zusammenarbeit mit mehreren Forschungsgruppen außerhalb Englands geben wird, vor allem mit der holländischen Gruppe in Leiden.

Viele Jahre präklinischer Forschung haben gezeigt, daß die *Amntisense-Oligoribonukleotide*, AONs, das mutierte Duchenne-Gen "zwingen" können, ein kürzeres, ein Bekker-Protein zu produzieren, das die schweren dystrophischen Symptome der Duchenne-Jungen abmildern würde. Die systemische Injektion dieser AONs in lebende dystrophische Mäuse "heilte" praktisch ihre Krankheit. Und da AONs bereits seit Jahren gegen andere Krankheiten angewendet werden, weiß man, daß sie sicher und nicht toxisch sind. Diese positiven Ergebnisse haben die britischen Wissenschaftler veranlaßt, Ende dieses Jahres eine klinische Studie parallel zu den Studien zu beginnen, die schon in Leiden durchgeführt werden.

Für diese erste MDEX-Studie sind bereits eine Reihe von Entscheidungen gefällt worden: Das Exon, das geskippt werden soll, wird Exon 51 sein, weil viele Duchenne-Deletionen, z.B. 45-50, 47-50, 48-50, 49-50, 50, 52, 52-63, etwa 17% aller Duchenne-Deletionen, durch das Skippen von Exon 51 behandelt werden könnten. Verwendet wird das AON H51A, eines der *Morpholinos* die im Laboratorium von Dr. *Wilton* in Perth in Australien entwickelt wurden. Neun 12 bis 18 Jahre alte Duchenne-Jungen werden teilnehmen. Drei verschiedene Dosen, 0,09, 0,297 und 0,9 mg AON in 0,9 ml Lösung werden mit neun Injektionen direkt in einen Kubikzentimeter Muskelgewebe gespritzt. Behandelt wird einer der beiden Muskeln *Extensor digitorum brevis*, EDB, die sich an der Außenseite des Fußes befinden und die Zehen anheben. Men-

schen brauchen diesen Muskel gar nicht, und viele haben ihn auch nicht. Deswegen kann er ohne ernste Konsequenzen entfernt werden, wenn untragbare Nebenwirkungen auftreten sollten. Umfangreiche klinische Untersuchungen einschließlich von Biopsien werden vor und fünf Wochen nach den Injektionen bei jedem Jungen durchgeführt, so wie es für klinische Studien notwendig ist, um die Ergebnisse der Behandlung zu beurteilen.

Das wichtigste Ziel des Versuchs ist es, zu beweisen, daß die lokale Behandlung eines einzelnen menschlichen Muskels mit dem Morpholino-AON sicher ist und die Produktion von wenigstens etwas Dystrophin wiederherstellen kann. Man hofft, daß mit einer der verschiedenen Dosierungen in mehr als 10% der Muskelfasern Dystrophin entstehen wird. Dies ist notwendig, um verlässliche Ergebnisse zu erhalten und auch um abschätzen zu können, wieviel AON man insgesamt brauchen wird, um später einmal alle Muskeln eines Jungen systemisch zu behandeln.

Die Jungen, die an diesem ersten Versuch mit lokaler Injektion eines Morpholinos teilnehmen, werden keinen therapeutischen Vorteil davon haben. Doch die Ergebnisse dieser Studie werden für eine richtige Behandlung gebraucht, für die systemische Injektion des potentiellen Duchenne-Medikamentes in den Blutkreislauf eines Jungen, so daß alle seine Muskeln erreicht werden. Eine solche äußerst wichtige Studie wird für 2007 geplant.

**Exon Skipping funktioniert in Mäusen und Hunden, aber viele Fragen müssen noch beantwortet werden, bevor Exon-Skippping für die Jungen fertig ist.** *Terence Partridge*,

der zur Zeit am *Children's National Medical Center* in Washington arbeitet, stellte eine Reihe von Fragen, die früher oder später beantwortet werden sollten, bevor Exon-Skippping eine wirksame Therapie für Jungen mit Duchenne-Dystrophie werden kann. Und er berichtete, daß in Japan gezeigt werden konnte, daß Exon-Skippping nach einer lokalen Injektion von AONs in die Muskeln eines dystrophischen Hundes wirksam ist.

Wir wissen, daß Exon-Skippping in mdx-Mäusen mit Morpholino-AONs gegen ihr Exon 23 gut funktioniert, wenn sie systemisch in ihre Schwanzvene injiziert werden. Zum Beispiel, nach sieben wöchentlichen Injektionen sehen die Muskeln viel besser aus, sie sind nicht mehr durchlässig wie zuvor, und deshalb werden ihre CK-Werte wieder fast normal. Aber wir wissen nicht, ob die AONs gleichmäßig in alle Muskeln verteilt werden, so daß sie alle zur gleichen Zeit besser werden. Wir wissen bereits, daß die Morpholinos leider nicht das Exon 23 in den Herzmuskeln skippen können. Andererseits haben auch die anderen AONs, die *2O-Methyls*, einige Probleme, um in die Herzmuskeln zu gelangen. Was ist der Grund für diese Probleme?

Können wir die AONs in genügend großen Mengen anwenden, so daß sie wirksam und nicht toxisch über die ganze Lebenszeit eines Patienten sind? Wir können zwar mit Gewebekulturen experimentieren, aber mit lebenden Tieren können wir nicht die gleichen Ergebnisse erwarten. Langzeit-Experimente können mit Tieren durchgeführt werden. Aber weil Hunde viel länger leben als Mäuse und die dystrophischen GRMD- und CXMD-*Golden Retriever*-Hunde wirklich körperlich behindert sind, bekämen wir in Experimenten mit Hunden wahrscheinlich Ergebnisse, die ähnlich denen sind, die wir später in klinischen Studien mit Duchenne-Patienten sehen werden.

Solche Studien mit Hunden sind jetzt in Japan in der Tokyo General Animal Research Facility unter der Leitung von *Shin'ichi Takeda* begonnen worden.

Die dystrophischen Hunde haben eine Mutation an der Spleißstelle des Exons 7 in ihrem Dystrophin-Gen, dadurch wird das Exon 7 aus der mRNA entfernt, das Leseraster verschiebt sich und kurz danach erscheint ein vorzeitiges Stopp-Codon. Ein Skippen der beiden flankierenden Exons 6 und 8 würde das Leseraster wieder normalisieren. Eine Mischung von drei Morpholino-AONs in verschiedenen Dosierungen, zwei gegen Exon 6 und eines gegen Exon 8, die Dr. *Toshifumi Yokota* in Washington hergestellt hatte, wurden lokal in den Tibialis-anterior-Muskel junger erwachsener CXMD-Hunden injiziert. Zwei Wochen nach der Injektion wurden Biopsien durchgeführt. Wenn 1,2 mg von jedem AON, in 1 ml Salzwasser aufgelöst, injiziert wurden, erschien neues Dystrophin in allen Fasern des Muskels um die Injektionsstelle herum, und sie sahen danach fast normal aus. Systemische Injektionen der AONs werden das nächste Experiment der japanischen Forscher sein, die "das größte Hundehaus der Welt" in ihrem Institut haben.

Morpholino-AONs funktionieren also gut in einem großen Säugetier mit einer ähnlichen Körperstruktur wie der Mensch, doch das ist keine Garantie dafür, daß diese potentiellen Medikamente genausogut und über eine genügend lange Zeit auch in Duchenne-Jungen wirksam sein werden. Deswegen muß auch mit anderen Typen von AONs gearbeitet werden.

Dr. Partridge zeigte neun verschiedene AON-Strukturen. Am meisten wurde in den vergangenen Jahren mit den Morpholinos und den 2O-Methyls gearbeitet, den beiden

Typen, die jetzt und in Kürze klinisch in Duchenne-Jungen geprüft werden. Die beiden gleichzeitigen Studien in Holland und in England sind notwendig und ihre hohen Kosten gerechtfertigt, denn eine zukünftige Exon-Skipping-Behandlung könnte durchaus eine Mischung beider AON-Typen erfordern, weil z.B. die individuellen toxischen Effekte wahrscheinlich unabhängig voneinander sind, ihre Skipping-Wirkungen sich aber addieren könnten. Und es könnten jederzeit auch bisher unbekannte Probleme auftreten, die nur durch andere AON-Mischungen gelöst werden könnten, z.B., wenn einer der AON-Typen auch im Herzen wirksam wäre.

Außerdem müssen die Arbeiten sicher noch lange fortgesetzt werden, um die wirksamste der AON-Sequenzen zu finden, um die geringste Dosis zu bestimmen, die noch genügend aktiv ist ohne toxisch zu sein oder Immunreaktionen zu verursachen, um die beste Methode der Verabreichung zu finden, und um schließlich die Behandlungen so selten wie möglich wiederholen zu müssen.

**Wird Exon-Skipping neue Muskeln in älteren Patienten produzieren können?** *Dominic Wells* antwortete: Die noch vorhandenen Muskelzellen werden stabilisiert, wenn neues Dystrophin nach dem Exon-Skipping wieder entsteht. Es wird wahrscheinlich nicht schlimmer werden. Ob aber auch die Funktion wiederhergestellt wird, weiß man nicht. Möglicherweise wird die Kombination von Exon-Skipping mit einer pharmakologischen Behandlung, z.B. mit einem Anti-Myostatin-Medikament ganz wirksam sein. Entsprechende Experimente mit Mäusen sind schon begonnen worden.

## Transfer des Dystrophin-Gens.

Der Transfer, der Transport, von genügend großen Mengen des intakten Dystrophin-Gens in die Kerne der dystrophischen Muskelzellen würde eine wirksame Duchenne-Therapie sein, wenn die genetische Information der neuen Gene von den Protein-synthetisierenden Ribosomen der Zelle verwendet wird, um genügende Mengen funktionellen Dystrophins zu erzeugen, das dann auch an seine normalen Platz unter der Zellmembran wandert und sich dort korrekt mit den Proteinen des Dystrophin-Glykoprotein-Komplexes verbindet.

Die Arbeitsgruppen von *Xiao Xiao*, jetzt an der Universität von North Carolina in Chapel Hill und von *Jeffrey Chamberlain* an der Universität von Washington in Seattle sind diejenigen, die am aktivsten auf diesem Gebiet der Gentherapie für Duchenne-Dystrophie arbeiten. Diese Forscher begannen ihre Arbeiten mit Viren, wie dem *Adenovirus*, dem Schnupfenvirus, als Transportmittel, als *Genvektor*. Für diese Aufgabe wurden die Viren so modifiziert, daß sie nicht mehr von den Zellen, die sie infizieren, vermehrt werden können, weil ihre Gene für die Vermehrung entfernt wurden. An ihrer Stelle haben sie Platz für die kodierenden Sequenzen eines zu transportierenden therapeutischen Gens zusammen mit einigen Kontrollsequenzen. Die Sequenz, die für die Produktion des Dystrophin-Proteins notwendig ist, d.h., die cDNA ihres Gens, ist 14.000 Basenpaare lang, sie enthält alle 79 miteinander verbundenen Exons ohne die dazwischenliegenden Introns. Die Adenoviren können sehr wirksam die sich nicht mehr

teilenden Muskelzellen infizieren. Sie bauen die mitgebrachten Gene nicht im Genom ab, sie bleiben in den Kernen außerhalb der Chromosomen. Das bedeutet, es gibt kein Risiko, daß die neuen Gene zufällig in andere Gene oder Kontrollsequenzen eingebaut werden, wo sie möglicherweise deren Aktivität stören oder sogar Krebs verursachen.

Die wirksamsten Viren für den Transport der Dystrophin-cDNAs in die Muskeln sind die *Adeno-assoziierten Viren*, AAV, die ungefähr zehnmal kleiner sind als die normalen Adenoviren. Weil sie aber so klein sind, können sie nur genetisches Material transportieren, das nicht mehr als etwa 5.000 Basenpaare lang ist, das ist etwa ein Drittel der gesamten Dystrophin-cDNA. Deshalb muß die normale Dystrophin-cDNA stark verkürzt werden, damit sie in diesen kleinen Vektor paßt. Patienten mit der gutartigen Becker-Muskeldystrophie haben verkürztes Dystrophin in ihren Muskeln. Ein Transfer solcher *Mini-Gen-cDNAs* würde die Duchenne-Muskeldystrophie nicht "heilen", sondern sie nur in etwas wie die langsamer voranschreitende Becker-Form abändern.

Um festzustellen, welche der vier Domänen oder Regionen des normalen Dystrophin-Proteins wichtig sind und welche nicht - die beiden Endregionen, die Cystein-reiche oder die zentrale Stabregion -, haben die Wissenschaftler viele solche verkürzten Dystrophin-cDNAs und -Proteine künstlich hergestellt. Unter ihnen waren einige, die in lebenden mdx-Mäusen äußerst wirksam und funktionell

waren. Diesen künstlichen Mini-Dystrophinen fehlten große Teile des zentralen Region und auch das C-terminale Ende des normalen Proteins. Der Transfer dieser ausgewählten Mini-Gene führte zu einer Verbesserung der Muskelfunktion und aller anderen dystrophischen Symptome der mdx-Mäuse. Außerdem zeigte der Transfer bessere Ergebnisse in jüngeren Tieren, und nach einer einzigen Injektion blieb das neu synthetisierte Dystrophin ein Jahr lang und länger in den Muskeln.

### **Erster klinischer Versuch zum Dystrophin-Genstransfer.**

**Scott McPhee**, Vizepräsident für die klinische Entwicklung der Firma **Asklepios Biopharmaceuticals** (Askbio) in Chapel Hill, sagte, daß die Gründer von Askbio vor 25 Jahren als erste begannen, mit Adeno-assoziierten Viren zu arbeiten, und daß sie aufgrund ihrer Erfahrungen mit diesem Genvektor jetzt ein biologisches Nanoteilchen für den Transfer von Mini-Dystrophin zur Behandlung von Duchenne-Dystrophie entwickelten (BNP, *biological nano-particle*), das sie Biostrophin™ nannten. Eine ihrer Prioritäten ist es jetzt, einen Genstransfer mit Biostrophin zu einer wirksamen Therapie der Duchenne-Dystrophie auszuarbeiten. Nach eingehenden präklinischen Tests einschließlich von Tierversuchen zur Toxikologie und der Verteilung der BNPs im Körper, und nachdem man die Erlaubnis von den Genehmigungsbehörden erhalten hatte, wurde eine klinische Phase-I-Studie mit sechs Duchenne-Jungen begonnen.

Das Ziel dieser Studie ist es, sicherzustellen, daß diese Technik keine toxische oder andere Nebenwirkungen mit sich bringt, und um zu sehen, ob Mini-Dystrophin tatsächlich in den menschlichen Muskeln produziert wird. Diese Arbeiten werden von der Muscular Dystrophy Association of America mit 1.6 Millionen US\$ mitfinanziert. Wenn diese Phase-I-Studie zeigt, daß diese Technik sicher und gut verträglich ist, wird man versuchen, zusätzliche finanzielle Mittel für weitere klinische Studien zu bekommen..

Der Vektor, der in diesem klinischen Versuch verwendet wird, ist ein modifizierter Adeno-assoziiertes Virus des Serotyps 2, genannt BNP2.5. Er wird eine Mini-Dystrophin-Konstruktion enthalten, der Teile des Exons 17 und alle Exons von 18 bis 59 und von 70 bis 79 fehlen. Das bedeutet, daß das erwartete Becker-Dystrophin etwa nur ein Drittel so lang wie das normale Protein sein wird, weil es nicht mehr die Stabregionen R3 bis R21 hat und auch nicht das C-terminale Ende.

Diese erste Phase-Ia-Studie wird unter der Leitung von Dr. **Jerry Mendell** am Kinderkrankenhaus der medizinischen Fakultät der Ohio State University in Columbus durchgeführt. Sie hat am 28. März 2006 begonnen, als der erste Patient die ersten Injektionen von Biostrophin an drei Stellen im Abstand von 0,5 cm in den Bizepsmuskel eines Armes bekam, während der Bizeps des anderen Armes zur Kontrolle nur mit Kochsalzlösung behandelt wurde. Die Studie wird *doppelblind* durchgeführt, d.h., weder die Patienten noch die Ärzte wissen vor dem Ende der gesamten Studie, in welchen Bizeps die Vektoren injiziert wurden.

Sechs Duchenne-Jungen nehmen daran teil, die mindestens fünf Jahre alt sind und deren Mutation des Dystrophin-Gens genau bekannt ist. Zwei verschiedene Dosierungen werden für jede Gruppe von drei Patienten verwendet. Die Konzentrationen des Vektors an den lokalen Injektionsstellen sind wesentlich größer als diejenigen, die bei den nächsten Studien verwendet werden, bei denen eine

systemische Behandlung ganzer Gliedmaßen versucht werden wird. Deshalb wird man jetzt eher die Wirkung der Behandlung erkennen und auch alle unerwarteten Nebeneffekte wie Entzündungen und Immunreaktionen. Falls ernste Probleme auftreten sollten, wird es möglich sein, das gesamte Muskelgewebe um die Injektionsstellen herum zu entfernen, um damit die Behandlung vorzeitig und vollständig zu beenden. Schließlich werden die Wirkungen der Genstransfer-Behandlung langfristig sein, deshalb muß jeder Schritt der Studien vorsichtig und sorgfältig getan werden

Ein und drei Monate nach den Injektionen werden von jeder Injektionsstelle Gewebeproben durch Muskelbiopsien entnommen. Die Proben werden eingefroren bis zum Ende der gesamten Studie, dann erst werden sie auf neues, aber verkürztes Dystrophin untersucht.

Die Ergebnisse dieser Phase-I-Studie werden etwa im Frühjahr 2007 zur Verfügung stehen. Für die teilnehmenden Jungen wird es keine therapeutische Wirkung geben. Die nächste, sog. Brücken- oder Phase-Ib-Studien werden jetzt mit Hunden und Affen vorbereitet. Es ist geplant, sie 2008 oder 2009 durchzuführen. Dafür wird ein ganzer Arm oder ganzes Bein Infusionen der Vektoren bekommen nach der vorübergehenden Unterbrechung der Blutzirkulation durch eine chirurgische Maßnahme, die ähnlich wie die sein wird, die für chemotherapeutische Behandlungen entwickelt wurde. Dieser klinische Versuch einer regionalen Behandlung wird unter Umständen schon eine Verbesserung der Lebensqualität der teilnehmenden Patienten mit sich bringen.

Schließlich ist eine Phase-II/III-Studie mit einer systemischen Ganzkörperbehandlung für 2009/2010 vorgesehen mit einer größeren Zahl von Patienten als in den vorangegangenen Studien. Falls diese Studie erfolgreich ist, könnte damit schon das Fortschreiten der Duchenne-Muskeldystrophie vermieden werden, und zwar mit einer einzigen Behandlung.

**Die Hoffnung auf Stammzellen.** In seinem zweiten Vortrag ging **Terence Partridge** auf das Versprechen der Stammzellforschung ein, eine Therapie der Duchenne-Muskeldystrophie zu liefern, ein Versprechen, das mit einer möglichen Ausnahme bisher unerfüllt ist.

Stammzellen können sich zeitlich unbegrenzt teilen, und sie haben die Fähigkeit, bei jeder Zellteilung sowohl eine ähnliche Stammzelle zu bilden als auch einen mehr spezialisierten Zelltyp. Sie können sich also *unsymmetrisch* teilen, um ihre eigene Zahl mehr oder weniger konstant zu halten und um sicherzustellen, daß spezialisierte Zellen kontinuierlich während des ganzen Lebens eines Organismus repariert werden.

Es gibt drei verschiedene Arten von menschlichen Stammzellen: Die ersten acht Zellen eines menschlichen Embryos sind *totipotente Stammzellen*, weil sie sich zu jedem Zelltyp des Körpers entwickeln können. Vier bis fünf Tage nach der Befruchtung haben die inneren Zellen einen Zellverband, den Blastozysten, gebildet. Diese Zellen werden *pluripotente Stammzellen* oder *embryonale Stammzellen* genannt. Sie beeinflussen sich gegenseitig und produzieren differenzierte oder *adulte* (erwachsene) *Stammzellen* von denen jede nur ein oder wenige spezialisierte Gewebe des Körpers bilden können. Die adulten Stammzellen für die Bildung und die Reparatur der Muskelzellen sind die *Satellitenzellen*.

Wenn Muskelgewebe beschädigt wird, wandern die Satellitenzellen, die sich an der Außenseite der Muskelzelle befinden, in die geschädigte Region, sie teilen sich und verschmelzen zu Myotuben, die sich dann weiterentwickeln zu fertigen Muskelzellen. Einige der Satellitenzellen in dem neuen Muskelgewebe teilen sich asymmetrisch, sie produzieren auch neue Satellitenzellen, die dann ihren normalen Platz an der Außenseite der reparierten Membran einnehmen, um dann für die nächste Runde der Regeneration der Muskelzellen zur Verfügung zu stehen, die durch einen dystrophischen Prozeß zerstört wurden.

Satellitenzellen können auch injiziert, lokal in die zerstörten Muskeln transplantiert werden, wo sie sich wie myogene Stammzellen für das geschädigte Muskelgewebe verhalten. Diese Zellen können sehr schnell reagieren, in einigen Tagen können ein paar von ihnen viele Tausend Muskelzellkerne bilden, die dann neue vollständige Muskelfasern bilden. Wenn diese externen Satellitenzellen aus normalen Muskeln mit intakten Dystrophin-Genen stammen, enthält der neue Muskel auch Dystrophin, selbst wenn, wie an mdx-Mäusen gezeigt wurde, das umgebende Gewebe kein Dystrophin herstellen kann.

Für eine Duchenne-Therapie wäre aber die lokale Übertragung in alle Muskeln durch eine riesige Zahl von Injektionen aber keine akzeptable therapeutische Methode. Eine systemische Behandlung mit wenigen Injektionen in den Blutkreislauf wäre notwendig, um alle Muskeln zu erreichen, auch die des Herzens und der Lungen.

Für eine wirksame Stammzelltherapie würde man deshalb eine sichere und ethisch akzeptable Quelle von großen Mengen adulter Stammzellen brauchen, die ausschließlich Muskelzellen bilden können und nichts anderes, vor allem aber keine Tumoren. Und es sollte möglich sein, diese Zellen systemisch in die Blutgefäße zu injizieren, die sie dann im ganzen Körper verteilen würden. Danach müßten sie die Membranen der Muskelzellen durchqueren und dann in den Zellen bleiben und keine lokalen Probleme verursachen. Mit einer Ausnahme ist aber bisher kein Ausgangsmaterial für Stammzellen gefunden worden, das alle diese Bedingungen in Experimenten mit lebenden mdx-Mäusen erfüllen könnte.

Die Ausnahme sind *Mesoangioblasten*. Das sind adulte Stammzellen, die sich an der Außenseite von kleinen Blut-

gefäßen im Muskelgewebe befinden. *Giulio Cossu* und seine Kollegen vom Stammzellen-Forschungsinstitut am San Raffaele Hospital in Pavia in Italien haben vor kurzem grundlegende Experimente durchgeführt, deren Ergebnisse sehr wichtig für eine Stammzellbehandlung vieler verschiedener Muskeldystrophien werden können.

Sie arbeiteten nicht mit mdx-Mäusen als Versuchstiere, sondern mit Mäusen, deren Gen für Alpha-Sarkoglykan, eines der Proteine des Dystrophin-assoziierten Komplexes, inaktiviert worden war. Diese Mäuse haben eine Form der Gliedergürtel-Muskeldystrophie, englisch LGMD, die ähnliche Symptome wie die Duchenne-Dystrophie haben. Die italienischen Forscher isolierten Mesoangioblasten aus normalen Mäusen, gaben mehrere Wachstumsfaktoren dazu und injizierten sie dann in die Blutbahn der LGMD-Mäuse. Diese "gesunden" Stammzellen konnten dann in alle Skelettmuskeln der lebenden Mäuse wandern und dort die Neusynthese von über 80% der normalen Menge an Alpha-Sarkoglykan veranlassen.

Um diese neue Technik zu einer möglichen Duchenne-Therapie zu entwickeln, müßten intakte Dystrophin-Gene in einer ex-vivo-Verfahren in Patienteneigene Mesoangioblasten durch Vektoren übertragen werden. Diese müßten dann im Laboratorium vervielfältigt und schließlich in die Blutbahn des Patienten zurückinjiziert werden. Da eine solche Behandlung periodisch wiederholt werden müßte, wäre es wichtig, daß diese Zellen vom Immunsystem nicht als fremd angesehen und abgestoßen würden.

Zur Zeit ist diese Technik das vielversprechendste Beispiel von Stammzellen als Therapie für Duchenne-Muskeldystrophie. Alle anderen Stammzellen, die an lebenden Mäusen ausprobiert wurden, brachten keine überzeugende Ergebnisse. Das Problem könnten die Muskelzellen selbst sein und nicht die Stammzellen, deshalb müssen die Forscher die Gründe für diese Schwierigkeiten herausfinden.

Dr. Partridge beendete seinen Vortrag mit der Warnung, daß es viele Berichte gibt über verschiedene Stammzellen als mögliche Therapien für Duchenne-Dystrophie. In den meisten Fällen sind solche Berichte voller Fallen für den Unvorsichtigen, und selbst erfahrene Wissenschaftler können von dem, was sie zu sehen meinen, getäuscht werden.

## Pharmakologische Methoden.

**Nichtbeachtung von vorzeitigen Stopp-Codons.** Die Proteine werden in *Ribosomen* produziert, großen Strukturen, die aus drei langen RNAs mit enzymatischer Aktivität, den *Ribozymen*, bestehen und aus ungefähr 80 verschiedenen Proteinen. Die genetische Information für die Konstruktion der Proteine wird den Ribosomen durch mRNAs überbracht. In den Ribosomen wird das neue Protein aus seinen Bausteinen, 20 verschiedenen Aminosäuren, zusammengesetzt. Sie werden von einer anderen Art von RNAs, den Transfer-RNAs oder tRNAs, angeliefert, die die Triplet-Codons eins nach dem anderen erkennen. Wenn ein normales Stopp-Codon in der mRNA die Synthesestelle im Ribosom erreicht, bedeutet das, daß das Protein fertig ist. Dann stoppen spezielle Proteine, die Lösungsfaktoren, *release factors*, die Synthese und lösen das fertige Protein vom Ribosom.

Etwa 10 bis 15% der Duchenne-Jungen haben eine

Punktmutation in ihrem Dystrophin-Gen, die ein Aminosäure-Codon in eines der drei Stoppcodons, TGA, TAG oder TAA abgeändert hat. In der mRNA werden diese Codons zu UGA, UAG und UAA, die die Proteinsynthese vorzeitig abbrechen, bevor das neue Protein, in diesem Fall Dystrophin, fertig ist.

*Gentamicin* ist ein Antibiotikum, das den RNA-Übersetzungsmechanismus in der Ribosomen veranlassen kann, solche vorzeitigen Stoppcodons zu ignorieren, d.h., *durch sie hindurchzulesen*. In Versuchstieren mit vorzeitigen Stopp-Codons in ihrer Dystrophin-mRNA, hat die Behandlung mit Gentamicin gezeigt, daß dadurch die Produktion von Dystrophin von normaler Länge und Funktion teilweise wiederhergestellt werden kann. Gentamicin kann jedoch toxisch sein und muß intravenös verabfolgt werden, so daß eine Langzeitbehandlung der Duchenne-Muskeldystrophie damit nicht praktisch wäre.

Falls eine verbesserte Durchlese-Technik zu einer Duchenne-Therapie entwickelt werden kann, werden nur die Patienten mit vorzeitigen Stopp-Codons von ihr profitieren können. Aufgrund der Ergebnisse der präklinischen Studien an Mäusen wird die begrenzte Menge des neu entstehenden Dystrophins die Krankheit nicht heilen, sondern sie nur in eine Art Becker-Dystrophie verändern können. Das Durchlesen geschieht nicht am Gen selbst, sondern während der Proteinsynthese in den Ribosomen, deshalb wird die Behandlung wiederholt erfolgen müssen. Um festzustellen, ob ein Duchenne-Junge mit einem Durchlese-Medikament behandelt werden kann, muß bekannt sein, daß er eine Punktmutation in seinem Dystrophin-Gen hat, die eines der drei verschiedenen Stopp-Codons in der mRNA erzeugt hat.

**PTC 124:** *Langdon Miller*, Leiter der medizinischen Abteilung der Firma **PTC Therapeutics** in South Plainfield NJ, berichtete über die Entwicklung und die klinischen Studien mit *PTC124*, einer neuen chemischen Verbindung, die sehr viel wirksamer als Gentamicin ist, ein Durchlesen von vorzeitigen Stopp-Codons zu veranlassen. Die Entwicklung einer Therapie der Duchenne-Muskeldystrophie und der Mukoviszidose mit der Stopp-Codon-Durchlesetechnik sind zwei Prioritäten der Forschungsaktivität der Firma PTC.

Mehrere Tausend chemische Substanzen wurden automatisch auf ihre Fähigkeit getestet, vorzeitige Stopp-Codons in den mRNAs sowohl für Dystrophin zu ignorieren als auch für das CFTR-Protein, das bei Patienten mit Mukoviszidose fehlt. Dann wurden viele chemische Variationen der Strukturen der aktivsten Verbindungen hergestellt, bis eine gefunden wurde, *PTC124*, die wirksamer als Gentamicin ist. Bei den Duchenne-Experimenten konnten fast normale Mengen von normalem Dystrophin in Zellkultur erhalten werden und in bis zu 25% der Muskelfasern von lebenden mdx-Mäusen nach oraler Gabe, was zu einer deutlichen Wiederherstellung ihrer Funktion und Gewebestruktur führte. Ein Durchlesen durch normale Stopp-Codons konnte nicht nachgewiesen werden. Toxizitätsstudien an Ratten und Hunden mit hohen Dosierungen des Medikamentes haben kaum schwere und akute Nebeneffekte gezeigt. Dieses potentielle Duchenne-Medikament ist ein Pulver, das zu Tabletten verarbeitet und durch den Mund verabfolgt werden kann.

Für die ersten klinischen Tests mit *PTC124* wurden zwei Phase-I-Studien mit gesunden erwachsenen Freiwilligen durchgeführt. Diese Studien zeigten, daß das Medikament sicher ist und wenige Nebeneffekte hat. Im vergangenen Jahr wurde eine Phase-II-Studie mit *PTC124* an 15 Mukoviszidose-Patienten durchgeführt. Sie zeigte, daß *PTC124* in der Lage ist, die CFTR-Aktivität in diesen Patienten teilweise wiederherzustellen, ohne schwere Nebeneffekte zu verursachen.

An drei klinischen Zentren in den Vereinigten Staaten läuft jetzt eine Phase-II-Studie, um die Wirkung von *PTC124* bei Duchenne-Patienten nachzuweisen. An dieser acht Wochen dauernden Studie nehmen 22 Duchenne-Jungen im Alter von 5 bis 12 Jahren teil. Sechs Jungen erhielten eine niedrige Dosis von *PTC124* dreimal pro Tag während vier Wochen, auf die eine Kontrollperiode von vier Wochen ohne Medikation folgte. Nachdem sich keine negativen Wirkungen zeigten, erhielt eine zweite Gruppe von 16 Jungen eine höhere Dosis von *PTC124* über vier

Wochen, wieder gefolgt von vier Wochen ohne Medikament.

Um das Ergebnis der Studie zu dokumentieren, wurden Muskelbiopsien vor und nach der Behandlung vorgenommen zum Nachweis einer Neusynthese von Dystrophin normaler Länge. Andere chemische und funktionelle Tests wurden ebenfalls durchgeführt, um die therapeutische Wirkung von *PTC124* in Duchenne-Jungen quantitativ zu messen. Die Ergebnisse werden Ende 2006 zur Verfügung stehen. Wenn sie so positiv ausfallen, wie es aufgrund der präklinischen Untersuchungen erwartet wird, und wenn die Genehmigungsbehörden in Europa und den Vereinigten Staaten die notwendige Erlaubnis gegeben haben, wird eine Phase-III-Studie wahrscheinlich im nächsten Jahr oder 2008 beginnen können.

**Hochregulieren von Utrophin:** Utrophin ist ein Protein, dessen Struktur und Funktion dem Dystrophin sehr ähnlich sind. Beim Menschen liegt sein Gen auf Chromosom 6. Es hat 75 Exons und ist etwa eine Million Basenpaare lang. Das Utrophin-Protein ist etwa 7% kürzer als Dystrophin. Es kommt in vielen Körpergeweben vor, auch in Muskeln, aber dort ist es auf die Stellen beschränkt, an denen die motorischen Nerven die Muskelmembranen berühren, den *motorischen Endplatten*. Utrophin kommt in zwei etwas verschiedenen Formen A und B vor. Die Muskeln enthalten nur die A-Form. Vor der Geburt ist die Utrophin-Konzentration viel höher als danach. Mdx-Mäuse, deren Utrophin-Gen experimentell inaktiviert, *knocked out*, wurde, die also weder Dystrophin noch Utrophin haben, zeigen Duchenne-ähnliche Symptome im Gegensatz zu "normalen" mdx-Mäusen, deren Muskeln weniger geschädigt sind.

Experimente mit Mäusen haben gezeigt, daß Utrophin, falls es in größeren Mengen vorhanden ist, Dystrophin ersetzen kann. Dies waren transgene Mäuse, die Mini-Utrophin-Gene in ihren Keimzellen hatten, welche durch eine Technik eingeführt wurden, die man beim Menschen nicht anwenden kann. Durch eine Vergrößerung der Utrophin-Menge um das Drei- bis Vierfache konnten die dystrophischen Symptome vermieden und eine vollständige Erholung der Muskelfunktionen erreicht werden.

Vor kurzem wurde gefunden, daß Duchenne-Jungen, die eine etwas größere Menge Utrophin in ihren Muskeln haben, ihre Gehfähigkeit später verlieren als diejenigen mit der normal geringen Menge. Dies ist ein Hinweis darauf, daß eine Erhöhung des Utrophins den gleichen Effekt wie bei Mäusen hätte und den Muskelabbau vermeiden oder verzögern könnte.

Für eine mögliche Duchenne-Therapie sollte man versuchen, die geringe Menge an Utrophin durch *Hochregulieren* der Aktivität seines Gens zu vergrößern. Um dies zu erreichen, wird eine aktivierende Substanz benötigt, die ein schon bekanntes Medikament, eine synthetische oder natürlich vorkommende Substanz sein könnte, welche mit dem Promoter des Gens reagiert. Die kleinen Moleküle einer solchen Verbindung würden wahrscheinlich leicht von den Muskelzellen aufgenommen werden, und wenn es sich um ein schon bekanntes Medikament handelt, würde es keine langdauernden Genehmigungsverfahren erfordern.

*Kay Davies* von der Universität Oxford, die mit ihren Mitarbeitern seit langem über Utrophin arbeitet, berichtete,

daß in Zusammenarbeit mit der Firma **VASTox plc.** in Oxford Tausende von chemischen Verbindungen auf ihre Fähigkeit getestet wurden, die Aktivität des Utrophin-Gens in mdx-Mäusen hochzuregulieren. Das Licht produzierende Enzym Luziferase aus Glühwürmchen wurde in einem Reagenziensystem verwendet, um diese Aktivität zu messen. Mehrere aussichtsreiche Substanzen wurden gefunden, die jetzt optimiert und in Muskelzellkulturen und in lebenden Mäusen geprüft werden, ob sie die Menge an Utrophin in allen Muskeln der Tiere genügend stark erhöhen können.

Eine der am stärksten aktiven Substanzen wurde schon systemisch in Mäusen durch Injektion in den Bauchraum getestet. Sie reagiert nur mit dem Promoter der A-Form des Utrophins, die im Muskel vorkommt. Das A-Utrophin in allen Skelettmuskeln der Mäuse, die getestet wurden, konnte auf das Zwei- bis Dreifache hochreguliert werden, aber man weiß noch nicht, ob es sich auch in den Herzmuskeln hochregulieren läßt.

Diese aktive Substanz wird jetzt weiter optimiert durch zusätzliche chemische Modifikationen. Klinische Versuche mit Duchenne-Patienten werden vorbereitet und könnten 2008 beginnen.

**Hemmung von Proteasen.** Der Abbau der Muskelproteine bei der Duchenne-Dystrophie wird von mehreren verschiedenen Proteasen verursacht, Protein zerstörenden Enzymen, wie *Calpain*, das durch Kalzium aktiviert wird, und durch einen großen Enzym-Komplex, der *Proteasom* genannt wird. Wenn die Muskelzellmembranen durchlässig werden, weil Dystrophin fehlt, fließen große Mengen von Kalzium-Ionen, elektrisch geladene Atome, in die Zellen und aktivieren Calpain und indirekt auch die Proteasome. Diese erhöhte Enzymaktivität führt zu umfangreicher Zerstörung von Proteinen, die für die Funktion der Muskelzellen und ihr Überleben notwendig sind. Mit speziell entwickelten Hemmstoffen können die Forscher die Aktivität von Calpain und anderen Proteasen blockieren, so daß der Muskelabbau verlangsamt wird. Das modifizierte Tripeptid *Leupeptin* war der zuerst gefundene Hemmstoff, der die Calpain-Aktivität in mdx-Mäusen herabsetzen konnte.

Dieser Hemmstoff derersten Generation besteht aus drei Aminosäuren, zwei Leuzinen und einem Arginin, wobei das Arginin eine chemisch reaktive Aldehydgruppe trägt, die für die Hemmwirkung verantwortlich ist. Leupeptin kann aber auch andere Proteasen hemmen, darunter diejenigen, die für die Blutgerinnung notwendig sind, und damit untragbare Nebeneffekte auslösen. Und ein Duchenne-Medikament sollte neben dem Calpain auch die Proteasomen hemmen können.

**C101: Theresa Michele**, Vizepräsidentin für klinische Forschung der **CepTor Corporation** in Baltimore teilte mit, daß durch die Kombination von Leupeptin und Carnitin ein Hemmstoff, C101 genannt, erhalten werden konnte, der nur in die Skelett- und Herzmuskelzellen eindringt. Der Grund für diese Selektivität ist der Carnitin-Transporter OCTN2, ein Protein, das sich an das Carnitin-Ende von C101 bindet und diesen Hemmstoff zu einem Rezeptor-Protein in der Muskelzellmembran bringt, der ihn dann durch die Membran hindurch in die Zellen einschleust.

Um die Wirkung eines potentiellen Medikamentes wie das C101 genau zu messen, mußte eine neue quantitative

Testmethode entwickelt werden, die es erlaubt, den von Calpain verursachten Abbau der Muskelzellproteine in lebenden Tieren und später auch im Menschen zu analysieren. Mit diesem Test wird die Spaltung des Muskelproteins Alpha-II-Spektrin durch Calpain gemessen. Calpain spaltet dabei in zwei Schritten das Spektrin-Molekül in zwei kleinere Proteine, SBDP150 und 145, die in das Blutserum übertreten und dort mit speziell angefertigten Antikörpern analysiert werden können. Mit diesem neuen Testverfahren kann der Verlauf des Muskelabbaus genau verfolgt werden, er sollte daher ganz allgemein für klinische Studien mit Duchenne-Patienten wichtig werden.

Mit dem Test konnte gezeigt werden, daß C101 Calpain etwa 50- bis 100mal so wirksam hemmen kann wie Leupeptin. C101 stabilisiert auch die Struktur der Muskeln und vergrößert deutlich den Durchmesser der Muskelfasern von mdx-Mäusen. Dieser neue Hemmstoff, der oral verabfolgt werden kann, ist daher ein potentiell wirksames Medikament für Duchenne-Patienten.

**BBIC:** In seinem zusammenfassenden Vortrag über die verschiedenen therapeutischen Methoden erwähnte **Lee Sweeney** das *Bowman-Birk-Hemmstoff-Konzentrat* (englisch BBIC), das andere Proteasen als Calpain blockiert, die sich auch an der Zerstörung der Muskelproteine beteiligen. Die aktive Substanz in dem rohen Konzentrat ist ein natürliches Protein, das aus 71 Aminosäuren besteht und in reiner Form aus Sojabohnen isoliert werden kann.

Die Langzeitbehandlung mit BBIC vergrößert die Muskelmasse und Muskelkraft von mdx-Mäusen. Die CK-Aktivitäten werden dabei deutlich verringert und die Fibrose ebenfalls. Und von anderen Anwendungen bei Krebspatienten ist bekannt, daß BBIC ein sicheres Medikament ist, das oral gegeben werden kann.

**SNT 198'438: Thomas Meier**, Wissenschaftlicher Direktor von **Santhera Pharmaceuticals** in Liestal bei Basel, beschrieb die vorklinischen Studien seiner Firma für die Entwicklung eines Hemmstoffes, der gleichzeitig sowohl die Aktivitäten von Calpain als auch des Proteasom-Enzymkomplexes blockieren kann. Ausgehend von einem bekannten Calpain-Hemmstoff synthetisierten die Wissenschaftler von Santhera über 800 verschiedene Strukturen und testeten diese Hemmstoffe in biochemischen Experimenten und Zellkulturen wie auch in mdx-Mäusen. Mehrere Verbindungen mit den gewünschten Eigenschaften konnten identifiziert werden.

Eine davon, SNT 198'438, wurde weiter optimiert. Sie kann subkutan angewendet, d.h., unter die Haut gespritzt werden. Sie wirkt systemisch und erreicht alle Muskeln. In mdx-Mäusen, in denen sie gut verträglich ist, normalisiert dieser Hemmstoff die Strukturen der Muskeln und verbessert die körperlichen Leistungen erwachsener Tiere. Die Tests dafür werden in einem großen "Mäuse-Fitness-Studio" durchgeführt, in der bis zu 40 Mäuse freiwillig mehrere Wochen lang nachts in von Computern überwachten Laufrädern laufen können.

**SNT-MC17/Idebenone zum Schutz der Mitochondrien:** **Santhera Pharmaceuticals** entwickelt auch ein Medikament, das Mitochondrien schützen kann, die Kraftwerke der Zellen, in denen der universelle Energieträger Adenosintriphosphat, ATP, durch oxidative Phosphorylierung erzeugt wird. In seinem zweiten Vortrag, erklärte **Thomas**

**Meier**, daß diese Verbindung, *Idebenone* oder SNT-MC17, an Patienten mit Friedreich-Ataxie in einer klinischen Phase-III-Studie in Europa und den Vereinigten Staaten getestet wird. Friedreich-Ataxie ist eine neuromuskuläre Krankheit, die oft mit einer Kardiomyopathie, einer ernsten Erkrankung des Herzmuskels, verbunden ist.

SNT-MC17/Idebenone ist ein starkes Antioxidanz mit einer chemischen Struktur, die vom natürlichen Coenzym Q10 abgeleitet ist. Die optimierte Struktur hat eine abgeänderte und viel kürzere Seitenkette, die es dem Molekül gegenüber dem Coenzym Q10 wesentlich erleichtert, in die Muskelzellen einzudringen. Es wurde auch gezeigt, daß SNT-MC17/Idebenone die Produktion von ATP in den Mitochondrien begünstigt. Es kann als Tablette oral verabfolgt werden.

Das Fehlen von Dystrophin beeinflusst auch die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien der Herzmuskeln von Duchenne-Patienten und wahrscheinlich ebenfalls die der Skelettmuskeln. Eine doppelblinde und Placebo-kontrollierte Phase-IIa klinische Studie wird zur Zeit in Belgien unter der Leitung von Dr. *Gunnar Boyse* durchgeführt. In diese Studie sind bereits alle geplanten 21 Duchenne-Jungen im Alter von 8 bis 16 Jahren aufgenommen worden. Das Hauptziel dieser Studie ist es festzustellen, inwieweit das SNT-MC17/Idebenone die Funktion der Herzmuskeln beeinflusst. Darüberhinaus werden aber auch Tests durchgeführt, um mögliche funktionelle Verbesserungen der Muskelkraft in Duchenne-Jungen zu erkennen, die mit SNT-MC17/Idebenone behandelt werden. Die teilnehmenden Jungen erhalten das Studien-Medikament über 12 Monate dreimal täglich in Form von Tabletten, die entweder 150 mg SNT-MC17/Idebenon oder Placebo enthalten.

Dieser klinische Versuch wird "Langzeitstudie zur Wirkung von hohen Dosen von Idebenone", englisch DELPHI genannt. Ihre Ergebnisse werden in etwa einem Jahr erwartet.

Ein Interview mit Dr. Meier steht im Internet unter [www.duchenne-forschung.de](http://www.duchenne-forschung.de).

**Poloxamer 188, ein molekulares "Pflaster"**: Ein Versuch, die Herzmuskelzellen bei einer Kardiomyopathie zu schützen, zeigt wie man auch Löcher in den Membranen von dystrophischen Muskeln schließen könnte. Dieser neue Weg zu einer Duchenne-Therapie wurde von *Joseph Metzger* von der Universität von Michigan in Ann Arbor vorgestellt. Das Fehlen von Dystrophin in mdx-Mäusen und Duchenne-Jungen beeinflusst nicht nur die Skelettmuskeln, sondern hat auch ernste Konsequenzen für die korrekte Funktion der Herzmuskeln.

Es konnte gezeigt werden, daß der speziell entwickelte Kunststoff *Polaxamer 188* oder *P 188* einen positiven Einfluß auf die Herzfunktion von mdx-Mäusen hat. Um diese schützende Wirkung in isolierten mdx-Herzmuskelzellen genau zu messen, wurden einzelne Zellen mit ihren Enden an zwei sehr dünne bewegliche Kohlenstoffasern angeheftet. Da diese Muskelzellen etwa eintausendmal kürzer sind als die Skelettmuskeln der Mäuse, kann der Abstand der beiden Mikro-Kohlenstoffasern nur zwischen 1,8 und 2,2 µm, Tausendstel eines Millimeters, verändert werden. Während normale Zellen viele Stunden lang gedehnt und entspannt werden können, konnte durch diese Meßeinrichtung gezeigt werden, daß mdx-Fasern auf äußere Einwirkungen viel schlechter reagieren: Sie lassen sich

schlechter dehnen, kontrahieren sich zu stark, reißen von den Kohlenstoffasern ab und sterben schließlich. Mit dieser neuen *mikroskopischen Testmethode* konnte gezeigt werden, daß P 188 das normale Verhalten der Herzmuskeln von mdx-Mäusen und auch von dystrophischen GRMD-Hunden wiederherstellen kann. Durch die Behandlung lebender mdx-Mäuse mit P 188 wurden ihre akuten Herzprobleme verhindert. Dies konnte mit Mini-Katheter in den Herzen lebender Mäuse gemessen werden, die etwa 600mal in der Minute schlagen.

P 188 ist ein synthetisches Plastik-Molekül, ein Copolymer, das aus einer mittleren Region aus 35 kleinen hydrophoben, Wasser abstoßenden Einheiten besteht und zwei "Flügel", zwei Endregionen, aus jeweils 75 Einheiten mit einer hydrophilen, Wasser anziehenden Struktur. Dr. Metzger nannte diesen Kunststoff einen molekularen *Albatroß*, dessen zentrale hydrophobe Struktur die Löcher der Membranen überdeckt, deren Innenseite auch hydrophob sind, während die beiden hydrophilen Flügel sich wie die klebrigen Enden eines Pflasters benehmen, weil sie sich an die hydrophile Oberfläche der intakten Membran am Rand der Löcher anlagern können. Dieses molekulare Pflaster verschließt die Löcher der Membranen zumindest zeitweise, so daß keine Kalzium-Ionen mehr passieren können, die Calpain und die anderen Protein-zerstörenden Enzyme aktivieren würden.

Selbstverständlich könnte diese schützende Wirkung von Polaxamer 188 auf die Herzmuskeln auch für die Reparatur von dystrophischen Skelettmuskelzellen wichtig sein. Dies ist auch schon überprüft worden, doch die ersten Ergebnisse waren nicht so gut wie erwartet. Die Forschungen darüber werden fortgesetzt und könnten zu einer weiteren Möglichkeit einer Duchenne-Therapie führen.

**Hemmung von Myostatin**: *Myostatin* ist ein Protein, das in den Muskeln gebildet wird und aus 375 Aminosäuren besteht. Nach mehreren molekularen Umlagerungen wird es biologisch aktiv und verursacht dann eine Reihe von chemischen Reaktionen in den Zellen, die zur Deaktivierung von Enzymen führt, die für die Biosynthese von neuen Muskelproteinen notwendig sind. Durch eine Hemmung von Myostatin könnte deshalb wahrscheinlich die Regeneration von Muskelfasern der Duchenne-Jungen stimuliert werden, so daß sie nicht mehr so schnell zerstört werden, sie könnten sogar größer werden.

Nicht-dystrophische Mäuse, deren Myostatin-Gen mit genetischen Methoden deaktiviert wurde, haben bis zu dreifach vergrößerte Skelettmuskeln mit deutlich mehr Fasern mit übermäßigem Durchmesser. Es gibt Rinder, die belgische blaue Rasse, die sehr muskulös sind, weil ihr Myostatin-Gen vor einigen Jahrhunderten durch eine Mutation inaktiviert wurde. Und in Berlin wurde ein jetzt 7 Jahre alter Junge gefunden, dessen Skelettmuskeln etwa doppelt so groß als in einem normalen Kind sind. Er ist physisch sehr stark. Seine Mutter war eine olympische Läuferin, und einige andere Verwandte waren ebenfalls sehr stark. Weil eine Mutation in dieser Familie den normalen Spleißvorgang der drei Myostatin-Exons geändert hatte, haben der Junge und wahrscheinlich auch seine betroffenen Verwandten sehr wenig Myostatin in ihren Muskeln. Dies ist ein Hinweis darauf, daß ein Herunterregulieren oder Hemmen des Myostatins zu einem verstärkten Muskelwachstum auch in Duchenne-Jungen führen würde.

**Myo 029:** *Kathryn Wagner* vom Wellstone-Muskeldystrophie-Zentrum der Johns Hopkins Universität in Baltimore berichtete, daß ihre Forschungsgruppe mdx-Mäuse gezüchtet hat, die nicht nur kein Dystrophin hatten, sondern auch kein Myostatin bilden konnten. Erwachsene Mäuse dieser *knock-out*-Tiere hatten mehr normale Muskeln, weniger Fibrose, Narbengewebe, und sie regenerierten ihre Muskeln schneller als "normale" mdx-Mäuse. Zusammen mit Dr. *Lee Sweeney* werden ähnliche Experimente mit dystrophischen Hunden durchgeführt werden.

Die Frage war jetzt, ob das Fehlen von Myostatin auch ähnliche Wirkungen auf das Herz haben könnte. Dies würde einer Kardiomyopathie entgegenwirken, aber eine Hypertrophie, ein vergrößertes Herz, würde bei Duchenne-Jungen zu Problemen führen. Neue Untersuchungen an mdx-Mäusen zeigten, daß die Blockade von Myostatin keine Wirkung auf das Herz hat. Dies bedeutet, daß die Aktivität von Myostatin auf die Skelettmuskeln allein beschränkt ist.

In Zusammenarbeit mit der Firma **Wyeth Pharmaceuticals**, wurde eine klinische Phase-I/II-Studie mit drei verschiedenen Dosierungen des potentiellen Medikamentes *Myo 029* an 36 erwachsenen Muskeldystrophie-Patienten, darunter einige Becker-Patienten, begonnen. *Myo 029* ist ein spezifischer Antikörper, der sich an Myostatin bindet und seine Aktivität blockiert. Er verursacht keine Immunreaktion, weil er eine menschliche Struktur hat, er ist "humanisiert". Er kann in den Blutkreislauf oder unter die Haut injiziert werden.

Falls die klinische Studie positive Ergebnisse zeigen sollte, wird Wyeth sich intensiv bemühen, *Myo 029* zur klinischen Anwendung zu bringen.

Die Eltern sollten aber auf keinen Fall jetzt sogenannte Myostatin-Hemmstoffe über das Internet kaufen. Diese Substanzen sind nicht klinisch getestet und deswegen unwirksam oder sogar gefährlich.

**Hochregulierung des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktors IGF-1:** Dieser Faktor ist ein Protein aus etwa 70 Aminosäuren in einer Kette mit drei stabilisierenden Brücken, er hat deswegen eine ähnliche Struktur wie Insulin. Sechs Formen mit etwas verschiedenen Strukturen können vom Menschen gebildet werden. IGF-1 hat einen positiven Einfluß auf die Muskeln, weil es ihr Wachstum und ihre Kraft fördert. Seine Wirkung ist aber nicht nur auf Muskeln beschränkt. Wenn Satellitenzellen durch Verletzung oder Abbau der Muskeln aktiviert werden, produzieren sie ein spezifisches Rezeptor-Protein in ihren Membranen, an das sich IGF-1 bindet. Die Folge ist eine Stimulation der Satellitenzellen, so daß sie sich zu Myotuben und neuen Muskelfasern entwickeln. Da diese Stimulation der Regeneration von Muskelfasern für die Erhaltung von dystrophischem Muskelgewebe wichtig wäre, könnte IGF-1 möglicherweise therapeutisch bei Duchenne-Kindern angewendet werden. Andere Gewebe können aber auch von IGF-1 beeinflußt werden, und wenn seine Konzentration im Blut hoch ist, führt das zu einem erhöhtem Krebsrisiko. Für eine Entwicklung von IGF-1 zu einer Therapie für Muskelkrankheiten müßte man daher Wege finden, die möglichen Nebeneffekte auf andere Gewebe zu vermeiden.

**IPLEX:** Die Forschungsgruppe von *Elisabeth Barton* an der Universität von Pennsylvania in Philadelphia arbeitet

mit Mäusen, die aus einer Kreuzung von mdx-Mäusen mit transgenen, d.h. genetisch veränderten, Mäusen hervorgehen, die erhöhte Mengen von IGF-1 in ihren Muskeln während ihres ganzen Lebens bilden. Diese *mdx-IGF-plus-Mäuse* haben ein beschleunigtes Muskelwachstum mit ziemlich gesund aussehenden Muskeln und weniger Fibrose als "normale" mdx-Mäusen. Diese Ergebnisse zeigen, welchen Nutzen IGF-1 den Duchenne-Kinder bringen könnte.

Aber weil dieser Wachstumsfaktor in viele Signal-Prozesse der Zellen eingreift, können möglicherweise ernste Nebeneffekte nicht ausgeschlossen werden, wenn höhere Dosierungen verwendet werden, um die Wirkung auf Muskeln zu optimieren. Deswegen wurde eine Methode entwickelt, mit der das IGF-1 durch eine Koppelung an das IGF-Bindungsprotein-3 maskiert wird, das ein natürliches Protein in der Blutzirkulation ist. Dieser Komplex setzt das IGF-1 nur dann dort frei, wo es gebraucht wird und hilft auch, den Faktor im Blutkreislauf zu stabilisieren so daß weniger Injektionen nötig sind. Eine kommerzielle Formulierung dieses Komplexes, genannt **IPLEX™**, wurde bereits von der FDA, der amerikanischen Behörde für die Genehmigung von Medikamenten, für die Behandlung von Wachstumsstörungen bei Kindern wegen fehlendem IGF-1 zugelassen.

Eine erste klinische Studie mit IPLEX wird jetzt an der Universität von Rochester an 15 erwachsenen Patienten mit myotoner Dystrophie durchgeführt, die von der staatlichen Gesundheitsbehörde NIH und der Muskeldystrophiegesellschaft MDA in den USA unterstützt wird. Eine Studie zur Optimierung der Dosierung wird 2007 folgen. Diese Strategie könnte sehr effektiv sein, um IGF-1 in die Muskeln zu bringen, ohne Nebeneffekte in anderen Geweben zu verursachen.

Ein anderer Weg, höhere Konzentrationen von IGF-I in Muskeln zu erhalten, wäre der Transfer seines Gens in die Muskeln mit Vektoren wie dem Adeno-assoziierten Virus AAV, der die Muskeln veranlassen würde, mehr IGF-I zu bilden. Erste Experimente dazu sind in Dr. Bartons Laboratorium begonnen worden. Sie zeigten, daß nur eine von zwei ähnlichen Formen von IGF-I, nämlich IGF-IA, in mdx-Mäusen zu Hypertrophie führt, zu einer Vergrößerung der Muskelfasern. Weitere Experimente zeigten, daß sich mit dieser Technik die Menge an IGF-IA um das 30- bis 40fache vergrößern läßt nach einer intramuskulären Injektion von AAV-Vektoren mit dem korrekten IGF-I-Gen. Das neugebilderte IGF-I blieb in den Muskeln, es trat nicht langsam in das Blut über, deswegen ließen sich die Nebeneffekte vermeiden, die eine Aktivierung von Nicht-Muskelgeweben verursachen könnte.

Eine Gentherapie mit Viren wird aber mehrere Jahre brauchen, bis sie mit Duchenne-Jungen versucht werden kann. Die Forschung kann aber jetzt schon versuchen, die Form des IGF-I zu finden, die die beste Wirkung bei Muskeldystrophie haben wird.

**Project Catalyst: Automatisch Kandidaten für neue Medikamente suchen:** *Ellen Welch*, Leiterin einer Forschungsgruppe bei der Firma **PTC Therapeutics** in South Plainfield NJ sprach über *Project Catalyst*, "Projekt Katalysator", das vor zwei Jahren begonnen wurde und vom amerikanischen Parent Project finanziell unterstützt wird. Es ist ein Beispiel, wie eine engagierte kleine Firma die modernsten automatischen Techniken anwendet, um unter

etwa 200.000 Verbindungen mit kleinen Molekülen die sehr seltenen zu finden, die mögliche Kandidaten für medikamentöse Eingriffe sein könnten, welche in den drei vorangegangenen Abschnitten diskutiert wurden: Aktivieren von Uteronin und IGF-1, hemmen von Myostatin und außerdem aktivieren von Alpha-7-Integrin.

Die Erfahrungen bei der Entwicklung von PTC124 zum Durchlesen von Stopp-Codons half dabei, die automatischen Suchmethoden zu optimieren, um möglichst viele Kandidaten für die gewünschten potentiellen Medikamente zu identifizieren. Die Testmethode zum Messen der Aktivitäten benutzt dafür ein sog. "Reporter"-Protein-System: Die verschiedenen Sequenzen mit Regelfunktionen an den Enden der mRNAs für jede der vier Zielsubstanzen, deren Expression geändert werden sollte, die sog. nicht-übersetzten Regionen, englisch UTR, wurden mit dem Gen für das Enzym Luziferase verbunden, das das Licht in Glühwürmchen produziert. Diese Glühwürmchen-Konstruktion wurde in Nierenzellen in der Form eingebracht, daß in Gegenwart einer aktiven Verbindung die Lichtintensität des Luziferase-Reporters entweder stärker oder schwächer wird. Die große Mehrheit der inaktiven Verbindungen ändert die Lichtintensität nicht wesentlich. Die automatische und präzise Messung von Lichtintensitäten in einem sehr kleinen Probevolumen ist viel einfacher als die Analyse der biologischen Aktivität der Zielsubstanzen Uteronin, Myostatin, IGF-1 und Alpha-7-Integrin.

Zwei umfangreiche Suchverfahren wurden für jede der vier Zielsubstanzen durchgeführt. Unter den 200.000 geprüften Verbindungen wurden mehrere identifiziert, die entweder Uteronin, IGF-1 oder Alpha-7-Integrin hochregulieren oder Myostatin herunterregulieren konnten. Alle diese "Treffer", Substanzen, die wenigstens einige der gewünschten Eigenschaften hatten, werden jetzt durch Veränderungen ihrer Struktur optimiert. Dies wird viele Chemiker für einige Jahre beschäftigen. Für die Optimierung des Durchlese-Medikamentes PTC124 zum Beispiel wurden in zwei Jahren Laboratoriumsarbeit etwa 4.000 chemische Modifikationen an der ursprünglich gefundenen aktiven Struktur vorgenommen.

Die nächsten Schritte in der präklinischen Entwicklung der neuen potentiellen Duchenne-Medikamente wird auch mehrere Jahre in Anspruch nehmen. Zusätzlich zu den Änderungen der chemischen Struktur werden die biologischen Eigenschaften der am meisten aktiven Substanzen in allen Einzelheiten untersucht, z.B. durch Studien an Zellkulturen und in lebenden Mäusen zur Messung der Toxizität, des Stoffwechsels und des pharmakologischen Verhaltens, d.h. der biochemischen Änderungen im lebenden Organismus, die unerwünschte Nebeneffekte verursachen können, dies aber hoffentlich nicht tun.

Danach werden klinische Prüfungen der erfolgversprechendsten Substanzen an Duchenne-Patienten folgen, die einige Jahre dauern werden.

**Hemmung von TGF-Beta:** Im ersten Teil seines Vortrags erklärte *Andrew Hoey* von der University of Southern Queensland in Australien die Rolle der Fibrose und was man möglicherweise dagegen tun kann.

Die Fibrose führt zu Narbengewebe, das durch eine Überproduktion von Bindegewebe und deren Ablagerung zwischen den Skelett- und Herzmuskelfasern verursacht wird, und das die abgebauten und verlorenen Fasern ersetzt. Unter normalen Umständen hält das Bindegewebe

die Muskelfasern zusammen, doch erhöhte Mengen davon führen zur Versteifung der Muskeln und zu Kontrakturen. Bindegewebe besteht hauptsächlich aus dem Protein Kollagen, einem ziemlich unelastischen Molekül, das von Zellen gebildet wird, die Fibroblasten genannt werden. Dies geschieht während des Degenerations- und Regenerationsprozesses bei der Duchenne-Muskeldystrophie unter dem Einfluß von Wachstumsfaktoren, zu denen auch der sog. *Beta-Transformationsfaktor*, englisch TGF-Beta, gehört.

TGF-Beta begünstigt die Synthese und den Zusammenschluß der Kollagenmoleküle zu dem sehr wenig flexiblen Bindegewebe. Daher wäre die Hemmung der Aktivität von TGF-Beta eine Möglichkeit, die Fibrose zu unterdrücken. Ein Medikament, das dies tun könnte, ist *Pirfenidon*, das bereits als Mittel zur Behandlung der Fibrose in Lungen zugelassen ist. Acht Monate alte mdx-Mäuse, die sieben Monate lang mit diesem Medikament behandelt wurden, hatten weniger TGF-Beta in ihren Muskeln, und ihre Herzfunktion war praktisch normal geworden, aber die Fibrose konnte in diesen alten mdx-Mäusen nicht vermindert werden. In neuen Experimenten soll untersucht werden, ob das Medikament in jüngeren Mäusen wirksamer ist.

**L-Arginin und nNOS:** Im zweiten Teil seines Vortrags diskutierte *Andrew Hoey* eine andere Konsequenz des fehlenden Dystrophins, nämlich die verringerte Menge eines der Proteine des Dystrophin-Glykoprotein-Komplexes, des Enzyms *neuronal Stickoxid-Synthase*, nNOS. Dieses Enzym produziert Stickoxid, NO, aus der Aminosäure L-Arginin. Obgleich NO ein Gas ist, wirkt es wie ein Hormon und reguliert unter anderem die Entspannung von Blutgefäßen. Dies ist wichtig für die normale Versorgung der Muskeln mit Blut und damit mit Energie. Wenn nNOS fehlt, entwickelt sich eine Herz-Fibrose, und dies ist sicher der Grund für die verstärkte Fibrose im Herzen von mdx-Mäusen und auch von Duchenne-Patienten.

Die tägliche Behandlung von anfangs sechs Monate alten mdx-Mäusen mit L-Arginin über sechs Monate reduzierte die Fibrose in ihren Herzen, erhöhte dort den Blutdurchfluß und verbesserte die Funktion. In jetzt laufenden Experimenten wird der genaue Mechanismus dieses Effektes von L-Arginin untersucht, bevor in weiteren Arbeiten geprüft werden kann, ob L-Arginin zu einem Medikament für Duchenne-Jungen entwickelt werden sollte.

**Behandlung von Entzündungen:** Der Abbau und das Absterben von Muskelzellen verursacht Entzündungsvorgänge, die die Zelltrümmer beseitigen. Steroide können Entzündungen unterdrücken, und das ist wahrscheinlich der Grund, warum das Medikament *Prednison*, dessen aktive Form *Prednisolon* und das mit ihm verwandte *Deflazacort* in der Lage sind, die Muskelmasse und Muskelkraft zu erhöhen sowie die Immunantwort zu unterdrücken, allerdings oft mit unangenehmen Nebenwirkungen. Sie werden in großem Maße bei Duchenne-Jungen angewendet, um die Muskelfunktionen wenigstens einige Jahre zu erhalten. Doch der genaue Mechanismus ihrer Wirkung ist immer noch nicht genau bekannt.

*Sylvia Lopez*, eine Doktorandin im Laboratorium von Dr. *Melissa Spencer* an der Universität von Los Angeles, berichtete über Experimente, die das Ziel haben, neue Medikamente zu finden, um ganz spezifisch die Entzündungen und Immunreaktionen in den Muskeln zu bekämpfen.

Es konnte gezeigt werden, daß erhöhte Konzentrationen

von CD4- und CD8-T-Zellen des Immunsystems den Fortschritt der Krankheit beschleunigen und daß die Hemmung der beiden Zellsorten die ziemlich leichten Symptome der mdx-Mäuse verringern, aber sehr deutlich die viel ernsteren Symptome der wirklich kranken utr-/mdx-Mäuse, denen nicht nur Dystrophin fehlt, sondern die auch kein Utrophin haben. Dadurch wird auch die Lebenszeit dieser Mäuse verlängert.

Außerdem sind in mdx- und Duchenne-Muskeln die Cytokine vermehrt, Proteine, die die Entzündungen und die Entwicklung der Fibrose begünstigen. Deshalb würd die Hemmung oder Entfernung der CD4- und CD8-Zellen und auch eine Änderung der aktiven Cytokine wahrscheinlich den Abbau der dystrophischen Muskeln verlangsamen. Es gibt bereits eine Reihe von zugelassenen entzündungshemmenden Medikamenten. Wenn man nachweisen könnte, daß sie die Duchenne-Dystrophie positiv beeinflussen, könnten sie schnell für die zusätzliche Behandlung der Muskeldystrophie zugelassen werden.

Mit drei dieser Medikamente wird jetzt in Dr. Spencers Laboratorium gearbeitet, um festzustellen, ob sie eine Hilfe für Duchenne-Patienten wären. Sie werden bereits in klinischen Studien gegen andere Krankheiten getestet: *CTLA-4lg* gegen rheumatische Arthritis, *Galectin-1* ebenfalls gegen Arthritis und es verbessert auch die Muskelregeneration, und *Anti-asialo GM1*, ein Antikörper gegen die Parkinson-Krankheit, um nur einige der Krankheiten zu nennen, die beeinflußt werden könnten.

Weitere vier bekannte Medikamente werden folgen: *Raptiva®*, bereits gegen Psoriasis zugelassen; *Tisabri®*, zugelassen gegen Multiple Sclerosis und Crohn-Krankheit; *Remicade®* und *Enbrel®*, die beide gegen rheumatische Arthritis und andere Krankheiten zugelassen sind.

Studien zur Langzeitbehandlung werden nötig sein, um festzustellen, ob diese Medikamente zu Therapien für Du-

chenne-Muskeldystrophie entwickelt werden können.

**Biglykan:** Zum Abschluß der Konferenz berichtete *Justin Fallon* von der Brown University in Providence RI über eine unerwartete Entdeckung, die zu einer Therapie der Duchenne-Dystrophie führen könnte. In seinem Laboratorium wird seit acht Jahren über das Protein *Biglykan*, gearbeitet. Das bisher ziemlich unbekannte Protein verbindet die beiden Enden der Proteine Alpha- und Gamma-Sarkoglykan an der Außenseite der Skelettmuskelmembranen miteinander. In Experimenten mit Mäusen, deren Gen für BGN inaktiviert war, wurde gefunden, daß nur noch wenige Proteine des Dystrophin-Komplexes vorhanden waren. Eine Behandlung dieser Mäuse mit lokalen und systemischen Injektionen von BGN führte zum Wiedererscheinen von Beta-Syntrophin. Dies ist ein Zeichen dafür, daß der Dystrophin-Komplex wieder vollständig war. Biglykan scheint besonders wichtig für junge Mäuse zu sein, solange die Muskeln kein Dystrophin brauchen, sondern mit Utrophin auskommen.

Mit ganz neuen Arbeiten konnte gezeigt werden, daß eine Behandlung von mdx-Mäusen mit Biglykan die pathologischen Symptome positiv beeinflusst. Da BGN in geringer Menge normal in Mäusen vorkommt, gab es keine immunologischen Abwehrreaktionen und auch beim Menschen würde man sie nicht erwarten. Die Alpha- und Gamma-Sarkoglykane kommen nur in Skelett- und Herzmuskeln vor. Und da BGN diese beiden Proteine verbindet, könnte es vor allem in diesen beiden Muskeltypen aktiv sein und nur wenige Nebeneffekte verursachen.

Die Tierexperimente werden fortgesetzt, um die Behandlungsbedingungen zu optimieren. Klinische Phase-I-Studien könnten dann in etwa zwei Jahren beginnen mit diesem unerwarteten potentiellen neuen Duchenne-Medikament *Biglykan*.

## Warum ist die mdx-Maus nicht wirklich krank?

**GAMT:** Diese Frage wurde von *Brian Tseng* und seiner Arbeitsgruppe an der Universität von Colorado in Denver gestellt. Die mdx-Maus hat kein Dystrophin wegen eines vorzeitigen Stopp-Codons im Exon 23 ihres Dystrophin-Gens, doch sie hat keine der behindernden Krankheitssymptome der menschlichen Duchenne-Dystrophie, sie ist bemerkenswert gesund. Sie läuft zum Beispiel freiwillig etwa fünf bis sechs Kilometer pro Nacht in einem Laufrad. Sie lebt etwa zwei Jahre lang. Wenn man sie nebeneinander sieht, kann man eine mdx-Maus von einer normalen Maus nicht unterscheiden. Die mdx-Maus hat aber einige äußerlich wenig auffällige Duchenne-Symptome wie z.B. hohe CK-Werte, zentral angeordnete Zellkerne, etwas erhöhte Fibrose und ein ziemlich schwer betroffenes Zwerchfell, das aber keine Atmungsprobleme verursacht.

Könnte die mdx-Maus uns zeigen, welche Behandlungsstrategie für eine mildere Form der Muskeldystrophie ohne Dystrophin man entwickeln sollte? Dr. Tseng glaubt, daß es *modifizierende Gene* gibt, die bei der Maus hochreguliert, in Duchenne-Jungen aber herunterreguliert sind. Hochregulierung von Utrophin, Satellitenzellen und revertierte Zellen, sowie Herunterregulierung von Myostatin sind Effekte der modifizierenden Gene, die parallel sowohl in mdx-Mäusen als auch in Duchenne-Patienten aktiviert sind. Dr. Tseng interessiert sich aber viel mehr für die

Gene, die gegensätzlich aktiviert oder deaktiviert sind. Da es wahrscheinlich andere modifizierende Gene gibt, die für die verschiedenartigen Symptome verantwortlich sind, bestimmte Dr. Tseng und seine Kollegen mit einer automatischen Suchtechnik die mRNA-Konzentration von 30.000 Genen in den Skelettmuskeln von mdx-Mäusen und normalen Mäusen.

Sie fanden 45 hochregulierte Gene, die jedoch in Duchenne-Jungen herunterreguliert sind. Zwei von ihnen waren besonders interessant: die Gene für die Enzyme *Arginin:Glycin-Amidotransferase*, AGAT, und für *Guanidinoacetat-Methyltransferase*, GAMT, die für die Biosynthese von Kreatin notwendig sind, einer niedermolekularen Verbindung, die eine wichtige Rolle für die Versorgung der Muskelzellen mit chemischer Energie spielt. In der mdx-Maus sind beide Enzyme hochreguliert, deshalb kann die mdx-Maus Kreatin in ihren Muskeln bilden. Dr. Tseng glaubt, daß das Fehlen von Dystrophin in Duchenne-Jungen und in mdx-Mäusen Probleme mit einem anderen Protein verursacht, nämlich mit dem *Kreatin-Transporter* in den Muskelzellmembranen und daß deshalb oral gegebenes Kreatin so wenig wirksam ist. Es sieht so aus, als wenn das Hochregulieren von AGAT und GAMT in mdx-Mäusen, das Herunterregulieren dieser beiden Enzyme in Duchenne-Jungen, sowie die falsche Anordnung

des Kreatin-Transporter-Proteins sowohl in mdx-Mäusen als auch in Duchenne-Patienten alles zweitrangige Konsequenzen des Fehlens von Dystrophin in sind.

Deshalb wurde eine mdx-Maus erzeugt, deren GAMT-Gen deaktiviert ist. Diese *Doppelnull-Maus* kann nicht normal laufen, sie stirbt früh und ihre Muskelstruktur sieht ähnlich aus wie die in Biopsien von Duchenne-Jungen.

Wegen dieser Unterschiede haben Duchenne-Jungen nur 20% der normalen Menge an Kreatin in ihren Muskeln, während es bei den mdx-Mäusen 80-90% sind. Dies kann einer der Gründe sein für die sehr viel ernsteren dys-

trophischen Symptome der Jungen verglichen mit denen der mdx-Maus. Weitere Untersuchungen dieser und anderer Unterschiede könnten erklären, warum die mdx-Maus nicht wirklich krank ist, und dies würde dann vielleicht zu einer neuen Behandlungsmöglichkeit für Duchenne-Muskeldystrophie führen. Vielleicht könnte man im Rahmen von *Project Catalyst* versuchen, Substanzen zu finden, die die "guten" modifizierenden Gene hochregulieren können. Dies wäre ein lohnenswertes Ziel, um die Dystrophie der Duchenne-Jungen abzumildern.

### Wenn es noch keine Heilung gibt, warum müssen wir dann die Mutation genau kennen?

**Kevin Flanigan** von der Universität von Utah in Salt Lake City beantwortete diese Frage: Die exakte Mutation eines Jungen, der Duchenne-Dystrophie zu haben scheint, sollte bekannt sein, um zu beweisen, daß er wirklich Duchenne-Dystrophie hat und nicht eine der anderen Muskelkrankheiten, wie z.B. eine der vielen Gliedergürtel-Dystrophien, die ähnliche Symptome wie Duchenne haben können. Obgleich man durch die Mutation nicht in allen Fällen eine Duchenne- von einer Becker-Dystrophie unterscheiden kann, ist eine Duchenne-Muskeldystrophie immer sehr viel wahrscheinlicher, wenn das Leseraster verschoben ist. Deshalb kann in den meisten Fällen eine Muskelbiopsie vermieden werden. Außerdem erlaubt die Kenntnis der genauen Mutation eine zuverlässige genetische Beratung der Familie des kranken Jungen und seinen über die Mutter verwandten weiteren Familien, in denen Duchenne-Überträgerinnen gefunden werden können. Schließlich werden die zukünftigen Therapien, wie das Exon-Skipping oder das Durchlesen durch Stopp-Codons, es erfordern, daß die spezifische Mutation im Dystrophin-Gen des Patienten bekannt ist.

Um Deletionen und Duplikationen zu finden und genau zu charakterisieren, verwendet man jetzt meistens die MLPA Methode, die auf Englisch *multiplex ligation-dependent probe amplification* heißt und vor einigen Jahren von Dr. **Jan Schouten** von der Firma **MRC-Holland** in Amsterdam entwickelt wurde. Eine sehr kurze Beschreibung dieser Methode wäre: Für jede Analyse werden 158 (2 x 79) Oligodeoxynukleotide mit speziell konstruierten Basensequenzen verwendet, die komplementär zu zwei Sequenzen in jedem der 79 Dystrophin-Exons sind. Wenn ein Exon vorhanden ist, binden sich die beiden für dieses Exon bestimmten Oligonukleotide an die beiden Stellen des Exons mit der Komplementärsequenz und werden danach miteinander chemisch verbunden. Die verbundenen Nukleotide dienen dann als "Template" für eine PCR-Amplifizierung, mit der geringe Mengen genetischen Materials stark vervielfacht werden kann. Die verschiedenen langen Produkte dieser Reaktion kann man dann nach einer elektrophoretischen Trennung als "Peaks" auf einem Computerausdruck sehen. Wenn ein bestimmtes Exon nicht vorhanden ist, weil es deletiert ist, können die beiden Nukleotide für dieses Exon sich nicht an seine Sequenzen anlagern und auch nicht miteinander verbunden werden. Der entsprechende "Peak" fehlt dann in dem Ausdruck.

Mit dieser Technik findet man die Deletionen und Duplikationen aller 79 Exons des Dystrophin-Gens in Duchenne-Patienten, nicht jedoch Punktmutationen. Und weil es sich um eine quantitative Methode handelt, können auch

Deletionen und Duplikationen in einem der beiden Dystrophin-Gene einer Duchenne-Überträgerin zuverlässig gefunden werden, selbst wenn die Deletion oder Duplikation des mit ihr verwandten Patienten nicht bekannt ist. Dies ist einer der wichtigsten Gründe für die weitverbreitete Anwendung dieser Methode.

Doch falsch-positive Ergebnisse können vorkommen, die eine Deletion eines einzigen Exons anzeigen, wenn sie tatsächlich nicht vorhanden ist. Dies kann geschehen, wenn in der Sequenz, an die die MLPA-Reagenzien binden, ein Polymorphismus aufgetreten ist. Ein Polymorphismus ist eine Änderung eines einzigen Basenpaares in der DNA, die aber keine Krankheit verursacht. Falls die MLPA-Methode die Deletion eines einzigen Exons anzeigt, muß dieses Ergebnis mit einer anderen Methode überprüft werden.

Wenn mit der MLPA-Methode keine Mutation gefunden wird, hat der Patient wahrscheinlich eine Punktmutation. Mit der *SCAIP*-Technik, englisch *single condition amplification/internal primer sequencing*, die in Dr. Flanigans Laboratorium entwickelt wurde, ist es möglich, alle Punktmutationen zuverlässig zu finden und im einzelnen zu charakterisieren, sowie auch alle vorzeitigen Stopp-Codons, kleine Deletionen und Einfügungen, und auch Mutationen in den Sequenzen der Spleißstellen. Mit dieser Zweistufen-Methode kann die vollständige Basensequenz aller Exons des Dystrophin-Gens bestimmt werden als auch aller Intron-Exon-Grenzregionen mit den Spleißsignalen und auch aller Promotoren. Alle diese getrennten Genregionen werden zuerst mit einer einzigen Polymerase-Kettenreaktion, englisch *PCR*, amplifiziert, und dann sequenziert mit einer der standardisierten automatischen Gen-Sequenzierungsmethoden, um Punkt- und andere Mutationen zu finden. .

Die Erfahrung mit diesen beiden Methoden, MLPA und SCAIP, hat gezeigt, daß 93-95% aller Mutationen in Blutproben entdeckt werden können. Die restlichen 5-7% können mit ihnen jedoch nicht gefunden werden. Wenn der Patient eindeutige Duchenne- oder Becker-Symptome hat, aber keine Mutation in seiner Blutprobe gefunden wird, dann wird eine Muskelbiopsie notwendig, so daß in den Muskelfasern bestimmt werden kann, ob das Dystrophin-Protein vorhanden ist oder nicht. Dies geschieht mit einer der beiden Protein-Nachweismethoden, *Western-Blot* oder *Immunfluoreszenz*. Der *Western-Blot* hat den Vorteil, daß sich damit die Menge und die Größe des Dystrophin-Proteins bestimmen läßt, doch die Immunfluoreszenz wird meistens angewendet, weil man damit das Dystrophin an den Rändern der Zellen als leuchtende Linien direkt sehen

kann oder bei Duchenne eben auch nicht. Aus dem Muskelgewebe einer Biopsie kann man auch die mRNA isolieren und darin die sehr seltenen Mutationen identifizieren, die den Einbau von Teilen eines Exons in die fertig gespleißte mRNA des Dystrophins verursachen.

Weil die genauen Daten der Dystrophin-Mutationen von Duchenne- und Becker-Patienten und ihre exakten klinischen Symptome nicht nur für die Patienten selbst wichtig sind, sondern mehr und mehr auch für die therapeutische Forschung und die klinischen Studien, werden in Dr. Flanigans Laboratorium diese Daten gesammelt für eine allgemeine diagnostische Datenbank in Zusammenarbeit mit den klinischen Zentren von sechs anderen Universitäten in den Vereinigten Staaten. Doch auch andere

klinische Zentren und einzelne Spezialisten für neuromuskuläre Erkrankungen in anderen Teilen der Vereinigten Staaten und selbst in anderen Ländern sind eingeladen, ihre Patientendaten an das Zentrum in Salt Lake City zu schicken. Mehr und mehr klinische Studien werden in Zukunft durchgeführt werden, die Teilnehmer mit bestimmten Mutationen und klinischen Symptomen brauchen. Ausgehend von den Informationen in dieser Datenbank kann das Zentrum in Utah dann die Beteiligung von bestimmten Patienten an diesen Studien vorschlagen. Informationen über die Aufnahme von Patientendaten in diese Bank, über Testmöglichkeiten und Preise stehen im Internet unter [www.genome.utah.edu/dmd](http://www.genome.utah.edu/dmd).

## Ein Interview mit Stephen D. Wilton

Professor Wilton ist Leiter der Abteilung für experimentelle Molekularmedizin im Zentrum für neuromuskuläre und neurologische Krankheiten der Universität von West-Australien in Nedlands bei Perth. Am 16 Juli 2006, nach der Konferenz in Cincinnati, beantwortete **Steve Wilton** meine Fragen, kursiv gedruckt, über Exon-Skipping, und den jetzigen Stand der Forschung nach einer Duchenne-Therapie. Der vollständige Name der potentiellen Exon-Skipping-Medikamente, *Antisense-Oligoribonukleotide*, ist im Interview meistens zu AON oder Oligo abgekürzt.

**Klinische Studien mit Exon-Skipping beginnen.** *Würden Sie bitte damit beginnen, den Familien mit Duchenne-Jungen zur erklären, was die sehr positiven Ergebnisse der Exon-Skipping-Forschung für sie bedeuten, die so verzweifelt auf eine Heilung dieser schlimmen Krankheit warten.*

Ich würde das Wort "Heilung" nicht benutzen, denn Exon-Skipping wird nie Duchenne heilen können. Das Beste, was wir erwarten können, ist, daß wir die Schwere der Krankheit reduzieren können, und in manchen Fällen können wir sie vielleicht sogar sehr stark reduzieren.

Ich würde lieber vorsichtig optimistisch sagen, daß wenn wir mit dem Exon-Skipping etwas ändern können, es eine bescheidene Änderung sein wird. Und wenn es besser funktioniert als wir denken, dann wird es großartig sein. Es ist sehr wichtig, mit den Erwartungen sehr zurückhaltend zu sein.

*Ich diskutiere Exon-Skipping ziemlich oft mit den Eltern. Ich erkläre ihnen, so gut ich es kann, füge aber immer hinzu, daß es nur in Tieren getestet wurde und daß im Augenblick niemand sagen kann, ob es auch in Jungen genauso gut gehen wird. Dann erkläre ich, daß bereits klinische Studien mit Duchenne-Jungen durchgeführt werden, die zeigen werden, ob Exon-Skipping in Kindern funktioniert oder nicht.*

Das ist der Grund, weshalb ich bei diesem Treffen gesagt habe, daß unser Labor jedes Exon des Dystrophingens außer Exon 1 und Exon 79 skippen kann. Alle Exons von 2 bis 78 können wir skippen. Viele Exons können leicht eliminiert werden, aber einige sind störrisch, doch wir werden Wege finden, um auch diese schwierigen Exons zu skippen.

Unsere klinischen Studien müssen wir langsam, gut überlegt und Schritt für Schritt durchführen und erst wenn ein Schritt getan ist, können wir den nächsten tun. Es werden keine großen Sicherheitsprobleme erwartet, wenn nur

ein einzelner kleiner Muskel behandelt und danach zur Analyse entfernt wird. Die Risiken werden größer, wenn Studien mit Ganzkörperbehandlung begonnen werden, da viel größere Mengen von AONs verabreicht werden müssen und es deswegen zu unerwarteten Nebenwirkungen kommen kann.

Aber man weiß nicht, wie lange das Dystrophin nach den zwei bis vier Wochen der ersten lokalen Behandlung erhalten bleibt. Bei der geplanten britischen Studie wird der ganze Muskel eine bis vier Wochen nach der Behandlung herausgenommen und zuerst mit molekularen Methoden getestet, ob Dystrophin vorhanden ist. Dies wird der grundlegende Beweis dafür sein, ob Exon-Skipping bei Menschen funktionieren wird.

Man sollte aber jetzt nicht verschiedene Dosierungen und verschiedene Zeiten ausprobieren, weil erst eine Ganzkörperbehandlung, eine systemische Behandlung, der Beweis sein wird, auf den es ankommt, um zu zeigen, daß Exon-Skipping tatsächlich in menschlichen Muskeln funktioniert. Und das wird sehr, sehr schwierig sein, weil wir noch nicht wissen, wieviel der AONs wir brauchen und wie oft sie gegeben werden müssen.

Beim Exon-Skipping haben wir verschiedene AONs für verschiedene Patienten mit verschiedenen Mutationen zu berücksichtigen. Jeder Patient wird anders reagieren. Es wird eine sehr, sehr schwierige Forschungsaufgabe sein. Doch ich bin vielleicht zu pessimistisch hier.

*Die holländischen Forscher in Leiden versuchen jetzt, die Exons 51 und 46 zu skippen und die britischen werden Exon 51 skippen. Danach werden sie diese Studien auf andere Exons ausdehnen. Werden sie jedesmal die langwierigen Genehmigungsverfahren durchmachen müssen?*

Es werden Genehmigungen nötig sein, weil technisch gesehen jedes neue Oligo ein neues Medikament ist. Doch wir hoffen, daß nach den ersten Versuchen mit den ausgewählten Oligos für die folgenden Oligos die Genehmigungsprozedur verkürzt werden kann, denn alle Oligos verhalten sich ähnlich und dürften keine Nebenwirkungen verursachen.

Wir, und ich meine das britische MDEX-Konsortium, arbeiten mit modifizierten Oligos, die eine andere chemischen Struktur haben und die wir *Morpholinos* nennen. Substanzen mit ähnlicher Struktur sind bereits systemisch Menschen injiziert worden, weil sie potentielle Antibiotika sind. Sie haben sich als sicher erwiesen, weil sie im Körper nicht abgebaut werden, sie scheinen absolut stabil zu sein.

Umfangreiche Studien sind schon mit ihnen gemacht worden, und sie würden deswegen keine solchen ausgedehnten klinischen Studien brauchen wie z.B. die anderen modifizierten AONs, die die holländischen Forscher verwenden, die als 2O-Methylthioat geschützt sind, die aber erst jetzt zum ersten Mal Menschen verabreicht werden.

Die Kettenstruktur der Morpholinos ist ganz anders als die der normalen Oligonukleotide, und weil sie so ausgefallen sind, können sie sich nicht irgendwo ins Genom einbauen. Was wir also tun, ist keine Gentherapie, sondern eine Veränderung der Gen-Expression, der Verarbeitung der genetischen Information.

Wenn einmal gezeigt ist, daß die ersten Morpholinos sichere Muskeldystrophie-Medikamente sind, dann hoffe ich, daß die Leute, die für die Genehmigungen zuständig sind, die früheren Sicherheitsprüfungen mit den Morpholinos berücksichtigen und daß sie dann ihre Vorschriften vereinfachen. Wenn wir für jedes Oligo umfangreiche Prüfungen durchführen müßten, können wir jetzt gleich aufhören, und das würde einfach vollkommen unhaltbar sein, denn dann könnten wir nicht viele der verschiedenen Mutationen korrigieren, die Duchenne-Muskeldystrophie auslösen.

Eines der wichtigsten Dinge, an die man denken sollte, ist, daß die Oligos nicht einfache und konventionelle Medikamente sind, sondern, daß wir eine individualisierte Behandlung anbieten werden, eine speziell angefertigte molekulare Therapie für einen Jungen mit Duchenne.

Die Firma **AVI Biopharma** in Portland, Oregon, entwickelt Morpholino-Oligos als Mittel gegen Viren, die potentiell bei Hunderttausenden von Menschen angewendet werden. Für so etwas, das für ganze Bevölkerungen bestimmt ist, muß man umfangreiche Sicherheitstests durchführen, um sicher zu sein, daß 0,1% der Leute nicht unvorhergesehene Nebenwirkungen bekommen. Im Gegensatz dazu würden unsere Duchenne-Oligos nur sehr ausgesuchten Jungen mit Duchenne-Dystrophie gespritzt werden. Falls es also zu einer unerwarteten Reaktion kommen sollte - und wir hoffen, das wird nicht passieren -, dann wird das nur einen oder zwei Jungen betreffen. Und da diese Patienten während der Behandlung streng überwacht werden, würde jede negative Reaktion schnell erkannt und die notwendigen Gegenmaßnahmen unternommen werden.

Es könnten natürlich Effekte auftreten, die von den verschiedenen Nukleotidsequenzen der Oligos abhängen. Auf dieses Risiko müssen wir gefaßt sein. Aber es würde sich dabei darum handeln, die Risiken gegen die Vorteile abzuwägen. Selbst wenn es bei der Verwendung dieser Morpholinos Nebenwirkungen geben sollte, der Vorteil einer Neusynthese von Dystrophin könnte die Risiken aufwiegen. Die Steroide haben zahlreiche Nebenwirkungen, sie werden aber akzeptiert, weil es keine bessere Behandlung gibt.

*Dominic Wells* zeigte bei unserem Treffen hier, daß, wenn er Morpholino-AONs direkt in die Muskeln von mdx-Mäusen injiziert, sehr gutes Exon-Skipping in der mRNA selbst 14 Wochen nach der Behandlung bekommt. Das heißt, diese Morpholinos verursachen Exon-Skipping mindestens 14 Wochen lang. Und das Protein ist stabiler als die RNA. So ist nach 14 Wochen noch eine Menge neues Dystrophin da, das auch möglicherweise noch nach 26 Wochen vorhanden sein wird, das sind 6 Monate! Ich habe nie erwartet, daß es so lange da sein wird. Es funktioniert besser als vorhergesehen. Und wenn es eine Gegen-

reaktion bei einem Jungen geben sollte, der mit Morpholinos behandelt wurde, dann gibt es sicher Wege, das zu kontrollieren. Dann wird der Junge vielleicht eine unangenehme Woche haben, doch er bräuchte erst nach 6 Monaten die nächste Behandlung. Wir müssen aber erst herausfinden, ob eine Behandlung zweimal im Jahr genügen würde. Vergleichen wir dies einmal mit der Chemotherapie und der Strahlenbehandlung bei Krebs. Da gibt es fürchterliche Nebeneffekte, die aber akzeptiert werden, weil es nichts anderes gibt.

**Es wird mit zwei Sorten von Antisense-Oligonukleotiden gearbeitet.** *Die holländischen Forscher arbeiten mit ihren Oligos, den 2O-Methylphosphothioaten, um zuerst Exon 51 zu skippen, aber Sie und die Briten werden für ihre Studien Morpholinos verwenden. Sie werden aber zusammenarbeiten, nicht wahr?*

Die Holländer versuchen, viele verschiedene Exons zu skippen, und die Engländer haben die beiden AON-Sorten verglichen und gefunden, daß die, die wir entwickelt haben, insbesondere die Morpholinos, sehr gut reagieren, so daß sie entschieden, sie für ihre klinische Studie zu verwenden, die noch in Planung ist. Auch die Engländer werden versuchen, zuerst Exon 51 zu skippen, um damit eine parallele Studie zur holländischen zu haben. Deshalb wird man die Effekte der beiden chemischen Strukturen, ihrer verschiedenen Sequenzen, und die Wirkung der beiden Behandlungsarten vergleichen können. Das könnte man nicht machen, wenn man versuchte, ein anderes Exon zu skippen. Wenn gezeigt wird, daß beide AON-Sorten sicher sind, werden die Arbeiten mit beiden fortgeführt. Wir hoffen, daß beide zu ähnlichen Ergebnissen führen werden.

Niemand weiß wirklich, was passieren wird, wenn eines der verschiedenen Oligos für längere Zeit angewendet wird. Es ist durchaus möglich, daß für eine Behandlung verschiedene Oligos kombiniert werden müssen. Die Idee ist eben, daß Konkurrenz ganz gesund ist, und daß wir nicht alles auf eine Karte setzen sollten. Wenn beide Systeme gut gehen, muß an beiden weitergearbeitet werden.

Und dann, wenn irgendetwas passieren sollte nach drei Jahren Behandlung mit Morpholino-Oligos, könnten wir auf die 2O-Methyls zurückgreifen. Aber wenn wir nichts als Morpholinos haben, kriegen wir ernste Schwierigkeiten. Außerdem gibt es neben den Morpholinos und den 2O-Methyls noch andere AON-Sorten, mit anderen chemischen Strukturen, mit denen wir auch arbeiten.

### **Wann gab es die ersten Exon-Skipping-Experimente?**

*Wer hatte eigentlich die erste Idee mit dem Exon-Skipping?*

Ich denke, es wurde an mehreren verschiedenen Stellen gleichzeitig entwickelt. Ich hatte über gerettete, sog. *revertierte*, Fasern mit Dystrophin gearbeitet, die spontan in Duchenne-Muskeln auftreten, und ich wollte herausfinden, nach welchem Mechanismus das ablief. Für mich war es klar, daß es irgendein Exon-Skipping-Mechanismus war. Das war ungefähr 1994, und wir fanden Gentranskripte, funktionierende mRNA für verkürztes Dystrophin. Und dann, auf einem Treffen in Lake Tahoe, hörte ich *Ryszard Kole* von der Universität von North Carolina über die Unterdrückung des normalen Spleißens im  $\beta$ -Globin-Gen als Therapie für Thalassämie sprechen. Soviel ich weiß, war er der Erste, der die Aktivität eines Gens durch modifiziertes Spleißen veränderte. Danach diskutierten *Ryszard*

und ich ziemlich lange miteinander, und dann gab es einen dieser berühmten Augenblicke, in dem einem eine Idee fast wörtlich wie ein Ziegelstein trifft! Es war doch so offensichtlich, daß das der richtige Weg war. Wenn man AONs verwenden konnte, um unnormales Spleißen zu unterdrücken, warum ließe sich nicht das gleiche gegen normales Spleißen tun? Ein paar Wochen nach meiner Rückkehr nach Perth erhielt ich einige Oligos von Ryszard. Wir hatten damals einige Kulturen mit Muskelfasern laufen, die nicht sehr gut waren, wir machten aber trotzdem einige Experimente und hatten Exon-Skipping im allerersten Experiment mit einem von Ryszards Oligos!

### **Wann wird es eine Exon-Skipping-Therapie geben?**

*Das Dystrophin-Gen wurde vor 20 Jahren gefunden und alle dachten, daß im nächsten Jahr eine Heilung da sein würde. Was kann man jetzt den Eltern sagen, die merken, daß die Zeit für ihre Jungen davonläuft? Vor zwei Jahren sagte mir Gertjan van Ommen von der Universität in Leiden, daß es etwa 10 Jahre dauern wird, bis Exon-Skipping für die Jungen fertig sein wird. Zwei Jahre davon sind vergangen, also acht sind noch übrig. Ich habe unsere Familien gefragt, ob sie das überhaupt wissen wollen, und ihre Antwort war: "Ja, wir wollten es wissen und wir verstehen, daß diese Schätzung nicht bedeutet, daß es genau im Januar 2014 für unseren Sohn etwas geben wird". Wie ist es heute, wie lange, denken Sie, wird es noch dauern?*

Ja, ich weiß, das ist eine schlimme Sache. Ich komme jetzt zum sechsten Mal zu den Parent-Project-Treffen. Leider treffe ich jedes Jahr immer wieder neue Leute, und jedes Jahr sind manche anderen nicht mehr da. Doch wir haben langsam und sorgfältig weiterzuarbeiten und dürfen immer nur einen Schritt nach dem anderen machen, um Fehler zu vermeiden, die die Wartezeit nur noch verlängern würden.

Aber ich bin optimistisch, daß, wenn die ersten klinischen Versuche sorgfältig und sicher durchgeführt werden, wir sehr schnell neue Versuche in Angriff nehmen können. Und die neuen Versuche werden neue Ziele haben, um andere Exons zu skippen, andere Mutationen zu reparieren. Deshalb werden wir nicht Jahre brauchen, um zu sehen was passiert ist und um die Ergebnisse zu analysieren. Wenn wir ein positives Ergebnis in einem Versuch bekommen, werden wir den nächsten immer so schnell wie möglich beginnen.

Und ein Weg, unsere Arbeit zu beschleunigen, wäre, daß wir statt ein einziges Exon zu skippen gleich zwei oder noch mehr gleichzeitig angehen, das heißt, ein Multi-Exon-Skipping machen. Warum sollte man nicht ein Oligo-Cocktail verwenden, um mehrere Exons auf einmal zu skippen? Wir haben das sogar in Zellkultur schon gemacht mit einer Mischung von Oligos zur gleichzeitigen Entfernung der Exons 50, 51, 52 und 53, und das ging ganz gut. Und mit einer anderen Mischung zielten wir auf die Exons 6, 7 und 8. Das sind die, die man beim dystrophischen Hund skippen müßte. Das könnten wir dann am Hund ausprobieren, bevor wir damit Kinder behandeln. Viele verschiedene Mutationen könnten mit einem dieser Cocktails therapiert werden. Und ein Vorteil dieser Cocktails wäre es auch, daß man die Sicherheitstest für drei oder mehr Oligos auf einmal durchführen könnte. Und wir könnten auch verschiedene Oligo-Typen kombinieren. Das würde die Forschungen deutlich beschleunigen.

So wie es heute aussieht, dürfte Gertjans Schätzung

ziemlich realistisch sein, vielleicht wird die Wartezeit auch kürzer sein, fünf bis sechs Jahre von jetzt an, bis wir die ersten Jungen mit guten Ergebnissen behandeln können.

*Wenn ich mit den Familien spreche, höre ich sie oft sagen: "Warum hat Duchenne uns getroffen? Was ist der Grund dafür?" "Der Grund sind die Mutationen, und sie geschehen zufällig, sie können nicht vorhergesagt werden", antworte ich. Die Mutationen sind nur die Werkzeuge der Evolution. Wenn es keine Mutationen gäbe, wären wir nicht hier, es gäbe kein richtiges Leben auf der Erde, vielleicht gerade mal Schleim. Aber die Evolution hat auch Wissenschaftler hervorgebracht - wie Sie! -, die versuchen, das in Ordnung zu bringen, das Gen zu reparieren und das Problem mit einer guten Therapie zu lösen*

Das ist interessant, es so zu sehen. Aber es ist wahr, ohne Evolution hätten wir uns nicht entwickelt. Für uns ist wichtig, daß jeder verschieden ist und wahrscheinlich auch etwas verschiedene Dystrophin-Gene hat. Bei manchen hat es einen Austausch einzelner Basenpaare in den Exons gegeben, die Aminosäuren geändert haben, die meistens nicht wichtig sind, manchmal aber doch. Jedes Dystrophin-Gen ist also ziemlich einmalig. Aber die genetische Variation betrifft auch andere Gene, auch solche, die die Aktivität von wieder anderen Genen kontrollieren und regulieren. Wir sind ein kompliziertes genetisches Paket, und das ist wahrscheinlich der Grund für die verschiedenen klinischen Symptome, die wir bei Duchenne-Patienten sehen.

### **Wer stellt die Oligos her? Wer fabriziert eigentlich die Oligos? Sie werden sicher automatisch gemacht.**

Die 2O-Methyl-Oligos, die wir brauchten, habe ich mit einer Maschine in unserem Laboratorium selbst gemacht. Ich drückte auf die Knöpfe und gab AON-Sequenzen ein, füllte die Reagenzien ein und nach, und habe viele schlaflose Nächte gehabt, wenn ich die Synthese überwachen mußte. Die Chemikalien waren sehr teuer, und ich hasse es, sie zu vergeuden, so ließ ich die Synthesemaschine rund um die Uhr laufen. Jetzt gibt es aber viele Firmen, die Oligos herstellen, aber ich wollte zuerst lieber den ganzen Prozeß kontrollieren können. Nachdem wir unsere 2O-Methyls in Zellkulturen optimiert hatten, kontaktierten wir AVI Biopharma in Oregon, die Firma, die jetzt unsere Morpholinos sogar in klinischer Reinheit für die Versuche an Menschen herstellt.

*Werden diese Oligos teuer sein, wenn alles einmal für unsere Kinder fertig ist?*

Sie werden teuer sein aber nicht so teuer wie die Herstellung der Viren für die Gensatz-Therapie. Exon-Skipping wird viele Male billiger sein. Die Kosten für die Herstellung der Oligos sind aber trotzdem hoch, und wir werden eine Menge Morpholinos mit verschiedenen Sequenzen brauchen. Aber wir können auch Oligos entwickeln, die in kleinen Mengen sehr wirksam sind, die man in geringer Dosis geben kann und die trotzdem therapeutisch wirken. Diese Medikamente müssen nicht so teuer sein.

### **Frühe präklinische Diagnosen werden wichtig sein.**

*Falls Exon-Skipping oder eine andere Technik funktioniert, sollte sie nicht früh eingesetzt werden, bevor die Muskeln verschwinden?*

Die frühe Diagnose wird wichtig werden. Wahrscheinlich kann man dann, wenn Exon-Skipping funktioniert und

sicher ist, nach einer frühen Diagnose mit der Behandlung beginnen, bevor Symptome überhaupt auftreten. Das würde einen großen Vorteil haben. Deswegen denke ich, daß ein Neugeborenencreening auf Muskeldystrophie überall zur Verfügung stehen sollte.

**Dann gibt es also eine Botschaft der Hoffnung?** *Zum Abschluß dieses Interviews geben Sie bitte den Eltern eine Botschaft der Hoffnung nach einer solchen wichtigen Konferenz wie diese hier in Cincinnati.*

Zuerst bekommen Sie eine Überraschung: Der Fortschritt mit den Morpholinos im letzten Jahr war erstaunlich. Wir hatten Ergebnisse, die unsere Erwartungen weit übertrafen. Wir sind optimistisch, daß sie weit, weit besser wirksam sein werden, als wir es voraussehen konnten. Zu Beginn unserer Arbeit sahen wir, daß die Morpholinos in Zellkulturen sehr schlecht funktionierten. Und als wir dann mit Mäusen in-vivo-Injektionen anfangen, wandten wir alle ausgefallenen Tricks an, um die Morpholinos in die Muskeln zu kriegen.

Das ging im Prinzip. Aber dann versuchten wir eine Art negative Kontrolle zu machen, indem wir die Morpholinos einfach in physiologischer Salzlösung, 0,9% Kochsalz, injizierten. Und das ging ganz toll, es funktionierte mit hoher Wirksamkeit! Und dann hängten die Leute von AVI Biopharma noch kleine Peptidgruppen, also Aminosäuren, an die Morpholinos, um die Wirksamkeit weiter zu erhöhen. Und das funktioniert unwahrscheinlich gut in Mäusen. Jetzt müssen wir das an Kindern ausprobieren. Die AVI-

Leute reagieren schnell entwickeln neue chemische Varianten, modifizieren einiges, und es ist einfach wunderbar, mit ihnen zu arbeiten.

Aber um abzuschließen, möchte ich sagen, daß dieses Parent-Project-Treffen sehr positiv war. Es gibt jetzt so viele verschiedene Forschungswege für Muskeldystrophie. Es laufen gute klinische Versuche zum Gen-Ersatz, zum Stoppcode-Durchlesen, es gibt zwei Studien mit Exon-Skipping, da ist die Arbeit mit Myostatin, so viele verschiedene Dinge passieren, und die Steroide werden im Detail untersucht. Da ist so viel Grund für eine Menge Hoffnung!

Aber es geht nie schnell genug. Ich wünschte, wir hätten eine Therapie schon gestern gehabt. Wenn wir bald etwas ändern können, dann wird es mit Exon-Skipping sein. Das wird den Kindern Zeit geben, bis etwas Besseres und länger Dauerndes kommt. Exon Skipping ist keine perfekte Behandlung. Aber es ist das Beste, was wir jetzt tun können, mit einer Menge von Oligos und ohne eine vollständig neue Technologie entwickeln zu müssen..

*Haben Sie sehr herzlichen Dank, sicher auch im Namen der Duchenne-Jungen, ihrer Eltern und Verwandten, ihrer Ärzte und aller, die sie betreuen, und vielleicht sogar einflußreicher Leute, die Dinge ändern können, so daß Sie und Ihre Kollegen die finanzielle Unterstützung bekommen und die Gelegenheit, unser aller Ziel bald zu erreichen, eine Therapie für Duchenne-Muskeldystrophie.*

### Abschließende Worte von Pat Furlong

Meine beiden Söhne Christopher und Patrick wurden vor 22 Jahren, 1984, diagnostiziert. Damals gab es keine Hoffnung und keine Hilfe. Das Dystrophin-Gen war unbekannt. Aber 1986 schien sich die Welt zu ändern. Das Dystrophin-Gen wurde identifiziert und mit großem Aufwand publiziert und eine Behandlung schien nahe zu sein. Ziemlich bald nach der Entdeckung des Gens wurde uns klar, daß der Weg dahin nicht so einfach war, wie wir zunächst glaubten. Wir mußten einiges lernen. Doch in den letzten fünf Jahren hat sich das Gebiet der Duchenne-Muskeldystrophie dramatisch geändert, und wir, die Eltern, die Familien, waren ganz aktiv für diese Änderung verantwortlich. Die Forschung ist jetzt voller Möglichkeiten, und in den

kommenden Jahren werden wir eine Reihe von vielversprechenden klinischen Studien sehen, die hoffentlich zur Entwicklung von Behandlungen führen werden. Duchenne-Dystrophie wird aus der Liste der tödlichen Krankheiten gestrichen werden, und ich denke, daß sie eine chronische Krankheit werden wird, die eine ausgewogene medizinische Betreuung brauchen wird. Wir werden damit fertig werden, und die kommenden Behandlungen werden die Muskelfunktionen schützen und erhalten. Der Fortschritt auf unserem Gebiet wird ein Vorbild werden für andere seltene Krankheiten, und unsere Söhne werden weiterleben, wachsen und ihre Träume erfüllen können.

Diesen Bericht habe ich in Cadaqués in Spanien im August und September 2006 zuerst auf Englisch geschrieben und dann ins Deutsche übersetzt. Es gibt auch eine spanische Übersetzung von Ricardo Rojas in Mexiko. Diese drei Versionen und alle meine früheren Berichte und Interviews stehen im Internet unter [www.duchenne-forschung.de](http://www.duchenne-forschung.de). Diejenigen, die meine zukünftigen Berichte sofort, nachdem sie fertig, sind per e-Mail erhalten möchten, schicken mir bitte ihre e-Mail-Adresse.

Dr. rer. nat. Günter Scheuerbrandt, Im Talgrund 2, D-79874 Breitnau. E-mail: [gscheuerbrandt@t-online.de](mailto:gscheuerbrandt@t-online.de)

## Exon Skipping, ein Beispiel

Hier werden die molekularen Einzelheiten für das Überspringen des Exons 46 erklärt, mit dem die Duchenne-Mutation der Exon-45-Deletion in eine Becker-Mutation geändert wird.

Dargestellt ist zunächst ein Teil der Basensequenz der Exons 45 und 46 und des Endes von Exon 44 und des Anfangs von Exon 47 der mRNA des Dystrophin-Gens. Beim Exon 45 wurden 50 Tripletts ausgelassen und 30 beim Exon 46. Unter jedem Triplet (Codon) steht die Abkürzung des Namens der Aminosäure entsprechend dem genetischen Code. Die Tripletts stehen in Wirklichkeit ohne Zwischenraum hintereinander, die Bindestriche zeigen hier nur das Leseraster an, die senkrechten Striche die Grenzen der Exons. An die unterstrichene, 19 Basen lange Sequenz im Exon 46 lagert sich in der pre-mRNA das Exon-überspringende „therapeutische“ Oligonukleotid an. Die drei Basen des versteckten Stoppsignals sind ebenfalls unterstrichen. Das Exon 45 endet nach der zweiten Base des letzten Tripletts, das durch die erste Base des Exons 46 zu AGG komplettiert wird (-AAG-AG | G-CUA-).

<b>Ende Exon 44</b>	<b>Anfang Exon 45</b>	<b>Ende Exon 45</b>	<b>Anfang Exon 46</b>
-UGG-UAU-CUU-AAG	GAA-CUC-CAG-GAU	---AGA-AAA-AAG-AG	G-CUA-GAA-GAA-
trp tyr leu lys	glu leu gln asp	arg lys lys arg	leu glu glu

versteckter Stoppcode

Antisense-Oligoribonukleotid

--AAU-GAA-UUU---	AAA-GAG-CAG-CAA-CUA-AAA-GAA-AAG-CUU-GAG-CAA-GUC-AAG	<b>GUC-GUU-GAU-UUU-UUU-UUC-G</b>	<b>Ende Exon 46</b>	
asn glu phe	lys glu gln gln leu lys glu lys leu glu gln val lys			

| **Anfang Exon 47**

| UUA-CUG-GUG-GAA-GAG-UUG---  
| leu leu val glu glu leu

Wenn nur das Exon 45 in der mRNA fehlt, wird das Leseraster im Exon 46 um ein Nukleotid nach links verschoben, am Anfang von Exon 46 wird dann

anstelle von	G-CUA-GAA-GAA-C	jetzt	GCU-AGA-AGA-ACA	gelesen,
	leu glu glu		ala arg arg thr	

mit der Konsequenz, daß 16 falsche Aminosäuren in das Dystrophin eingebaut werden, bis dann ein vorzeitiges Stoppsignal UGA erreicht wird, das vorher „versteckt“ war (-AAU-GAA-UUU- wird zu -AAA-UGA-AUU, das versteckte UGA ist oben unterstrichen). Die Proteinsynthese bricht am Stoppsignal vorzeitig ab, das Dystrophin wird nicht fertig, es entsteht *Duchenne-Muskeldystrophie*. Nach der Deletion von Exon 45 folgt also auf Exon 44 sofort Exon 46:

<b>Ende Exon 44</b>	<b>Anfang Exon 46</b>
-UGG-UAU-CUU-AAG	GCU-AGA-AGA-ACA---AGA-UUU-AAA-UGA-AUU-UGU-UUU-AUG-
trp tyr leu lys	ala arg arg thr arg phe lys <b>STOPP!</b>

Wenn zusätzlich zum fehlenden Exon 45 auch Exon 46 entfernt wird, ist das Leseraster nicht gestört, es gibt kein vorzeitiges Stoppsignal, es fehlen aber 108 Aminosäuren aus der Mitte des Dystrophins, das aber noch eingeschränkt funktionsfähig ist, dadurch wird die bösartige Duchenne-Muskeldystrophie in die gutartigere *Becker-Muskeldystrophie* verwandelt.

<b>Ende Exon 44</b>	<b>Anfang Exon 47</b>
---UAC-AAA-UGG-UAU-CUU-AAG	UUA-CUG-GUG-GAA-GAG-UUG---
tyr lys trp tyr leu lys	leu leu val glu glu leu