

#### 4. Internationale Konferenz in London, 21. und 22. Oktober 2006

### 20 Jahre nach der Entdeckung des Duchenne-Gens: Eine schlimme Krankheit verliert langsam ihren Schrecken.

**Standing on the Shoulders of Giants – Wir stehen auf den Schultern von Riesen** – dies war der Titel der 4. internationalen Konferenz des Parent Projekt UK Muscular Dystrophy (PPUK), die am 21. und 22. Oktober 2006 in London stattfand. Dreißig Wissenschaftler und klinische Experten für Muskelkrankheiten präsentierten ihre neuesten Forschungsergebnisse, diskutierten die laufenden und geplanten klinischen Studien, die neuesten Betreuungsmaßnahmen und die Registrierung. Ich, *Günter Scheuerbrandt*, ein deutscher Biochemiker, wurde von *Nick Catlin*, dem Präsidenten des PPUK gebeten, diesen Bericht für die kranken Jungen und ihre Familien zu schreiben, die jeden erfolgreichen Schritt auf dem Weg zu einer wirksamen Behandlung kennen möchten.

Da ich kein klinischer Spezialist bin, enthält der Bericht Zusammenfassungen nur der 15 wissenschaftlichen Vorträge, die in London gehalten wurden, sowie 2 von Wissenschaftlern, die nicht teilnehmen konnten und 5 von anderen Forschern, die auch nicht in London waren, deren Arbeiten aber ebenso wichtig für die Entwicklung von Duchenne-Therapien sind.

Alle Wissenschaftler, deren Forschungsarbeiten hier beschrieben sind, 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. Eine andere Konsequenz dieser gemeinsamen Arbeit ist, daß ich auch über die Ergebnisse berichten konnte, die zwischen der Konferenz und dem Schreiben dieses Berichtes im Januar 2007 bekannt wurden.

Nach der Jahrestagung des amerikanischen Parent Projects in Cincinnati/Ohio vom 13. bis 16. Juli 2006 habe ich einen ähnlichen Bericht geschrieben, der im Internet unter [www.duchenne-forschung.de](http://www.duchenne-forschung.de) gesehen und heruntergeladen werden kann. Die beiden Berichte gehören zusammen, aber beide sind keine wissenschaftliche Veröffentlichungen, deswegen haben sie keine Literaturhinweise und sind so geschrieben, daß alle sie verstehen werden.

Im allgemeinen 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 sie 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 gerne 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*.

Etwa 140 Jahre nach der Beschreibung durch *Guillaume Duchenne de Boulogne* und 20 Jahre nachdem *Louis Kunkel* ihr Gen isoliert hat, verliert diese schlimme Krankheit, Duchenne-Muskeldystrophie, langsam ihre Kraft, das wurde deutlich, nachdem wir die Vorträge über so viele neue Forschungsergebnisse auf den beiden Treffen gehört hatten. Duchenne Muskeldystrophie wird langsam Schritt für Schritt besiegt von engagierten Menschen, die für uns in vielen Ländern arbeiten. Die beiden Berichte werden zeigen, warum es so ist.

#### Einführende Worte von Nick Catlin: Wir stehen auf den Schultern von Riesen.

Im Jahre 1675 schrieb *Isaac Newton* an *Robert Hooke*, daß man, um in der Wissenschaft voranzukommen, auf den Schultern von Riesen stehen sollte. Natürlich war er ziemlich bescheiden und wahrscheinlich wollte er gegenüber Hooke nur betonen, daß dieser sich mehr Zeit nehmen sollte, um Leute wie Kopernikus, Kepler und Galileo zu studieren, als in den Londoner Kaffeehäusern herumzusitzen. Auf unserer Konferenz hier haben wir das Glück, einige der Wissenschaftler hören zu können, die wesentliche Entdeckungen gemacht haben, die zu neuen Gentherapien der Duchenne-Muskeldystrophie führen werden. Über 100 Jahre seit der ersten Beschreibung der Krankheit durch Duchenne, wußten wir wenig über die Ursache der Krankheit. Erst 1986 – dies ist jetzt 20 Jahre her – wurde die

Genstruktur von *Louis Kunkel*, *Anthony Monaco*, *Kay Davies*, *Eric Hoffman* und anderen aufgeklärt. Ohne ihre Arbeit hätten wir heute wenig Hoffnung, eine Heilung für Duchenne zu finden.

Nach der Entdeckung der Genstruktur waren wir alle sehr optimistisch. Aber in den letzten 20 Jahren haben wir wieder eine Generation von Jungen wegen dieser schrecklichen Muskelschwundkrankheit verloren. Ein tiefer Pessimismus war aufgekommen, als mein Sohn Saul im Jahr 2000 diagnostiziert wurde. Jedoch engagierte Gruppen von Forschern, Klinikern und Eltern haben weitergekämpft, um diese verheerende Krankheit zu besiegen, die zu vollständiger Lähmung und frühem Tod führt. Wir wissen jetzt auch, daß viele der betroffenen Jungen Lern- und Verhal-

tensstörungen haben.

Für mich und das PPUK war es der wichtigste Wendepunkt, als wir 2003 erreichten, daß das Gesundheitsministerium uns 1,7 Millionen Pfund für das Exon-Skipping des UK-MDEX-Konsortiums zur Verfügung stellte. Jetzt war unsere Regierung endlich aufgewacht und erkannte, was die Duchenne-Familien brauchen, nämlich genügend Geld für ein großes Gentherapie-Projekt. Das MDEX-Konsortium aus Klinikern und Wissenschaftlern hatte neue Wege zur Zusammenarbeit der Forscher aufgezeigt und wir haben jetzt große Hoffnung für eine Gentherapie der Duchenne-Dystrophie. Danach sind eine ganze Reihe anderer klinischer Studien begonnen worden, und es gibt jetzt Biotechnologie-Firmen wie VASTox in England, Prosensa in Holland, PTC und AVI in den USA, und Santhera in der Schweiz, die nicht nur Duchenne-Projekte in ihre Forschungsentwicklung aufgenommen haben, sondern sie auch mit Nachdruck verfolgen.

Dieser Trend zu neuen Forschungsprojekten und weiteren klinischen Studien scheint sich 2007 fortzusetzen. Die Zusammenarbeit MYOAMP wurde mit großer europäischer Finanzhilfe eingerichtet, um aussichtsreiche Thera-

pie-Projekte mit Muskelstammzellen voranzubringen. Das Projekt TREAT NMD hat jetzt ein Budget von 10 Millionen Euro, um ein Netz von Wissenschaftlern und Klinikern aufzubauen, mit dem die klinische Behandlung verbessert und klinische Prüfungen beschleunigt werden. PPUK hat mit ca. 300.000 Pfund und mit vielen englischen Familien sechs neue Projekte ins Leben gerufen zusammen mit unseren Partner-Parent-Projects in Frankreich und Monaco.

Aber wir dürfen uns jetzt nicht ausruhen und warten. Unsere Familien müssen verstehen, daß wir jetzt unsere Anstrengungen und Bemühungen um weitere Finanzmittel verstärken müssen, wenn wir die heutige Generation von Duchenne-Jungen retten wollen. Wir sollten diejenigen Wissenschaftler als Ansporn und Hoffnung sehen, die uns den heutigen Fortschritt gebracht haben. Wir müssen auch auf den Schultern von Riesen stehen wie *Pat Furlong* in den USA, die ihren Kampf für eine Heilung der Duchenne-Dystrophie nicht aufgab, obgleich sie zwei ihrer Söhne verloren hatte. Es war *Christopher Furlong*, der zu ihr sagte, bevor er starb „Wenn Du, Mutter, nicht für eine Heilung kämpfst, wird es niemand tun.“

## Vor 20 Jahren wurde das Dystrophin-Gen und sein Protein gefunden.

*Louis Kunkel* begann 1980 als „postdoctorate fellow“ seine Arbeit im Laboratorium von *Samuel A. Latt* an der Kinderklinik der Harvard-Universität in Boston mit dem Ziel, endlich die Ursache der Duchenne-Muskeldystrophie zu finden, 118 Jahre nachdem Dr. *Duchenne* in Paris diese häufigste Erbkrankheit des Kindesalters korrekt beschrieben hatte. Er bat die amerikanische „Muscular Dystrophy Association“ MDA, sein Projekt zu finanzieren, doch dort glaubte man ihm nicht, daß er das Duchenne-Gen wirklich finden könnte. Also sagte er, wie er es machen wollte: (1) zuerst das Gen kartieren, also herausfinden, wo es genau war auf dem X-Chromosom; (2) überprüfen, ob es und wie es mutiert, geschädigt, ist bei Duchenne-Patienten; (3) die kodierende Sequenz identifizieren, die vielen getrennten Reihen von genetischen Buchstaben, die Exons, welche die Information zur Herstellung eines Proteins enthalten; (4) diese Exons zusammensetzen, d.h., die sog. cDNA machen, die aus diesen aktiven Teilen des Gens besteht; (5) die Reihenfolge der Aminosäuren des Proteins mit Hilfe des genetischen Codes voraussagen; und schließlich (6), das Protein isolieren. Das überzeugte die MDA und Louis bekam das Geld.

Auf dem Treffen in London beschrieb *Louis Kunkel* die Schritte, die ihn zu seinem Ziel führten. Damals, vor einem viertel Jahrhundert, war es viel schwieriger und zeitaufwendiger als heute, ein Gen zu isolieren und das Protein vorauszusagen und zu finden. Hier sind, sehr abgekürzt, die Stufen auf dem Weg zum Gen:

Es war bekannt, daß das Duchenne-Gen auf dem X-Chromosom liegen mußte, denn – mit sehr seltenen Ausnahmen – bekommen nur Jungen die Krankheit und ihre Mütter sind oft die genetischen Überträgerinnen. *Kay Davies* und *Bob Williamson* trennten das ganze X-Chromosom von den anderen mit neuen Techniken ab. „Marker“ wurden gefunden, das sind kurze genetische Sequenzen oder Kennzeichen, die es erlauben, die Position eines bestimmten Gens unter den vielen anderen Genen auf einem Chromosom zu finden. In diesem Stadium sah man be-

reits, daß es nur ein einziges Gen für Duchenne- und Becker-Muskeldystrophie gab. Und mit *Gertjan van Ommen* wurden Methoden für frühe und vorgeburtliche Diagnosen ausgearbeitet, die schon damals die genetische Beratung wesentlich zuverlässiger machten.

Dann halfen einige ungewöhnliche Patienten, dem Gen näherzukommen. Da gab es eine Frau mit Duchenne-Symptomen. *Ronald Worton* fand heraus, daß ein kurzes Stück des kurzen Arms eines ihrer X-Chromosomen zu einem verkürzten Chromosom 21 gewandert war, während dessen fehlendes Stück jetzt mit dem X-Chromosom verbunden war. Es hatte also eine Translokation, ein Austausch von Chromosomenmaterial in allen ihren Zellen stattgefunden. Die Wissenschaftler konnten diese veränderten Chromosomen unter dem Mikroskop sehen und die Bruchstelle genau lokalisieren. Und weil diese Patientin Duchenne-Symptome hatte, mußte die Bruchstelle innerhalb des Duchenne-Gens liegen, wodurch es unterbrochen und inaktiviert worden war.

Dann trat ein Kind auf, das Duchenne-Symptome hatte aber auch noch drei andere Krankheiten, die in der gleichen Art, also X-chromosomal-rezessiv vererbt wurden. Mit *Uta Francke* konnte gezeigt werden, daß alle drei Gene fehlten, es gab eine große Deletion im X-Chromosom, die man sehen konnte. Es fanden sich noch weitere Patienten mit kleineren Deletionen in der Nähe der Stelle, an der das Duchenne-Gen vermutet wurde. Dann wurden mehrere Stücke aus normale Chromosomen isoliert, die zu den Regionen gehörten, die in den Chromosomen dieser Patienten fehlten. Unter ihnen war eines, PERT87 genannt, mit dem tatsächlich Deletionen in 5% aller Duchenne-Jungen gefunden werden konnten. Viele andere Forscher begannen, mit dieser kurzen chromosomalen Sequenz zu arbeiten, die sich durch ihre sehr spezifische Basenpaarung an die komplementäre Sequenz innerhalb des Duchenne-Gens anlagerte und nirgendwo sonst. Aber das geschah nur, wenn diese Zielsequenz auch wirklich da war. Wenn sie fehlte, also deletiert war, konnte PERT87 sie nicht finden und so

konnten die Wissenschaftler Patienten mit und ohne einer Deletion an dieser Stelle unterscheiden.

*Louis Kunkel* mit seinem immer größer werdenden Team sammelte alle Daten von seinen Kollegen und konnte dann schließlich die genetischen Einzelheiten von 1.346 Duchenne- und Becker-Patienten analysieren, dies ist immer noch die größte Studie dieser Art. Weil 8,7% der Patienten eine Deletion an der PERT87-Stelle hatte, mußte das Duchenne-Gen dort liegen. Weil dieses Gen nicht nur für Menschen so wichtig ist, sondern auch für andere Tiere mit Muskeln, wurden ähnliche Experimente mit PERT87 auch an Muskeln von Mäusen, Hühnern und Affen durchgeführt, und es zeigte sich, daß das Gen während der Evolution erhalten geblieben ist. Schließlich wurden Klone, d.h., Kopien, von den Gen-Regionen um die PERT87-Stelle herum angefertigt bis alle kodierenden Sequenzen, alle 79 Exons des Gens, identifiziert waren.

Sechs Jahre nachdem Dr. Kunkel seine Arbeit begonnen hatte, im Jahr 1986, hatten er und seine Mitarbeiter es geschafft, sie hatten das Gen mit, wie man jetzt weiß, genau 2.220.223 Nukleotiden oder genetischen Buchstaben. Es ist das bei weitem größte der ungefähr 22.000 menschlichen Gene und stellt 0,1% des ganzen Genoms dar. Und man weiß immer noch nicht, warum solch ein großes Gen gebraucht wird.

Ausgehend von der Sequenz der cDNA und mit Hilfe des genetischen Codes konnten *Michel Koenig* und andere in Kunkels Laboratorium die Struktur des Proteins voraussagen, dessen Produktion von diesem Gen bestimmt wird. Es mußte eine stabförmige Kette aus 3.685 Aminosäuren sein. Aber wo war das Protein lokalisiert? Zusammen mit *Eric Hoffman* und *Kevin Campbell* wurden zwei große codierende Sequenzen aus mehreren Exons der cDNA isoliert und dann in Coli-Bakterien transferiert, die dann größere Mengen von zwei Proteinen produzierten, exprimierten, die tatsächlich kurze Teile des Duchenne-Proteins waren. Diese kurzen Proteine wurden in Kaninchen injiziert, die sie wie Impfstoffe behandelten und Antikörper gegen sie produzierten. *Ronald Worton*, damals schon in Kanada, und *Hideo Sugita* in Japan befestigten fluoreszierende Erkennungsgruppen an diese Antikörper. Kunkels Mitarbeiter taten das auch, und alle konnten dann zeigen, daß das Protein sich an der Unterseite der Muskelzellmembranen befindet. Man konnte es dort sehen, weil es bläuliches Fluoreszenzlicht an den Rändern der senkrecht durchgeschnittenen Muskelfasern erzeugte, eine Technik, die auch heute noch angewendet wird, um nachzuweisen, ob dieses

Duchenne-Protein vorhanden ist oder nicht.

Also ein Jahr nachdem das Gen gefunden war, kannte man auch sein Protein, das die Forscher jetzt *Dystrophin* nannten. Und das Gen war nicht mehr das unbekannte Duchenne-Gen, sondern das nun gutbekannte Dystrophin-Gen.

Diese Entdeckungen führten zur Entwicklung der molekulargenetischen Methoden. *Jeffrey Chamberlain* und seine Gruppe verwendeten die neue Polymerase-Kettenreaktion, PCR, für den Nachweis von Deletionen im Dystrophin-Gen und fanden, daß etwa 65% aller Duchenne-Patienten solche Deletionen haben. *Kevin Flanigan* und wieder Kunkels Gruppe begannen dann mit sehr schnellen Sequenzierungsmethoden zu arbeiten, um Punktmutationen und noch seltenere Mutationen im Gen zu finden.

Während Duchenne-Patienten kein oder sehr wenig Dystrophin in ihren Muskeln haben, konnte *Eric Hoffman*, zeigen, daß bei Becker-Patienten das Dystrophin nur verändert ist. Und *Anthony Monaco* versuchte dann 1988 dies mit der Leseraster-Hypothese zu erklären, die, mit einigen Ausnahmen, jetzt die Grundlage der Exon-Skipping-Technologie ist. Tatsächlich wurde unter den Forschern diese vielversprechende Methode zur Wiederherstellung des Leserasters schon damals als möglicher therapeutischen Ansatz diskutiert, aber niemand wußte, so früh, wie man Exons aus der mRNA entfernen könnte.

Eine andere wichtige Konsequenz von Louis Kunkels und seiner Kollegen Arbeit ist die Entdeckung der Gene für die vielen Gliedergürtel-Muskeldystrophien, englisch LGMDs, weil sie beim Herausholen des Dystrophins aus den Muskeln mit Antikörpern eine ziemlich große Zahl von anderen Proteinen ebenfalls isolieren konnten. Wie *Kevin Campbell* in Iowa City und *Eijiro Ozawa* in Tokio zeigten, gehörten sie zu dem Dystrophin-assoziierten Proteinkomplex DAPC, der das Dystrophin mit der Außenseite der Muskelzellmembran verband. Es ist jetzt bekannt, daß Mutationen in den Genen dieser Proteine die verschiedenen Formen der LGMD verursachen können.

Jetzt, 26 Jahre nachdem er begann, das Gen zu suchen, arbeitet *Louis Kunkel* immer noch über Muskeldystrophie im selben Kinderkrankenhaus in Boston und konzentriert sich auf Zelltransfer-Techniken mit Myoblasten und anderen Muskel-Stammzellen, die therapeutische Methoden zusammen mit anderen Techniken werden können. Er beendete seinen Vortrag mit der Satz: „Wir sind jetzt soweit, daß wir sagen können, es ist nicht mehr hoffnungslos für ein Kind, das jetzt mit Duchenne geboren wird.“

## Warum brauchen wir klinische Studien?

In ihrem ersten Vortrag erklärte *Kate Bushby* von der Universität von Newcastle upon Tyne, daß klinische Studien unbedingt notwendig sind für die Entwicklung eines wirksamen Medikaments und daß diese Studien sehr viel Zeit brauchen. Doch Duchenne-Jungen haben nicht viele Jahre bis solche Studien durchgeführt sind und ein Medikament endlich entwickelt ist. Deswegen müssen sie und ihre Eltern verstehen, daß die Wissenschaftler an einer wirksamen Therapie arbeiten und ihre Lage durchaus kennen, aber daß sie mit den Genehmigungsbehörden zusammenarbeiten müssen, um wirksame Behandlungen so schnell wie möglich zu prüfen. Wenn die Wissenschaftler eine Idee haben, eine Hypothese, wie eine Therapie funktionie-

ren könnte, dann müssen sie sich im Interesse der Familien und ihrer kranken Kinder Schritt für Schritt voranarbeiten, selbst bevor klinische Studien begonnen werden können, damit sie sicher sein können, daß jeder Schritt zuverlässige Antworten gibt, die Grundlagen für weitere Schritte geben, zuerst mit kleinen Versuchstieren, z.B. mit der mdx-Maus, dann mit größeren Tieren, dem dystrophischen Hund oder mit Affen, bis schließlich die neue Technik, die durch diese Schritte gegangen ist, an lebenden Patienten, den Duchenne-Jungen getestet werden kann. Es können keine Fehler geduldet werden, die manchmal durch gefährliche Abkürzungen entstehen, weil sie den Forschungsprozeß um Jahre verzögern können.

Duchenne-Muskeldystrophie ist eine komplizierte Krankheit, und wirksame Behandlungen müssen auf längere Sicht wahrscheinlich auf das genetische System einwirken, das das Dystrophin in gesunden, aber nicht in kranken Muskeln produziert. Für eine solche genetische Behandlung wird man wahrscheinlich ein vollständig neuartiges Medikament brauchen, das die vielen Kilogramm Muskeln eines Jungen, selbst die inneren der Lungen und des Herzens, über sehr lange Zeit positiv verändern kann. Deshalb sind die Anforderungen an die Sicherheit und die Wirksamkeit eines Duchenne-Medikamentes äußerst streng.

Um zu verstehen, was klinische Studien eigentlich sind, zählte Kate Bushby vier Regeln auf:

*Regel 1:* Mit klinischen Studien will man eine Hypothese testen, eine Idee, die Sinn macht. Sie sind da, um eine Antwort auf eine Frage zu geben, eine Antwort, die gebraucht wird – z.B. „wird dieses Medikament Duchenne Dystrophie heilen?“ – und sie geben nicht notwendigerweise die erwartete Antwort. Solch eine Hypothese muß sich auf gute und zuverlässige Daten stützen können.

*Regel 2:* Die Teilnahme an einer Studie darf nicht der Ersatz für die beste Betreuung sein, die es bereits gibt. Man muß nicht alles fallenlassen, was man weiß, schließlich kann eine Studie auch nicht funktionieren.

*Regel 3:* Die Einzelheiten einer Studie werden von der Art der Hypothese bestimmt, die man beweisen will. Sie kann eine Pilotstudie sein, eine offene, eine blinde oder eine doppelt-blinde Placebo-kontrollierte Studie. Die Zahl der teilnehmenden Patienten hängt ab von der Zuverlässigkeit der Daten, die nötig sind, um die Frage zu beantworten. Mehr Patienten machen die Ergebnisse genauer und zuverlässiger. Normalerweise müssen die Studien drei Phasen durchlaufen, und es ist wichtig zu wissen, daß in den klinischen Phasen I und II die Teilnehmer an einer Studie keine Verbesserungen haben werden, weil diese Phasen so angelegt sind, daß sie nur Fragen nach der Sicherheit und einer begrenzten Wirksamkeit beantworten können: (1) In Phase I testet man auf Toxizität, Giftigkeit, (2) in Phase II auf Sicherheit, Wirksamkeit und notwendige Dosis, und (3), in Phase III will man den klinisch erwünschten positiven Effekt bestätigen und die optimale Dosis bestimmen. Studien mit Kindern, die eine voranschreitende Krankheit wie Duchenne haben, sind besonders anspruchsvoll. Sie müssen sehr sorgfältig geplant werden, weil kleine Kinder mit Duchenne noch wachsen und es ihnen auch ohne Medikament besser gehen kann.

*Regel 4:* Die Überwachung durch die verschiedenen Behörden und ihre Vorschriften sind dazu da, um die Patienten vor Schaden zu schützen und ihre Ärzte vor rechtlichen Konsequenzen einer möglichen gefährlichen Behandlung. Bei den ethischen Überlegungen geht es um mehr als nur um Fragen des Einverständnisses von Eltern und den Patienten selbst, sondern auch um sicherzustellen, daß die Studie überhaupt geeignet ist, die Antwort auf die Frage zu geben. Die Vorschriften sollen auch gewährleisten, daß die

Daten widerspruchsfrei und genügend genau sind. Und außerdem sollen sie für die folgenden Genehmigungen ausreichend sein. Die Studien müssen korrekt durchgeführt werden, deswegen gibt es den großen Verwaltungsaufwand, die Verzögerungen und ihre ziemlich hohen Kosten.

Die klinischen Studien für eine Duchenne-Therapie bringen eine Reihe spezieller Probleme mit sich: (1) Diese Krankheit ist selten, deswegen ist die pharmazeutische Industrie nicht immer daran interessiert, doch ihre Hilfe ist wichtig für die Entwicklung eines Medikamentes. Sie brauchen aber Gewinnaussichten, um genügend Kapital zu bekommen, deswegen sind die Steuererleichterungen für seltene Krankheiten, „orphan diseases“, wichtig. (2) Weil Duchenne-Dystrophie ziemlich selten ist, gibt es auch relativ wenige Patienten mit bestimmten Mutationen in ihrem Dystrophin-Gen. Man kennt sie auch nicht alle, weil viele Patienten immer noch keine molekularen Diagnosen haben. Deshalb sollten die Eltern darauf bestehen, daß die genaue Mutation im Dystrophin-Gen ihres kranken Sohnes sobald als möglich bestimmt wird. (3) Die Einrichtung von Registern mit den vollen diagnostischen Daten möglichst vieler Patienten wird einen unschätzbaren Vorteil für die Vorbereitung zukünftiger Studien bringen, und die Familien sollten gebeten werden, sich über solche Register zu informieren und ihr Kind dort aufnehmen zu lassen. (4) Ein Bewußtsein über den Wert klinischer Studien sollte in der internationalen Duchenne-Gemeinschaft von Familien, Ärzten und Wissenschaftlern in möglichst vielen Ländern entwickelt werden. Es gibt bereits ein neues Projekt internationaler Zusammenarbeit – „TREAT NMD“, behandle neuromuskuläre Erkrankungen! [www.treat-nmd.eu](http://www.treat-nmd.eu) – das Kate Bushby und ihr Kollege Volker Straub leitet und das hoffentlich die klinische Prüfung von aussichtsreichen potentiellen Medikamenten beschleunigen wird.

Es gibt mehr negative als positive klinische Studien, deshalb sollte kein Patient die schon möglichen medizinischen Betreuungsmaßnahmen vernachlässigen oder etwa beenden. Aus dem gleichen Grund macht es keinen Sinn, lange Reisen zu unternehmen, um an Studien teilzunehmen, von denen man nicht weiß, ob sie überhaupt ein positives Ergebnis bringen werden. Das Einverständnis für eine Teilnahme darf nur freiwillig gegeben werden und nur nach einer vollständigen Erklärung aller positiven und negativen Einzelheiten. Eine Besprechung mit Wissenschaftlern und Ärzten sollte immermöglich sein, und die Eltern müssen ihren kranken Sohn jederzeit aus der Studie herausnehmen dürfen, ohne ihre Entscheidung zu begründen.

Kate Bushby sagte zum Schluß: Nur korrekt vorbereitete und durchgeführte klinische Studien werden eine wirksame Therapie innerhalb einer angemessenen Zeit bringen. Fehler müssen unter allen Umständen vermieden werden: sie würden die gesamten Forschungsbemühungen zunichte machen und die Zeit verlängern, die die kranken Kinder noch auf eine entscheidende und positive Änderung ihres zukünftigen Lebens warten müssen.

## Exon-Skipping.

**Wie Exon-Skipping funktioniert:** Exon-Skipping ist eine der potentiellen therapeutischen Techniken, die schon klinisch an Duchenne-Patienten getestet wird. In seinem einführnden Vortrag beschrieb *Steve Wilton* von der Universität von West Australien in Perth die Einzelheiten dieser

Technik. Die Leser dieses Berichtes, die nicht genügend Bescheid wissen über die Biochemie, wie die Gene Proteine machen, über die Struktur und die Funktion des Dystrophin-Gens und seines Proteins Dystrophin, und wie Mutationen Duchenne-Dystrophie verursachen, sollten zuerst

die einführenden Abschnitte meines Berichtes über das Parent-Project-Treffen in Cincinnati/Ohio im Juli 2006 lesen. Dieser Bericht steht auf Englisch, Deutsch und Spanisch im Internet unter [www.duchenne-forschung.de](http://www.duchenne-forschung.de).

Die Exon-Skipping-Technik versucht, eine Duchenne-Mutation in eine Becker-Mutation zu ändern, so daß die schweren Duchenne-Symptome deutlich abgeschwächt werden. Wenn eine Mutation das Leseraster verschiebt und dadurch Duchenne-Dystrophie verursacht, kann das Leseraster wiederhergestellt werden, wenn man aus der mRNA ein oder mehrere Exons künstlich entfernt, und zwar direkt vor oder hinter einer Deletion oder einer Duplikation. Bei einer Punktmutation kann man entweder das Exon mit der Mutation allein entfernen und so den Defekt überspringen, oder es ist nötig, außerdem noch ein oder mehrere benachbarte Exons herauszunehmen, um das Leseraster wiederherzustellen.

Exons können aus der mRNA mit *Antisense-Oligoribonukleotiden*, AONs, entfernt werden. Sie sind kurze RNA-ähnliche Einzelstrang-Verbindungen aus 20 bis 30 Nukleotiden, deren Sequenz so konstruiert ist, daß sie sich durch Watson-Crick-Basenpaarung nur an die komplementäre Sequenz innerhalb des Exons anlagern, das entfernt werden muß, oder an eine seiner Grenzregionen. „Antisense“ bedeutet, daß ihre Basensequenz komplementär ist zur Zielsequenz in der pre-mRNA. Diese AONs beeinflussen den Spleißmechanismus derart, daß ein oder mehrere gewünschte Exons nicht mehr in der mRNA enthalten sind, sie sind *geskippt*.

Spleißen von Exons auf dem Weg von der pre-mRNA zur mRNA ist ein sehr komplizierter aber präziser Prozeß, der von einem Komplex aus vielen Proteinen gesteuert wird, der die Grenzregionen zwischen den Exons und Introns erkennt. Die AONs müssen eine genügend lange Nukleotid-Sequenz haben, damit sie das Spleißen nur derjenigen Exons unterbinden, deren Skipping nötig ist, um das Leseraster der defekten Dystrophin-mRNA zu reparieren. Man kennt inzwischen 231.677 Exons in den etwa 23.000 menschlichen Genen. Der Exon-Skipping-Prozeß hat deswegen äußerst spezifisch und präzise zu sein. Wenn die AONs Exons in anderen Genen skippen würden, könnten sie unter Umständen gefährliche Nebenwirkungen auslösen.

*Exon-Skipping ändert nicht das Gen selbst mit seiner Mutation*, sondern die Weiterverarbeitung seiner Information. Seine mRNA enthält nicht mehr die Sequenz der oder des geskippten Exons und auch weiterhin nicht die Sequenz der Exons, deren Deletion im Gen die Mutation verursacht hatte. Die Exon-Skipping-Therapie bestimmt, wie die Information des defekten Gens gelesen und weiterverarbeitet wird. Da die geskippte mRNA kürzer als normal ist, ist das Dystrophin-Protein auch kürzer, es enthält weniger Aminosäuren. Wenn die fehlenden Aminosäuren Teil der nicht wichtigen Strukturen sind, wie der zentralen Stabdomeänen, kann auch das kürzere Protein die Muskelzellmembranen noch einigermaßen stabilisieren. Das Ergebnis ist dann die Änderung der schweren Duchenne-Symptome in die viel milderen der Becker-Muskeldystrophie.

*Oligoribonukleotide* sind kurze Stücke der RNA – „oligo“ bedeutet „wenig“. *Nukleotide* sind die Bausteine der Nucleinsäuren. Sie bestehen aus drei molekularen Einheiten: dem Zucker Ribose, einer der vier Basen aus einem oder zwei Ringen, sowie einer Phosphatgruppe. Deshalb

gibt es vier verschiedene *Ribonukleotide*. Die beiden Arten der AONs, die hauptsächlich für das Exon-Skipping verwendet werden, sind chemisch geschützte Oligoribonukleotide, so daß sie nicht oder nur langsam in den Muskelzellen von Nucleasen zerstört werden, von Enzymen, die Nucleinsäuren abbauen.

Die Wissenschaftler in Holland verwenden *2'O-Methylphosphothioate*, auch *Methylthioate* oder *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 in ihren klinischen Studien arbeiten werden, haben anstelle eines der Phosphat-Sauerstoffatome eine Dimethylamid-Gruppe – ein Stickstoffatom mit zwei Methylgruppen –, und alle Ribose-Einheiten sind durch Morpholino-Ringe ersetzt, die aus vier Kohlenstoffatomen, einem Stickstoff- und einem Sauerstoffatom bestehen mit mehreren Wasserstoffatomen an den Kohlenstoffatomen.

In Dr. Wiltons Laboratorium wurden Morpholino-AONs entwickelt, getestet und optimiert, so daß jetzt alle Dystrophin-Exons geskippt werden können, immer eines alleine oder mehrere zugleich in Zellkulturen mit normalen und dystrophischen Muskeln von Mäusen, Hunden und Menschen. Einige Exons lassen sich leichter skippen als andere. Exons, die sich schwierig aus der mRNA entfernen lassen, benötigen höhere Konzentrationen der AONs, aber es wird weiter daran gearbeitet, auch ihre Strukturen zu optimieren. Die Morpholino-AONs sind wahrscheinlich ziemlich sicher in Menschen, weil sie schon an Erwachsenen, nicht aber an Kindern, getestet wurden als Antibiotica zur Abwehr von Viren.

Exon-Skipping wird *keine Heilung für Duchenne-Muskeldystrophie* sein, es wird aber seine Symptome mindern, so daß eine Becker-Dystrophie entsteht mit einer besseren Lebenserwartung. Es wird wahrscheinlich bis zu 80% aller Duchenne-Patienten helfen können. Die ersten klinischen Studien – wie unten beschrieben, verwendet die eine 2O-Methyls und die andere Morpholinos – werden versuchen, Exon 51 lokal in einem einzigen Muskel zu skippen, d.h. sie werden ein *proof of principle* liefern, den Nachweis, daß die Technik so funktioniert wie erwartet. Systemische Studien mit einer Injektion der AONs in den Blutkreislauf werden darauf relativ schnell folgen. Die Forscher werden auch in Zukunft mit beiden AON-Typen arbeiten und sie klinisch testen, denn es könnte sein, daß negative Ergebnisse in klinischen Studien mit einem AON-Typ zur Entscheidung führen, diesen Typ nicht mehr in Langzeitstudien zu verwenden. Es ist auch vorstellbar, daß später einmal eine Kombination beider AON-Typen verwendet werden könnten.

Viele Einzelheiten des Exon-Skippings wurden in einem Interview mit *Steve Wilton* diskutiert, das Teil des Berichtes über das Treffen in Cincinnati ist. Der Cincinnati-Bericht enthält auf seiner letzten Seite auch ein detailliertes Beispiel des Skippens von Exon 46 zur Korrektur des Leserasters nach der Deletion von Exon 46.

**Exon-Skipping im Herzen:** Zu Beginn seines Vortrags faßte *Dominic Wells* vom Imperial College London seine Exon-Skipping-Experimente mit mdx-Mäusen zusammen. Er verwendete ein *Morpholino-Antisense-Oligoribo-*

nukleotid, AON, das aus 25 Ribonukleotid-Einheiten bestand, deren Sequenz gegen die letzten 7 Basen des Exons 23 und die ersten 18 Basen des folgenden Introns 23 der Maus-Dystrophin-mRNA gerichtet war. Dieses AON lagert sich an die Grenzregion von Exon 23/Intron 23 an. Dadurch wird der Spleiß-Mechanismus daran gehindert, das Exon 23, wie üblich, zwischen die Exons 22 und 24 der mRNA einzubauen. *Er skippt Exon 23*. Und das ist beabsichtigt, denn in der mdx-Maus trägt dieses Exon eine Punktmutation an der Position 3.185, die das Codon CAA für die Aminosäure Glutamin in das vorzeitige Stoppcodon TAA verwandelt hat. Die Produktion des Dystrophins hört an diesem Stoppzeichen auf, und das Tier hat kein oder sehr wenig Dystrophin in seinen Muskeln.

Die Elimination des ganzen Exons 23 entfernt dieses Stoppsignal, und weil beide Grenzen des Exons 23 zwischen zwei ganzen Aminosäure-Codons liegen, verschiebt das Skippen dieses Exons das Leseraster nicht. Die Ribosomen, die Proteinfabriken, machen dann ein kürzer als normales Dystrophin, 72 Aminosäuren fehlen, d.h., das neue Dystrophin ist ungefähr 2% kürzer als normal. Nach nur einer lokalen Injektion des spezifischen AONs in einen einzigen Skelettmuskel erholte sich die Funktion des Muskels deutlich, und Dystrophin wurde mindestens 10 Wochen lang exprimiert, produziert. In einer zuvor publizierten Arbeit hatte *Terry Partridge's* Gruppe gezeigt, daß nach 7 intravenösen Injektionen in einwöchigem Abstand von 100 mg AON/kg Körpergewicht in 6 Wochen alte mdx-Mäuse, eine ähnliche Normalisierung der Struktur und Funktion in vielen Skelettmuskeln erhalten wurde. *Es war jedoch nicht möglich, die Morpholino-AONs auch in die Herzmuskeln der Mäuse zu bekommen*. Dies war ein schwerer Nachteil der Morpholinos verglichen mit den 2O-Methyl-AONs, die bei hohen Dosen auch in das Herz der Tiere wandern und dort Exon-Skippping verursachen.

*Julia Alter* in Dominic Wells Laboratorium konnte diese Situation ändern, indem sie Ultraschall mit einem üblichen diagnostischen Ultraschallgerät direkt auf das Herz der Mäuse richtete. Der Ultraschall erzeugt vorübergehend Poren in den Zellmembranen der Herzmuskeln. Dies erlaubt es den Morpholino-AONs, in das Innere der Zellen zu wandern. Nach dem Ende der Ultraschallbehandlung schließen sich die Poren in den Membranen wieder. Und dieser Effekt wird deutlich verstärkt, wenn man gleichzeitig das Kontrastmittel Optison anwendet, das aus gasgefüllten Albuminblasen von etwa zwei Mikrometer Durchmesser besteht.

Diese sehr einfach anzuwendende Technik erhöhte dramatisch die Zahl der Dystrophin-positiven Fasern im Herzen, und sie behinderte nicht die AON-Behandlung der Skelettmuskeln, es konnte sogar gezeigt werden, daß sie den Exon-Skippping-Effekt im Gastrocnemius, dem Wadenmuskel, verstärkte ohne Nebenwirkungen mit sich zu bringen.

Diese einfache Technik verwendet ein bewährtes und oft benutztes diagnostisches Verfahren, das man auch in systemischen klinischen Studien berücksichtigen sollte und auch bei der Verwendung der 2O-Methyl-AONs, deren Aufnahme in alle Muskeltypen wahrscheinlich ebenfalls verstärkt würde.

**Exon-Skippping: Vorbereitung einer klinischen Studie in Großbritannien:** Das MDEX-Konsortium wurde im Januar 2005 gegründet mit der Aufgabe, die Exon-Skip-

ping-Technik weiterzuentwickeln und klinische Studien durchzuführen. Die Mitglieder dieses Konsortiums sind: *Francesco Muntoni, Kate Bushby, Volker Straub, Dominic Wells, Jenny Morgan, George Dickson, Ian Graham, Matthew Wood, Steve Wilton, and Jenny Versnel*, die alle aktiv an der Duchenne-Forschung beteiligt sind. Das Gesundheitsministerium, der „Medical Research Council“, das „Parent Project UK“, und die britische Muskeldystrophiegesellschaft „Muscular Dystrophy Campaign“, sind ebenfalls im Konsortium vertreten.

Außerdem gibt es den “MDEX Scientific Advisory Board” SAB, einen wissenschaftlichen Aufsichtsrat, zu dem *Kay Davies, Serge Braun, Ian Eperon, David Hilton-Jones, Chris Mathew, und Stephen Meech* gehören und auch nicht-stimmberechtigte Vertreter verschiedener Gesellschaften. Dieser Aufsichtsrat trifft sich alle 4 bis 6 Monate, um die Arbeit des Konsortiums zu überwachen und seine Entscheidungen zu genehmigen.

In London berichtete der Vorsitzende des MDEX-Konsortiums, *Francesco Muntoni* vom Imperial College über den gegenwärtigen Stand der Vorbereitung für die erste klinische Studie and über die Pläne für die Zukunft.

Für diese Studie sind bereits eine Reihe von Entscheidungen gefallen: Es wird Exon 51 geskippt werden, denn dadurch könnte die größte Gruppe von Duchenne-Mutationen, die Deletionen der Exons 45-50, 47-50, 48-50, 49-50, 50, 52, 52-63, die etwa 19% aller Duchenne-Deletionen ausmachen, durch das Skippen dieses einen Exons 51 behandelt werden. Sechs verschiedene AONs wurden an Zellkulturen mit normalen menschlichen Muskeln getestet und auch an Kulturen mit Muskeln von Duchenne-Jungen. Zusammen mit *Steve Wilton* wurden diese AONs auch an isolierten ganzen Muskeln untersucht und mit *Judith van Deutekom* an „humanisierten“ Mäusen, die in ihren Muskeln Dystrophin von Duchenne-Patienten enthielten.

Die besten Ergebnisse wurden mit dem Morpholino-AON H51A erhalten, das in *Steve Wiltons* Laboratorium entwickelt worden war. Dominic Wells konnte zeigen, daß nach der Injektion in mdx-Mäuse diese AONs noch nach 14 Wochen vorhanden war. Das bedeutet, daß die Morpholino-AONs genügend stabil für Langzeitbehandlungen sind, was für eine lebenslange Behandlung von Duchenne-Jungen auch nötig sein wird.

Drei Gruppen mit jeweils zwei 12 bis 18 Jahre alten Duchenne-Jungen werden an dieser ersten klinischen Studie teilnehmen. Wenn alle drei zuständigen Behörden, das “Gene Therapy Advisory Committee GTAC”, die “Medical and Healthcare Product Regulatory Agency MHRA”, und ein lokales Komitee ihre Zustimmung gegeben haben, wird der erste Junge aufgenommen werden und seine Injektionen im März 2007 bekommen.

Für jede Patientengruppe wird eine der drei verschiedene Dosierungen 0,09, 0,297, and 0,9 mg AON in 0,9 ml Lösung verwendet, die in ein Volumen von einem Kubikzentimeter in neun Injektionen direkt in einen der beiden *Extensor digitorum brevis* EDB gespritzt. Dies sind kleine Muskeln an der Fußaußenseite, die nur die Zehen bewegen. Menschen brauchen diesen Muskel gar nicht, und etwa 0.8% haben ihn auch nicht. Er kann also ohne Konsequenzen entfernt werden, falls es nicht akzeptable Nebenwirkungen geben sollte.

Intensive klinische Untersuchungen einschließlich von Biopsien werden vor und 30 Tage nach den Injektionen durchgeführt werden. Die höchste Dosis wird nur verwen-

det werden, wenn die beiden niedrigeren Dosen nicht ausreichen sollten. Und die Studie wird nicht weitergeführt, wenn in den beiden ersten Patientengruppen eindeutige positive oder negative Resultate erhalten werden.

Es werden keine vorläufigen Ergebnisse dieser ersten Studie mitgeteilt werden, es sei denn, negative Resultate erfordern es, die Studie aus Gründen der Sicherheit abbrechen. Die endgültigen Ergebnisse der gesamten Studie werden bekanntgemacht, sobald sie ausgewertet sind und vom wissenschaftlichen MDEX-Aufsichtsrat genehmigt wurden.

Diese erste klinische Studie ist nur ein kleiner Schritt, er wird den *proof of principle* liefern, den grundlegenden Beweis, daß die lokale Injektion eines Morpholino-AONs in einen einzigen menschlichen Muskel sicher ist und die Synthese von wenigstens etwas Dystrophin zur Folge hat. Man hofft, daß mit den verschiedenen Dosierungen in mehr als 10% der Muskelfasern neues Dystrophin gebildet wird. Dies würde zuverlässige Ergebnisse liefern und auch erlauben, die Gesamtmenge an AONs abzuschätzen, die für eine systemische Behandlung aller Muskeln eines Jungen nötig wären.

Die Jungen, die an dieser ersten Studie mit der lokalen Injektion von Morpholinos teilnehmen, werden davon keinen therapeutischen Vorteil haben. Aber die Ergebnisse dieser Studie werden für die endgültige Behandlung, für die systemische Anwendung dieser potentiellen Duchenne-Medikamente in den Blutkreislauf notwendig sein, so daß alle Muskeln eines Jungen erreicht werden. Wenn die erste lokale Studie erfolgreich ist, wird die wichtigere Studie mit systemischen intravenösen Injektionen in der zweiten Hälfte 2007 beginnen. Deren Resultate dürften dann 2008 zur Verfügung stehen.

Was die kommerzielle Herstellung betrifft, so wird dies von den Ergebnissen der klinischen Studien abhängen. Wenn die britischen oder holländischen Studien mit systemischer Anwendung nicht erfolgreich sein sollten, ist es unwahrscheinlich, daß eine industrielle Weiterentwicklung der AON-Medikamente beginnen wird. Wenn sie jedoch zeigen, daß eine systemische Anwendung in Duchenne-Jungen erfolgreich ist, dann wird es wahrscheinlich kurz danach zu einer Produktion von AONs in größerem Maßstab zum Skippen vieler Exons kommen, die dann sicher wesentlich schneller geprüft werden können als es für das Exon-51-Skippen notwendig war.

**Exon-Skipping: Der erste klinische Versuch in Holland:** Auf dem Treffen in Cincinnati berichtete *Gerard Platenburg*, Präsident der Biotechnologie-Firma **Prosensa B.V.** in Leiden in Holland, und auf dem Treffen in London *Judith van Deutekom* vom Medizinischen Zentrum der Universität Leiden über den ersten klinischen Versuch an Menschen mit der Exon-Skipping-Technik.

Das Ziel dieses Versuches ist es zu beweisen, daß das Exon-Skipping sicher und in Duchenne-Patienten wirksam ist. Es handelt sich um eine lokale Studie an einer kleinen Stelle eines einzigen Muskels, des *Tibialis anterior*, des Schienbeinmuskels, der mit einem Antisense-Oligoribonukleotid AON gegen Exon 51 behandelt wird. Der Versuch soll nur einen *proof of principle* liefern, den Nachweis, daß die Technik funktioniert. Obgleich wahrscheinlich verkürztes Dystrophin gebildet wird, ist kein therapeutischer Vorteil für die behandelten Jungen zu erwarten, weil die Injektion des AONs nur ein einziges Mal und lo-

kal erfolgt.

Exon 51 wurde als erstes Ziel des Skippings ausgewählt, weil ein erfolgreiches Skipping allein dieses Exons erlauben würde, das Protein-Leseraster in fast 25% aller Duchenne-Jungen mit Deletionen wiederherzustellen. Für diesen Versuch wurden vier 8 bis 16 Jahre alte holländische Duchenne-Jungen ausgewählt. Jeder Junge hat eine andere Deletion, nämlich der Exons 50, 52, 48-50 und 49-50. Die Studie ist offen, d.h., jeder weiß, daß alle vier Jungen das potentielle Duchenne-Medikament bekommen haben.

Weil Exon-Skipping ein beispielloses neues medizinisches Verfahren ist, wurden intensive klinische und molekulargenetische Tests, sowie eine Biopsie bei jedem Jungen durchgeführt, bevor sie an der Studie teilnehmen durften. Von dem Biopsiematerial wurden Kulturen angelegt, in denen die einzelnen Deletionen in der DNA und auch in der mRNA nachgewiesen wurden. Und, um ganz sicher zu sein, wurden auch die erwarteten Basensequenzen in den Grenzregionen um die deletierten Exons herum in allen Einzelheiten bestätigt. Außerdem wurde das gesamte Dystrophin-Gen durchgetestet, um sicherzustellen, daß keine unerwarteten Unregelmäßigkeiten vorhanden waren. Diese besondere Vorsicht war notwendig, weil diese erste Anwendung des Exon-Skippings auf Menschen die weitere Entwicklung dieser potentiellen Duchenne-Therapie entscheidend beeinflussen wird.

Für diese Studie haben die holländischen Forscher die geschützte Form 2'-O-Methylphosphothioat des anti-51 AONs, auch 2O-Methyl genannt, ausgewählt, vor allem weil sie lange Erfahrungen mit diesen chemisch stabilisierten AONs haben, nicht nur bei erfolgreichen Experimenten mit Muskelzellen in Zellkultur, sondern auch bei der lokalen und systemischen Injektion in einzelne Muskeln und in die Blutzirkulation lebender Tiere.

In dem Ende Oktober noch laufenden klinischen Versuch, bekam jeder Junge eine einzige Injektion einer Lösung von 0,8 mg des anti-51-2O-Methyls unter lokaler Anästhesie in einen kleinen Bereich des Tibialis-anterior-Muskels. Vier Wochen nach der Injektion wurde eine Muskelbiopsie durchgeführt und das erhaltene Muskelgewebe auf die Anwesenheit von verkürztem, „geskipptem“, Dystrophin-Protein und seiner mRNA untersucht.

In allen vier behandelten Patienten gab es keine ernststen Nebenwirkungen. Zur Zeit des Vortrags Ende Oktober waren bereits zwei Biopsien durchgeführt worden, und die ersten Dystrophin-Analysen an dem Muskelgewebe hatten sehr positive Ergebnisse gezeigt. Dr. *van Deutekom* konnte noch keine Einzelheiten mitteilen, aber sie sagte schon, daß die Behandlung ziemlich gut zu verlaufen scheint und daß die Studie, wie geplant, weitergeführt und abgeschlossen werden kann. (Diese Studie ist Ende 2006 mit sehr guten Ergebnissen abgeschlossen worden. Eine Veröffentlichung darüber wird im *New England Journal of Medicine* erscheinen.)

Die holländischen Wissenschaftler bereiten jetzt die nächste klinische Studie vor, mit der sie versuchen wollen, das Exon 51 durch eine systemische Injektion des geeigneten 2O-Methyl AONs in den Blutkreislauf zu skippen, damit das potentielle Medikament alle Muskeln erreichen kann, auch die der Lungen und des Herzens. Es wird sich dabei um eine Kurzzeitstudie handeln, auf die dann wahrscheinlich Studien über eine längere Zeit folgen werden, bei denen es dann schon zu einer deutlichen Verlangsa-

mung der Duchenne-Symptome der Jungen kommen könnte. Inwieweit sich dadurch die Muskelfunktion verbessert, wird von der Art des Becker-Dystrophins abhängen, das nach dem Skipping entsteht. Einige dieser neuen Proteine werden besser wirksam sein als andere.

Am Ende ihres Vortrags bat Dr. van Deutekom die Eltern, vorsichtig zu sein und nicht zu früh Schlüsse zu ziehen. „Wir sind noch nicht da“, sagte sie. Selbst wenn das Exon-Skipping in einem Patienten funktionieren sollte, heißt das nicht, daß es das auch in anderen tun wird. Erst müssen alle Daten analysiert sein, bevor man sagen kann, daß die Technik tatsächlich nach einer lokalen Anwendung funktioniert. Aber die behandelte Muskelregion war jetzt sehr klein, deswegen war gar keine Verbesserung der Muskelkraft zu erwarten. Das war auch nicht das Ziel dieser ersten Studie, sondern nur der Nachweis, daß Exon-Skipping im Prinzip funktioniert und sicher ist. Und mit lokalen intramuskulären Injektionen wird man in Zukunft die Patienten nicht behandeln. Deshalb müssen, bevor weitere Studien beginnen, noch mehr Daten erarbeitet und weitere Tierversuche durchgeführt werden, um unter anderem die optimale AON-Dosis herauszufinden für eine systemische Ganzkörperbehandlung.

Die Antwort auf die Frage „Wann wird wir das für unseren Sohn passende AON in der Apotheke zu haben sein?“ wäre, daß es mindestens fünf Jahre dauern wird, bis das AON für das Exon 51 fertig sein wird. Wenn das gut gegangen ist, wird die Entwicklung anderer AONs gleich danach beginnen. Außer dem 2O-Methyl-AON zum Skipping von Exon 51 hat die Firma Prosensa schon vier andere 2O-Methyls entwickelt und auch in genügend großen Mengen produziert. Mit diesen AONs könnten über 50% aller Patienten mit Deletionen behandelt werden. Die Entwicklung von Medikamenten verlangt sehr viele Experimente und Studien, und das ist teuer und braucht sehr viel

Zeit. Ohne Prosensa wäre alles viel langsamer gegangen. Selbst mit dem Einsatz dieser Firma hat die Vorbereitung der jetzigen klinischen Studie zwei Jahre gedauert.

Auf die Frage, wie Patienten an den nächsten Studien teilnehmen können, ist die Antwort, daß, wenn die klinischen und genetischen Daten in den holländischen Datenbanken sind, daß dann die Eltern benachrichtigt werden, falls ihr Sohn alle Bedingungen für die Teilnahme an den Studien erfüllt.

*Judith van Deutekom* dankte schließlich vor allem den Parent-Project-Gruppen in den verschiedenen Ländern und anderen Geldgebern für ihre finanzielle Unterstützung, und sie bat die Jungen und ihre Eltern, Geduld und Vertrauen zu haben, denn „we will get there“, wir werden es schaffen“.

**Systemisches Exon-Skipping im Hund:** *Terry Partridge* vom Children's National Medical Center in Washington, der aber nicht in London war, schickte im Januar 2007 folgende Nachricht:

„Ein fünf Monate alter Hund aus der japanischen Kolonie dystrophischer Hunde bekam intravenöse Infusionen der Kombination von Morpholinos, die für ihre komplizierte Mutation entwickelt worden war. Zwei Wochen nach der letzten Infusion hatte der Hund deutliche Mengen Dystrophin in vielen seiner Muskeln, die Krankheitssymptome in den Muskeln sahen viel besser aus, und er konnte immer noch schnell laufen. Seine beiden nicht behandelten Geschwister hatten praktisch kein Dystrophin und die Muskeln waren gemäß allen gemessenen Werten weiter degeneriert. In dem behandelten Hund gab es keine toxischen Nebeneffekte. Wir werden jetzt Experimente mit zwei weiteren Hunden beginnen und zwar mit einer höheren AON-Dosierung über einen längeren Zeitraum.“

## Transfer des Dystrophin-Gens.

**Virus-Vektoren und Muskel-Stammzellen:** *Jennifer Morgan* vom Dubowitz-Muskelzentrum des Imperial College in London begann ihren Vortrag mit einer Beschreibung der verschiedenen Vektoren, die verwendet werden für den Transfer der ganzen bzw. verkürzten kodierenden Sequenz des Dystrophin-Gens in die Muskelzellen von Duchenne-Jungen. Das Wort *Vektor* wird für die molekularen Transporter von Gensequenzen benutzt. Es sind meistens Viren, die normalerweise lebende Zellen infizieren und dabei ihre eigenen Gene mitbringen, mit denen sie die Zellen dazu bringen, sie, die Viren, zu vermehren.

Die Wissenschaftler haben gelernt, nicht-pathogene Viren im Laboratorium zu züchten, die also keine schweren Krankheiten verursachen. Ihnen wurden alle Gene für ihre eigene Vermehrung weggenommen, aber diejenigen übriggelassen, die sie brauchen, um in die Muskelzellen einzudringen. Dadurch haben sie Platz für fremdes genetisches Material, das in ihre fast leere Proteinhülle eingebracht werden kann. Diese modifizierten Viren können immer noch ihre Zielzellen infizieren, aber sie können sich nicht mehr in ihnen vermehren.

Das transportierte genetische Material gelangt in die Zellkerne und bleibt dort entweder außerhalb der Chromosomen oder wird in eines von ihnen eingebaut. Unter günstigen Umständen kann dieses fremde Material, dieses

fremde Gen, aktiv werden und die Funktion eines geschädigten Gens übernehmen, das nicht mehr richtig funktioniert. Modifizierte Viren, die die ganze oder einen Teil der kodierenden Sequenz des Dystrophin-Gens mit sich bringen, können deshalb veranlassen, daß das Dystrophin-Protein wieder produziert wird. Viren können also gentherapeutisch wirken, sie können ein *genetisches Medikament* sein.

Es gibt eine Reihe von verschiedenen Viren, die als Vektoren für Gentherapie-Experimente verwendet werden. Die Viren, mit denen die Duchenne-Forscher meistens arbeiten, um in den Muskelzellen wieder Dystrophin zu erzeugen, sind die *adeno-assoziierten Viren*, AAV. Sie sind sehr kleine Viren, die ein einsträngiges DNA-Molekül als ihr normales genetisches Material haben, als ihr Genom. Sie können in die post-mitotischen Skelettmuskelzellen eindringen, die 40 bis 45% des Gewichtes eines Menschen ausmachen. „Post-mitotisch“ bedeutet, daß diese Zellen keine Mitosen mehr machen, daß sie sich nicht mehr teilen. Weil diese Viren so klein sind, können sie nur fremdes genetisches Material akzeptieren, dessen Sequenz nur weniger als etwa 5.000 Nukleotide lang ist.

Das bedeutet, daß sie nur ungefähr ein Drittel der Dystrophin-cDNA transportieren können, also ein Drittel der aneinandergehängten Exons des Gens. Die Vektor-Kon-

struktion, die jetzt für die erste klinische Gentransfer-Studie in Columbus/Ohio verwendet wird, enthält eine Mikro-Dystrophin-cDNA mit der Information für ein verkürztes Dystrophin, das nur aus 2.539 Aminosäuren besteht, das sind 31,1% der 3.685 Aminosäuren des normalen Dystrophins. Weil dieses Dystrophin kürzer als normal ist, wird diese Art der Gentherapie die Duchenne-Muskeldystrophie nicht vollständig heilen, sondern, wie beim Exon-Skipping, nur die schnelle Degeneration der Muskeln zu der erträglicheren der Becker-Muskeldystrophie verlangsamen.

Die adeno-assoziierten Viren laden ihre Last, das therapeutische Genmaterial, ganz zufällig in eines der Chromosomen ab, es kann daher nicht vorausgesagt oder kontrolliert werden, wo das Abladen passieren wird. Sie können das mitgebrachte Gen zwischen zwei andere Gene einfügen, oder innerhalb eines Introns oder eines Exons. Sie können dadurch ein anderes Gen aktivieren, inaktivieren oder auch zerstören. Das kann eine andere Krankheit auslösen oder sogar Krebs, wenn ein proto-Onkogen aktiviert wird.

Aus diesen und anderen Gründen, hat Dr. Morgan und ihre Forschungsteam begonnen, eine andere Strategie zu verfolgen: Die *Kombination von Stammzellen und Gentherapie*. Die Satellitenzellen der Muskelfasern sind Stammzellen, die sich zu neuen Muskelzellen im schadhafte Muskelgewebe entwickeln können. Einige teilen sich asymmetrisch, wie es Stammzellen oft tun, und bilden so neue Satellitenzellen, die sich dann an die Außenseite der Muskelzellmembran anheften, von wo sie verletzte Muskelzellen regenerieren können. Es konnte schon gezeigt werden, daß Satellitenzellen von einem gesunden Spender, der also normale Dystrophin-Gene hat, die Produktion von neuem normalen Dystrophin veranlassen, nachdem sie in die degenerierenden Muskeln eines Duchenne-Patienten injiziert wurden. Andere Typen von Stammzellen können ebenfalls Skelettmuskeln reparieren, z.B. Mesoangioblasten, Stammzellen aus Blutgefäßen. Die Forscher wollen Stammzellen finden, die am besten Muskeln regenerieren können, und sie dann in zukünftigen Experimenten verwenden.

Lentiviren sind eine Art Retroviren mit RNA als genetischem Material, das sie in die DNA der infizierten Zellen einbauen, die dann davon eine doppelsträngige DNA-Kopie machen. Diese Viren infizieren teilende und nicht-teilende Zellen, also auch die Satellitenzellen der Muskelfasern.

Dr. Morgans Team verwendete solche Lentiviren, um dies Gene des modifizierten U7-Spleißfaktors mit einer Antisense-Sequenz zum Skippen von Exon 51 zu transportieren. Dies ist eine ähnliche Technik wie sie von den französischen Wissenschaftlern um *Luis García* entwickelt wurde, die aber mit adeno-assoziierte Viren als Vektoren arbeitet. Dr. García hatte auch die Lentivirus-U7-Vektor-konstruktion für Dr. Morgan hergestellt. In vorläufigen Experimenten mit dieser Lentivirus-Technik konnte Exon 51 in Kulturen mit menschlichen Muskelzellen nach wenigen Stunden geskippt werden. Aber diese Experimente müssen wiederholt und weiterentwickelt werden. Neue Ergebnisse von diesem neuen Weg zu einer Duchenne-Therapie werden sicher bald bekannt werden.

**Erster klinischer Versuch mit dem Dystrophin-Gen-transfer in den USA: *Xiao Xiao*** von der Universität von

North Carolina in Chapel Hill konnte nicht zu dem Treffen in London kommen, er schickte die folgende Zusammenfassung über den Stand der Gentherapie durch mini-Dystrophin-Gentransfer mit adeno-assoziierten Viren:

„Gentherapie ist eine von vielen Strategien, die sehr aktiv für eine Behandlung der Duchenne-Muskeldystrophie entwickelt wird. Unter den Gentherapie-Ansätzen hat die Übertragung funktionsfähiger mini- oder mikro-Dystrophin-Genen mit adeno-assoziierten Viren, AAV, einige deutliche Vorteile. Diese Technik ist sehr wirksam in Herz- und Skelettmuskeln und wäre für alle Duchenne-Patienten geeignet. Vorklinische Studien in kleinen und großen Versuchstieren haben den prinzipiellen Beweis für die Wirksamkeit dieser Technik geliefert und dadurch zur Vorbereitung von klinischen Versuchen geführt.

Durch die Zusammenarbeit zwischen den Universitäten der Staaten Ohio und North Carolina, sowie der Firma **Asklepius Biopharmaceutical** und mit der Unterstützung der amerikanischen Muscular Dystrophy Association MDA, wurde eine klinische Phase-Ia-Studie im März 2006 begonnen. Sie wurde von der Medikamenten-Zulassungsbehörde FDA genehmigt, nachdem Sicherheits- und Toxizitäts-Studien mit dem AAV-mini-Dystrophin-Vektor an Versuchstieren durchgeführt wurden.

Es handelt sich um eine randomisierte doppel-blinde Studie mit sechs Patienten und lokalen intramuskulären Injektionen mit zwei verschiedenen Dosierungen des Genvektors. Die wichtigsten Ziele sind: (1) Für jeden Patienten Daten zu sammeln vor und nach der Behandlung über Fieberreaktionen, Hautentzündungen an der Injektionsstelle, Schwellungen und Ödeme, sowie Änderungen der Ergebnisse von Serum- und Blutanalysen, Urinalysen, und der Messung der Lungenfunktion und der Muskelkraft; (2) die Dosis zu bestimmen, die für die Produktion des mini-Dystrophins im Muskel notwendig ist; und (3) die möglichen Immunreaktionen gegen das mini-Dystrophin und das Vektormaterial zu überwachen.

Bisher haben alle drei Patienten der Gruppe mit der niedrigen Dosierung ihre Injektionen bekommen, und an ihnen wurden auch Biopsien durchgeführt. Es wurden keine Nebenwirkungen beobachtet, die von den Injektionen hätten herrühren können. Zwei der drei Patienten der Gruppe mit der hohen Dosierung sind auch bereits injiziert worden. Auch hier gab es keine Nebenwirkungen, ein Zeichen, daß die Behandlung gut vertragen wird.

Wegen der doppel-blinden Natur der Studie wird das Muskelgewebe der Biopsien erst dann auf Dystrophin untersucht, wenn auch der letzte der sechs Patienten seine Injektionen bekommen hat und alle Muskelproben vorliegen. Die Ergebnisse der Untersuchungen aller Patienten sollten dann im Spätsommer 2007 zur Verfügung stehen.

Unser nächstes Ziel ist es, Methoden zur regionalen Injektion unter Druck zu entwickeln, ähnlich wie sie bei den französischen Studien mit Plasmiden verwendet werden. Damit ließen sich dann größere Gruppen von Muskeln behandeln und später die des ganzen Körpers. Wir haben diese retrograde intravenöse Perfusionsmethode bereits an ganzen Beinen von normalen und dystrophischen Hunden ausprobiert mit Reporter-Genen und mit dem mini-Dystrophin-Gen des Hundes. Und wir haben schon ermutigende Ergebnisse des Gentransfers und der Neubildung von Dystrophin erhalten.

Außerdem haben wir begonnen, diese Methode mit Reporter-Genen auch in Affen anzuwenden. Unsere vorläufig-

gen Ergebnisse zeigten eine verbreitete Aktivität des Gens in verschiedenen Muskelgruppen der Beine. Es sind jedoch noch intensive Kurz- und Langzeitstudien erforderlich, um das Gentransfersystem zu optimieren und Sicherheit und Wirksamkeit in größeren Tieren sicherzustellen, bevor eine Phase-Ib klinische Studie mit regionalem Gentransfer stattfinden kann.“

Bei dem Treffen in Cincinnati, hatte *Scott McPhee* von der Firma Asklepios berichtet, daß in dieser klinischen Studie ein modifizierter AAV des Serotyps 2, BNP2.5 genannt, verwendet wird, der ein mini-Dystrophin-Gen transportiert, dem 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 ein Drittel so lang sein wird wie das normale Protein, weil es die Stabregionen R3 bis R21 und das C-terminale Ende nicht hat.

**Exon-Skipping mit U7-Gentransfer:** *Luis García* vom Généthon Institut in Evry bei Paris beschrieb die Ergebnisse, die in seinem Laboratorium durch die Kombination des Exon-Skippings mit einer Genterapie erhalten wurden. Die französischen Forscher versuchen, den Muskelzellen beizubringen, wie sie die Antisense-Oligoribonukleotide, AONs, die sie für das Exon-Skipping brauchen, selbst produzieren können, so daß sie also nicht wiederholt gespritzt werden müssen. Dies sollte man erreichen können, wenn man die genetische Information für die Konstruktion der AONs in die Muskeln transportiert. Ihre Idee war es, U7-snRNAs zu verwenden, kleine nukleare RNAs, die eine den Spleißfaktoren ähnliche Struktur haben. Diese U7-snRNAs kann man modifizieren, damit sie Exon-Skipping verursachen.

Um einen *proof of principle*, die prinzipielle Machbarkeit, zu beweisen, testeten die französischen Forscher diese Idee an der mdx-Maus, deren Dystrophin-Mutation, ein vorzeitiges Stoppcodon, durch das Skipping von Exon 23 korrigiert werden kann. Um dies zu erreichen, hängten die Wissenschaftler die kurze DNA-Sequenz, die die Information für zwei Antisense-Sequenzen enthält, an das Gen für die U7-snRNA. Es ist wichtig zu wissen, daß die snRNAs wie alle anderen RNAs auch, ebenfalls von Genen „gemacht“ werden.

Diese zusätzlichen DNA-Sequenzen im U7-snRNA-Gen waren 24 und 20 Nukleotide lang und so konstruiert, daß sie, nachdem sie zu RNA kopiert waren, sich spezifisch an zwei Sequenzen der Dystrophin-pre-mRNA der Maus anlagerten. Eine dieser Sequenzen befindet sich am Ende des Introns 22 und die andere an der Grenze zwischen Exon 23 und dem folgenden Intron 23.

Um das so modifizierte U7-Gen, U7 SD23/BP22, in die Muskeln der Mäuse zu transportieren, wurde es zusammen mit zusätzlichen Kontrollsequenzen in einen Vektor eingebaut, den adeno-assoziierten Virus, AAV. Dieser AAV hatte die genetische Struktur von Typ 2 und die Proteinhülle vom Typ 1, und Teile seines eigenen genetischen Materials waren entfernt worden, um Platz zu schaffen für das genetische Material, das transportiert werden sollte.

Bis zu 20 Billionen ( $20 \times 10^{12}$ ) dieser modifizierten und harmlosen Viren wurden in die Muskeln von 37 mdx-Mäusen injiziert. Nach sechs Wochen hatten bis zu 80% der Muskelfasern in den behandelten Muskeln neues verkürztes Dystrophin, das nicht mehr die 72 Aminosäuren enthielt, die von der normalen Sequenz des Exons 23 determiniert werden. Und dieses neue Dystrophin war ein Jahr

nach der einmaligen Injektion des Vektors noch vorhanden. Das neue Dystrophin war auch an seine normale Position unterhalb der Muskelzellmembran gewandert, und die so „geretteten“ Muskelfasern sahen unter dem Mikroskop ganz normal aus. Der dystrophische Prozeß in den mdx-Muskeln, d.h., ihre beschleunigte Degeneration und Regeneration, war vollständig zum Stillstand gekommen. Es gab auch keine Immunreaktion gegen das neue Dystrophin.

Jetzt wurden fünf weitere mdx-Mäuse ähnlich behandelt, nur wurden die Viren in die Blutzirkulation injiziert. Nach einem Monat hatten mehr als 80% der Fasern aller untersuchten Beinmuskeln neues Dystrophin und auch die überprüften anderen Proteine des Dystrophinkomplexes waren wieder da. Das heißt, im neuen Dystrophin waren die Bindungsstellen mit diesen Proteinen ganz normal ausgebildet.

Und schließlich wurde die Muskelfunktion überprüft durch forcierte Verlängerung und anschließender selbständiger Kontraktion der behandelten Muskeln. Diese sonst sehr reduzierte Funktion der mdx-Mäuse war ganz normal geworden, sobald die Muskeln mehr als 70% neues Dystrophin hatten. Und behandelte mdx-Mäuse, die mit einem Bergab-Dauerlauf in einer Tretmühle körperlich belastet wurden, entwickelten keine Muskelschäden wie sie bei unbehandelten mdx-Mäusen immer vorkommen.

Diese U7-Transfer-Technik wurde dann auf den dystrophischen *golden retriever*, den Apportierhund, GRMD, angewendet. Im Gegensatz zu der mdx-Maus, die trotz des fehlenden Dystrophins gar nicht richtig behindert ist, hat der dystrophische Hund schwere klinische Symptome, die ähnlich sind wie die eines Duchenne-Jungen. Sein Dystrophin-Gen hat eine Punktmutation in der Spleißrezeptor-Region des Exons 7, deswegen fehlt dieses Exon und das Leseraster ist nach dieser Deletion verschoben. Dies hat zu einem vorzeitigen Stoppcodon geführt, so daß der Hund kein Dystrophin in seinen Muskeln hat. Das Leseraster kann wiederhergestellt werden, wenn man die beiden flankierenden Exons 6 und 8 gleichzeitig skippt.

Dies ist eine Mutation, die schlecht zu beheben ist. Zunächst wurde das Doppel-Exon-Skipping versucht mit der gleichzeitigen Übertragung von zwei verschiedenen modifizierten U7-Genen gegen die Exons 6 und 8. Nachdem die Ergebnisse enttäuschend waren, bauten die Forscher in den gleichen Vektor das modifizierte U7-Gen gegen Exon 8 und ein modifiziertes U7-Gen gegen die beiden Exons 6 und 7 ein. Zwei Monate nach der lokalen intramuskulären Injektion von 1 Billion ( $10^{12}$ ) dieser Tandem-Vektoren, wurde in der ca. 1 cm langen Muskelprobe, die durch Biopsie erhalten wurde, praktisch die normale Menge Dystrophin nachgewiesen.

Dieses Resultat zeigt, daß es wahrscheinlich möglich ist, alle Skelettmuskeln mit dieser Art Genterapie zu „retten“. Deswegen hätte als nächster Schritt eine systemische Behandlung mit den Vektoren versucht werden sollen. Die französischen Wissenschaftler hatten aber nicht genügend von den mit der U7-DNA und den AON-Sequenzen beladenen Viren, um den ganzen Hund zu behandeln. Deswegen blockierten sie die Blutzirkulation in einem Hinterbein und injizierten in seine Vene innerhalb von 15 Minuten praktisch alle ihre 100 Billionen ( $10^{14}$ ) präparierten Viren. Einige Ödeme entwickelten sich, aber das hatte seine Vorteile, denn die Viren wanderten dorthin, wohin sie wandern sollten. Eine ziemliche Menge neues und verkürztes

Dystrophin war aufgetreten, das aber nicht gleichmäßig in den Beinmuskeln verteilt war, aber es war in Mengen da, die für Becker-Patienten charakteristisch sind. Nach sechs Monaten war es noch immer vorhanden.

Jetzt wird eine Phase-I klinische Studie mit Duchenne-Jungen vorbereitet, bei der Exon 51 geskippt werden soll. Solch eine Behandlung mit Virusvektoren wird wahrscheinlich eine Immunsuppression erfordern. Und *Luis García* und seine Kollegen versuchen auch, diese Behandlung mit einem ähnlichen Gentransfer zu kombinieren, mit dem das Gen für Myostatin blockiert wird. Diese Kombination wurde schon an Mäusen ausprobiert, doch sie sind dafür nicht die geeigneten Tiere, denn sie regenerieren ihre Muskeln zu schnell. Jetzt soll dies mit Hunden versucht werden. Die Ergebnisse darüber werden in etwa einem Jahr bekanntgegeben.

**Dystrophin-Gentransfer: Klinische Studie mit Plasmiden in Frankreich:** *Serge Braun*, Direktor für Forschung und Entwicklung der französischen Muskeldystrophiegesellschaft AFM, der nicht bei dem Treffen in London war, schickte die folgende Zusammenfassung:

„AFM und die Firma **Transgène** in Straßburg begannen 1995 eine Zusammenarbeit, um die Übertragung des Dystrophin-Gens mit Plasmid-Vektoren zu testen. Für diese Technik wurden die kombinierten 79 DNA-Exon-Sequenzen des normalen Dystrophin-Gens, seine cDNA, mit ihren Kontrollstrukturen in das genetische Material von Plasmiden eingebaut. Plasmide sind kleine ringförmige DNA-Strukturen ohne Proteine innerhalb von Bakterien, denen sie hauptsächlich eine Resistenz gegen Antibiotica verschaffen. Da die Plasmide nur aus genetischem Material bestehen, aus *nackter DNA*, aber kein Protein enthalten, entwickelt sich keine Immunabwehr gegen sie und auch nicht gegen ein fremdes Gen, das sie mitbringen.

Nach erfolgreichen vorbereitenden Experimenten mit Muskelzellkulturen und mit dystrophischen Mäusen und Hunden, wurde eine erste klinische Studie mit Patienten Ende 2000 begonnen. Die 9 Duchenne-Jungen, die an dieser Studie teilnahmen, waren alle älter als 15 Jahre, weil sie ihre informierte Zustimmung geben mußten. Eine Lösung der Plasmide wurde in einen einzelnen Muskel des Unterarms injiziert. Neues Dystrophin normaler Länge bildete sich in bis zu 25% der Muskelfasern um die Injektionsstellen herum. Es gab keine Anzeichen einer Immunreaktion, weder gegen die Plasmidkonstruktion noch gegen das neu produzierte Dystrophin. Diese Phase-I-Studie zeigte, daß der Gentransfer mit nackter DNA eine sichere Behandlungsmöglichkeit ist.

Die französischen Wissenschaftler begannen dann eine Zusammenarbeit mit *Jon Wolff* von der Firma **Mirus** in Madison/Wisconsin, der ähnliche Plasmidkonstruktionen in die Blutzirkulation einzelner Beine von Mäusen, Ratten, Hunden und Affen *unter Druck* injizierte hatte. Der Druck wurde erzeugt durch die kurzzeitige Blockade der Blutzirkulation in einem Bein mit einer Blutdruckmanschette.

Als nächster Schritt wird jetzt eine klinische Studie an Duchenne-Patienten mit dieser neuen Transfer-Methode vorbereitet, der regionalen intravenösen Injektion in einzelne Gliedmaßen unter Druck. Die gleiche Transfer-Methode wurde vor kurzem mit Erfolg im Laboratorium von *Luis García* zum Exon-Skippping nach einem Transfer des U7-Gens in Mäusen und Hunden angewendet. Doch bei

der Vorbereitung dieser Plasmid-Studie hat es Schwierigkeiten bei der Herstellung der Vektoren im großen Maßstab gegeben. Doch dies sind technische und keine prinzipiellen Schwierigkeiten, deshalb werden sie bald gelöst sein.

Die amerikanischen und französischen Genehmigungsbehörden sind schon wegen der neuen Studie kontaktiert worden. Vorklinische kontrollierte Sicherheitsstudien in Affen sind noch notwendig, bevor die Plasmidvektoren bei Menschen angewendet werden können. Transgène und Mirus haben bereits gute Daten zur Sicherheit der Vektoren sowohl in dystrophischen GRMD-Hunden als auch in Affen, so daß die Sicherheitsstudien an Menschen keine Probleme bereiten sollten.

Diese Studien mit dem Dystrophin normaler Länge müssen weitergeführt werden, denn selbst wenn es einmal eine Exon-Skippping-Therapie für Duchenne-Dystrophie geben sollte, brauchen die Patienten, die dafür nicht in Frage kommen, eine Alternative.

**Transfer von myogenen Zellen, klinische Studie in Kanada:** *Jacques Tremblay* von der Laval University in Québec City, der nicht in London war, schickte Publikationen über neue Experimente mit dem Myoblastentransfer, der jetzt besser *Transplantation myogener Zellen* genannt werden sollte.

In einer klinischen Studie mit 9 Duchenne-Patienten konnten die kanadischen Wissenschaftler zeigen, daß in 8 Patienten bis zu 26% Muskelfasern mit neuem normalen Dystrophin gebildet wurden nach der Injektion von normalen myogenen Zellen von einem Verwandten. Die Zellen wurden in einem Abstand von nur 1 bis 2 mm voneinander in eine kleine Region des Schienbeinmuskels *Tibialis anterior* injiziert.

Zur Zeit läuft eine zweite klinische Studie mit Injektionen in einen ganzen Muskel, an dem man eine funktionelle Verbesserung leicht messen kann, nämlich die Hand heben durch die Bewegung nur des Handgelenks. Diese Zelltransplantation würde eine Reihe von Vorteilen bringen, darunter (1), das neue Dystrophin würde die normale Länge haben und unter dem Einfluß seiner normalen Kontrollsequenzen bleiben; (2) der positive Effekt würde langfristig sein; (3) diese Technik könnte mit einer Hemmung des Myostatins kombiniert werden; und (4), am wichtigsten, sie könnte auch älteren Patienten helfen.

Das ethische Komitee des Hospitals in Québec City hat jedoch bestimmt, daß nur Patienten teilnehmen können, die mindestens 18 Jahre alt sind. Diese Vorschrift macht es schwierig, Patienten zu finden, die diese Handbewegung noch auf beiden Seiten ausführen können. Bei der Studie werden die myogenen Zellen nur auf einer Seite gespritzt, während die andere eine Injektion von physiologischer Kochsalzlösung bekommt. Der Patient erfährt nicht, in welche Seite die Zellen gespritzt wurden, so daß eine Funktionsverbesserung ohne Beeinflussung durch eine vorgefaßte Meinung gemessen werden kann.

Einige Eltern beunruhigen sich über die große Zahl der Injektionen, die für die Behandlung eines ganzen Muskels notwendig sind – 100 Injektionen pro Quadratzentimeter. Diese Art der Transplantation wurde bereits ohne Probleme an einer großen Zahl von Affen durchgeführt und vor kurzem auch an zwei älteren Duchenne-Patienten unter lokaler Anästhesie, die genügt hat, den örtlich begrenzten Schmerz nach dem Ende der Anästhesie zu verringern.

Beide Patienten sagten, daß sie ohne zu zögern weitere Injektionen in andere Muskeln akzeptieren würden.

Zusammen mit der französischen Muskelgesellschaft AFM hat Dr. Tremblay ein kleines Treffen in Evry bei Paris organisiert, bei dem man Anfang Februar 2007 versuchen möchte, den Mechanismus der Wanderung der myogenen Zellen in den Muskeln zu verstehen, damit die Zahl der Injektionen eventuell verringert werden kann.

Die Arbeitsgruppe von Dr. Tremblay versucht auch, die Hemmung von Myostatin mit der Transplantation der myogenen Zellen zu kombinieren. Neuere Ergebnisse mit dystrophischen Mäusen zeigten deutlich, daß die Muskelfasern, die Dystrophin bilden, mehr als doppelt so groß sind. Die Gegenwart von Dystrophin sollte die Muskelfasern während der Muskelkontraktion resistenter machen, während ihr vergrößertes Volumen auch die Muskelkraft erhöhen sollte.

Ein anderes Forschungsziel ist die Entwicklung von Immuntoleranz. Dabei geht es darum zu vermeiden, daß Medikamente, die eine Immunantwort unterdrücken, nach einer Transplantation myogener Zellen dauernd gegeben werden müssen. Nach Anwendung einer TTCB genannten Behandlung, die eine Kombination von Treosulfan mit Cyclophosphamid einschloß, waren die Resultate, die mit Mäusen erhalten wurden, ausgezeichnet. Dystrophin-positive Fasern wurden beobachtet in den dystrophischen Muskeln ohne dauernde Immunsuppression, und es war sogar möglich, eine zweite Transplantation der myogenen Zellen zu unternehmen, ohne die tolerigene Behandlung, die Immunsuppression, wiederholen zu müssen. Ähnliche Experimente mit Hunden und Affen werden ebenfalls durchgeführt, um Resultate zu erhalten, die es möglicherweise erlauben werden, eines Tages solche tolerigene Behandlungen an Patienten vorzunehmen. Es wird aber noch einige Jahre dauern, bevor das Ziel erreicht wird. Diese tolerigene Behandlung würde eventuell auch nützlich für die Transplantation von Stammzellen sein, die von einem Spender stammen, wie die Mesoangioblasten, die zur Zeit von *Giulio Cossu* untersucht werden.

**Gentransfer in Italien mit Mesoangioblasten, adulten Muskelstammzellen:** *Giulio Cossu* vom Stammzell-Institut am Hospital San Raffaele in Mailand, der auch nicht beim Treffen in London war, aktualisierte und erweiterte eine früher von mir geschriebenen Zusammenfassung seiner neuen Arbeiten.

Für eine wirksame Stammzelltherapie der Duchenne-Dystrophie braucht man eine sichere und ethisch akzeptable Quelle größerer Mengen von adulten, „erwachsenen“, Muskelstammzellen, die nur neue Muskelzellen erzeugen und nichts anderes. Und es sollte möglich sein, diese Zellen systemisch in den Blutkreislauf zu injizieren, von wo sie aus alle Muskeln erreichen würden. Dann haben sie die Wände der Blutgefäße zu durchqueren und müssen in den Muskeln bleiben, ohne lokal Probleme zu machen. Diese Bedingungen scheinen die Mesoangioblasten zu erfüllen. Dies sind adulte Stammzellen, die sich an der Außenseite von kleinen Blutgefäßen innerhalb des Muskelgewebes befinden.

*Giulio Cossu* und seine Kollegen führten grundlegende Experimente durch, deren Ergebnisse nicht nur für eine Stammzell-Behandlung der Duchenne-Muskeldystrophie wichtig sein werden, sondern auch für viele andere Muskelkrankheiten.

Die italienischen Forscher arbeiteten zunächst nicht mit der mdx-Maus als Versuchstier, sondern mit einer Maus, deren Gen für alpha-Sarkoglykan inaktiviert war, einem Protein des Dystrophin-assoziierten Komplexes. Diese Mäuse haben einen Typ der Gliedergürtel-Muskeldystrophie, englisch LGMD abgekürzt, welche klinisch der Duchenne-Dystrophie ähnelt.

Die Forscher isolierten Mesoangioblasten aus normalen Mäusen, die ein intaktes alpha-Sarkoglykan-Gen haben, behandelten sie im Laboratorium mit mehreren verschiedenen Wachstumsfaktoren und injizierten sie dann in die Blutzirkulation der LGMD-Mäuse. Diese „gesunden“ Stammzellen wanderten in alle Skelettmuskeln der lebenden Mäuse und bewirkten, daß mehr als 80% der normalen Menge alpha-Sarkoglykan wieder gebildet wurde. Ähnliche Ergebnisse wurden mit Mesoangioblasten erhalten, die aus dystrophischen LGMD-Muskeln isoliert wurden und die in Zellkultur mit einem Viren-Vektor das Sarkoglykan-Gen übertragen bekamen.

Für eine mögliche Duchenne-Therapie durch diese neue Technik müßte das intakte Dystrophin-Gen in Mesoangioblasten eines Patienten *ex-vivo* mit bekannten Vektoren transferiert, dann im Laboratorium vermehrt, und schließlich in die Blutzirkulation des Patienten zurückinjiziert werden. Wahrscheinlich müßte diese Behandlung periodisch wiederholt werden, daher ist es wichtig, daß diese Zellen vom Immunsystem nicht als fremd betrachtet und abgestoßen werden. Man könnte aber auch Spender-Zellen verwenden, müßte dann aber immun-unterdrückende Medikamente geben.

Als nächsten Schritt zu einer Anwendung beim Menschen isolierte Dr. Cossu Team daher Mesoangioblasten von normalen und dystrophischen Hunden, vermehrte sie in Zellkultur und injizierte sie in die Hinterbein-Arterie dystrophischer Hunde. Vor der Rückinjektion der eigenen Mesoangioblasten wurde das Gen, die cDNA, eines micro-Dystrophins *ex-vivo* mit einem Lentivirus-Vektor in diese zuvor isolierten eigenen dystrophischen Mesoangioblasten transferiert.

Bis zu fünf monatliche Injektionen entweder der normalen oder der korrigierten dystrophischen Mesoangioblasten führten zu neuem Dystrophin-Protein in vielen Muskeln der dystrophischen Hunde. Bei einem der Tiere wurden die Zellen über ein Katheter in die Aorta, die Halsschlagader, injiziert. Dies führte zu einer weiten Verteilung der Mesoangioblasten in alle Muskeln.

Das Ergebnis dieser Stammzellinfusionen war dramatisch: Dieser letztgenannte Hund zeigte eine deutliche Verbesserung seiner Dystrophie, und er konnte fünf Monate nach der letzten Injektion gut laufen, während die anderen behandelten Tiere sich weniger gut regenerierten.

Im allgemeinen verbesserten sich die Hunde, die Spenderzellen von normalen Tieren bekommen hatten, mehr als die Hunde, die ihre eigenen korrigierten Mesoangioblasten erhalten hatten. Einige Muskeln der behandelten Hunde hatten fast normale Mengen Dystrophin, und selbst die Muskeln mit nur geringeren Mengen Dystrophin zeigten eine deutlich verbesserte Struktur und Funktion.

Mit weiteren Experimenten konnten die Forscher die therapeutische Wirkung der Mesoangioblasten noch erhöhen, indem sie sie in Zellkultur mit DETA-NO oder IMN behandelten, zwei gut bekannten Verbindungen, die das Gas NO, Stickoxid, im Kulturmedium produzieren. Stickoxid wirkt wie ein Hormon, sein hauptsächlichster Effekt ist

die Erweiterung von Blutgefäßen.

Nach der systemischen Injektion der mit NO behandelten Mesoangioblasten in die Arterien von LGMD-Mäusen ohne alpha-Sarkoglykan, konnten diese Stammzellen wesentlich besser zu den dystrophischen Muskeln wandern, besser mit regenerierenden Muskelfasern verschmelzen und auch besser der aggressiven Zellen-zerstörenden Umgebung innerhalb der dystrophischen Muskelzellen widerstehen. Diese Behandlung führte zu einer signifikanten Wiederherstellung der Produktion von alpha-Sarkoglykan und konnte dadurch die Schädigung der Muskeln dieser dystrophischen Mäuse begrenzen.

Im Hinblick auf das Ziel, eine Duchenne-Therapie zu entwickeln, hatten die Wissenschaftler die Idee, nach einem Medikament zu suchen, daß nicht nur NO produzieren konnte, sondern auch entzündungshemmende Eigenschaften ähnlich wie sie Prednison hat. Die Wahl fiel auf HCT 1026, ein Derivat von Flurbiprofen, eines der stärksten nicht-steroiden entzündungshemmenden Medikamente. HCT 1026 setzt NO frei und bringt nicht die oft sehr ernstesten Nebeneffekte der Corticosteroide mit sich. Es ist ein bekanntes und sicheres Medikament, das bereits für eine Anwendung bei Menschen zugelassen und auch oral wirksam ist, d.h., es kann als Tablette genommen werden. Deshalb ist es auch für Langzeitbehandlungen geeignet.

Die entzündungshemmende Aktivität von HCT 1026 korrigiert nicht den genetischen Defekt der Duchenne-Dystrophie, aber da es auch NO bildet, das die Wirkung der Mesoangioblasten stimuliert, müßte eine Kombination der beiden potentiellen Therapien sehr aussichtsreich sein.

Deshalb testeten *Giulio Cossu* und sein Kollege *Emilio Clementi* mit ihren Teams die Wirkung von HCT 1026 allein und zusammen mit Mesoangioblasten an den beiden Versuchstieren für Muskeldystrophie, der alpha-Sarkoglykan-negativen und der mdx-Maus in einem Langzeitexperiment über ein ganzes Jahr. HCT 1026 allein verlangsamte das Fortschreiten der Krankheit dramatisch und stabilisierte die Muskelstruktur und Muskelfunktion. Es war deutlich stärker wirksam als Prednisolon und zeigt keine nachweisbaren Nebenwirkungen. Und ganz besonders wichtig war es, daß die kombinierte medikamentöse und Stammzellbehandlung die Zahl der Dystrophin-positiven Muskelfasern in mdx-Mäusen bis auf das Vierfache steigerte und so das therapeutische Potential der Mesoangioblasten deutlich verstärkte, indem es ihre Wanderung zu den dystrophischen Muskeln beschleunigte und die Verschmelzung mit den geschädigten Fasern auch. Und Giulio Cossu schließt diese Zusammenfassung mit den Worten: „Diese Ergebnisse öffnen ein Fenster zu einer wirksamen Therapie der Duchenne-Muskeldystrophie!“

## Pharmakologische Wege.

**Utrophin ersetzt Dystrophin:** *Kay Davies* von der Universität Oxford ist eine der „Riesen“, die in den 1980er Jahren wie *Louis Kunkel* daran arbeitete, das Gen zu finden, das Duchenne-Muskeldystrophie verursacht, wenn es durch eine Mutation geschädigt ist. Die beiden waren damals und sind immer noch als freundliche Konkurrenten dabei, eine Behandlung zu finden. Sie tauschen Studenten aus, und – wie es unter Wissenschaftlern, die das gleiche Ziel haben, üblich ist – sie treffen sich häufig, sprechen über ihre Arbeit und ihre Ideen und Pläne und stimulieren dadurch ihre Forschungen. Das Forschungsfeld der Muskeldystrophie hat in den letzten Jahren bemerkenswerte Ergebnisse gebracht und bringt sie weiterhin, so daß es mehrere wirksame Behandlungen dieser schrecklichen Krankheit geben wird.

Es gibt vier große Herausforderungen, denen sich jeder stellen muß, der versucht, eine Therapie für die Duchenne-Dystrophie zu finden: (1) Dystrophin ist ein riesiges Protein, dessen Funktion wiederhergestellt werden muß; (2) damit die Muskelfunktion wiederkommt, müssen wenigstens 20% der normalen Menge neues Dystrophin entstehen, oder wenn nicht dieses Protein, dann ein anders wie Utrophin, das es ersetzen kann; (3) dies muß in allen Skelettmuskeln passieren, auch in denen der Lungen und des Herzens; und (4); eine Immunreaktion gegen das neue Protein muß vermieden werden.

Als Dr. Davies und ihre Kollegen versuchten, das Duchenne-Gen zu finden, fanden sie an seiner Stelle dieses andere Protein, *Utrophin*, und sein Gen, und sie begannen, mit einfachen chemischen Verbindungen zu arbeiten, um die normalerweise vorhandene geringe Menge dieses Proteins im Muskelgewebe *hochzuregulieren*, d.h., seine Menge zu vergrößern. Solche Substanzen können Nebeneffekte haben, doch weil sie kleine Moleküle sind und keine Proteine, bereiten sie keine Probleme mit einer Immunabwehr,

und es wird leicht sein, sie in die Blutzirkulation zu bringen, damit sie alle Muskeln erreichen.

Utrophin ist ein Protein mit einer Struktur und einer Funktion, die dem Dystrophin ähneln. Im Menschen liegt sein Gen auf dem Chromosom 6, es hat 75 Exons und ist ungefähr eine Million Basenpaare lang. Das Utrophin-Protein ist etwa um 7% kürzer als Dystrophin. Wie das Dystrophin verbindet es die F-Aktin-Struktur der Zellen mit einem Proteinkomplex in den Membranen, der auch so ähnlich aussieht, wie der Dystrophin-assoziierte Komplex. Utrophin findet sich in vielen Körpergeweben, auch in Muskeln, aber hier ist es auf die Regionen konzentriert, an denen die motorischen Nerven die Muskelmembranen kontaktieren, an den *motorischen Endplatten*.

Wenn Utrophin und Dystrophin so ähnlich sind, warum benutzt die Natur dann nicht Utrophin für das fehlende Dystrophin in Duchenne-Patienten? Es gibt Hinweise, daß die Natur dies tatsächlich versucht. In Duchenne-Patienten beginnt sich das Utrophin von den Nerv-Muskel-Verbindungen aus auf die Muskelmembranen auszudehnen. Je mehr Utrophin ein Patient hat, um so später muß er einen Rollstuhl benutzen. Dies ist ein Hinweis darauf, daß eine Hochregulierung von Utrophin die Duchenne-Dystrophie milder machen würde.

Während der Entwicklung in der 12. Schwangerschaftswoche enthalten die Muskeln sowohl Utrophin als auch Dystrophin. Danach verschwindet das Utrophin von den Zellmembranen und bleibt nur an den Endplatten, bei der Geburt haben die Muskelmembranen nur noch Dystrophin. Utrophin ist also die fötale Form des Dystrophins. Das bedeutet, daß man eine Duchenne-Therapie hätte, wenn es gelänge das Entwicklungsprogramm für Utrophin zu reaktivieren.

Mdx-Mäuse, deren Utrophin-Gen experimentell zerstört wurde, *knocked out*, die also weder Dystrophin noch Utro-

phin in ihren Muskeln besitzen, haben Duchenne-artige Symptome, sie sterben früh im Gegensatz zu „normalen“ mdx-Mäusen, deren Muskeln viel weniger geschädigt sind.

In anderen Experimenten mit transgenen mdx-Mäusen, die Utrophin-mini-Gene in ihren Keimzellen hatten, die mit einer Technik dort eingebaut wurden, die man nicht beim Menschen anwenden kann, wurde gezeigt, daß Utrophin, wenn es in größeren Mengen vorhanden ist, Dys-trophin ersetzen kann. Wenn die Menge von Utrophin um das Drei- bis Vierfache erhöht wurde, konnte die Entwicklung der Duchenne-Symptome verhindert werden, und dies führte zu einer vollständigen funktionellen Erholung.

Daher sollte man für eine mögliche Duchenne-Therapie versuchen, die geringe Menge Utrophin durch Hochregulieren seines Gens zu erhöhen. Das Gen ist in allen Einzelheiten bekannt, aber vor 20 Jahren brauchte man zwei Jahre, um es zu finden und zu charakterisieren, heute würde man dazu nur zwei Wochen brauchen. Das Gen hat zwei Startstellen, zwei Promoter-Sequenzen, an denen sich Signal-Verbindungen anlagern, um die Synthese des Utrophin-Proteins in Gang zu setzen. Der eine Promoter startet die A-Form des Utrophins in den Regionen der neuromuskulären Endplatten. Der andere Promoter startet die andere Form, das B-Utrophin in den Blutkapillaren.

Ein Teil der Promoter-Sequenz, die N-Box, enthält eine Reihe von sechs Nukleotiden, TTCCGG, die dafür verantwortlich sind, daß das A-Utrophin auf die Muskel-Nerv-Verbindungen beschränkt bleibt. Die Forscher versuchen jetzt, diesen Signalprozeß so zu beeinflussen, daß mehr A-Utrophin entsteht, das dann zu den Muskelzellmembranen der Duchenne-Jungen geleitet wird, wo es hoffentlich die vom Dystrophin verlassenen Stellen einnimmt.

Selbst bevor alle diese molekularen Einzelheiten der Utrophin-Biologie aufgeklärt waren, begannen schon die Bemühungen, eine Substanz zu finden, die Utrophin hochregulieren und zu den Membranen schicken kann. Dies ließ sich aber nicht in einem Universitätslaboratorium durchführen. Deswegen suchte Kay Davies eine pharmazeutische Firma, die an einer solchen schwierigen und teuren Aufgabe interessiert wäre. Und als sie keine Firma fand, gründete sie selbst eine: **VASTox plc**. In Abington bei Oxford.

**Jon Tinsley** von dieser Firma berichtete in seinem eigenen Vortrag dann, wieviel schon getan wurde, um ein potentiell Utrophin-Medikament zu finden: Bis jetzt sind 13.000 chemische Substanzen auf ihre Fähigkeit getestet worden, ob sie die Aktivität des Utrophin-Gens in mdx-Mäusen hochregulieren können.

Das Licht-erzeugende Enzym Luziferase aus Glühwürmchen wurde dazu in einem Reagenziensystem verwendet, mit dem sich die Menge des Utrophin-Proteins messen läßt. Mehr als 100 aussichtsreiche Substanzen wurden gefunden, mit denen sich die niedrige Utrophin-Konzentration drei- bis vierfach erhöhen ließ. Diese Substanzen werden jetzt optimiert und in Muskelzellkulturen und lebenden mdx-Mäusen getestet mit dem Ziel, ihre Wirkung weiter zu vergrößern und sicherzustellen, daß das Utrophin in allen Muskeln der Tiere genügend hochreguliert wird.

Eine der aktivsten Substanzen, VOX185, ist schon systemisch durch Injektion in den Unterleib von Mäusen getestet worden. Sie reagiert nur mit dem Promoter für das A-Utrophin, das in den Muskeln vorkommt. Das A-Utrophin in allen Skelettmuskeln der Mäuse, die getestet wur-

den, konnte zwei- bis dreifach hochreguliert werden, aber es ist noch nicht bekannt, ob auch das Utrophin in den Herzmuskeln hochreguliert wird. Zwölf Wochen nach wöchentlichen Injektionen hatten sich die Muskelfunktionen der Tiere wesentlich verbessert.

VOX185 und andere aktive Substanzen werden jetzt durch chemische Modifikationen weiter optimiert. Klinische Versuche mit Duchenne-Patienten werden jetzt vorbereitet und könnten 2008 beginnen.

**Steroid-Therapie, internationale klinische Studie:** In ihrem zweiten Vortrag diskutierte **Kate Bushby** die Anwendung von Steroiden bei der Duchenne-Muskeldystrophie und die geplante klinische Studie mit Prednisolon.

Seit etwa 20 Jahren weiß man, daß die Corticosteroide *Prednison*, das sehr ähnliche *Prednisolon* und die neuere Form *Deflazacort* positive Effekte in Duchenne-Jungen haben. (1) Die tägliche Gabe dieser Medikamente verlängert die Gehfähigkeit der Jungen um mehrere Jahre bis etwa ins mittlere Teenage-Alter; (2) sie erhöhen die Energie und die Kraft und verbessern auch die Funktion der Patienten deutlich, so daß sie sich besser an sozialen Aktivitäten beteiligen können; (3) sie reduzieren die Notwendigkeit einer chirurgischen Korrektur von Skoliosen, Rückgratverkrümmungen; (4) sie erhalten signifikant die Vitalkapazität, also die Lungenfunktion; (5) sie scheinen eine positive Wirkung auf das Herz zu haben; und (6), am wichtigsten, sie zeigen die besten Resultate in den jüngeren Patienten.

Die Dosis beträgt im allgemeinen 0,75 mg/kg/Tag für Prednison und Prednisolon und 0,9 mg/kg/Tag für Deflazacort. Jedoch können diese Medikamente Nebenwirkungen haben: (1) Gewichtszunahme, weil die Jungen hungrig davon werden; (2) ein Cushing-Aussehen, ein rundes Gesicht; (3) Osteoporose, geschwächte Knochen mit einem vergrößerten Risiko für Knochenbrüche; (4) Katarakte, eine leichte Trübung der Augenlinse besonders mit Deflazacort; und (5), ein verlangsamtes Größenwachstum, sie bleiben daher kleiner.

Obleich der hauptsächlichste medizinische Effekt der Corticosteroide eine Entzündungshemmung ist und auch das Immunsystem beeinflußt wird, scheint beides nicht die Erklärung dafür zu sein, warum Prednison, Prednisolon und Deflazacort die positive Wirkung der Kraftverbesserung bei den meisten Jungen mit Duchenne-Muskeldystrophie zeigt. Und weil die Nebeneffekte viele Familien davon abhalten, diese Medikamente zu verwenden, gibt es in den Behandlungszentren weltweit mindestens 15 verschiedene Methoden sie anzuwenden, die alle angeblich die Nebeneffekte herabsetzen sollen. Dr. Bushby arbeitet auf diesem Gebiet seit 17 Jahren, und sie muß sagen, daß die Situation immer noch „chaotisch“ ist. Deswegen schlagen sie und ihre Kollegen vor, eine internationale Studie durchzuführen, die ein für allemal eine optimierte Behandlungsmethode in allen Einzelheiten ausarbeitet.

Aus diesem Grund haben in Großbritannien 19 Zentren das *North Star Project* ins Leben gerufen, mit dem man eine Übereinkunft über die Anwendung dieser Medikamente erreichen möchte unter Berücksichtigung der bereits jahrelangen Erfahrungen mit der Langzeitbehandlung und ihren positiven und negativen Effekten von Prednison und den anderen Corticosteroiden auf die Erhaltung der Muskeln von Duchenne-Patienten. Die Ergebnisse dieser Zusammenarbeit wird dann die grundlegenden Daten liefern

für die geplante internationale Studie, die schon einen Namen hat: FOR-DMD.

Mehr als 50 Zentren in 12 Ländern werden diese Studie in den nächsten Jahren mit mindestens 300 Duchenne-Jungen durchführen unter der Aufsicht der *FOR-DMD Trial Managing Group*, des Studien-Steuerungskomitees, das aus vielen international bekannten Wissenschaftlern und Klinikern besteht.

Die wichtigsten Ziele dieser Studie werden sein: (1) Vergleich der täglichen Gabe von Prednison/Prednisolon mit der täglichen Gabe von Deflazacort und mit der intermittierenden Behandlung mit Prednison/ Prednisolon, also z.B. 10 Tage mit und 10 Tage ohne Medikament. Dabei wird angenommen, daß die tägliche Behandlung über längere Zeit positiver sein wird für die Atmung, die Zeit zum Aufstehen vom Boden, und das Wohlbefinden des Patienten; (2) die Bestimmung der Toleranz der verschiedenen Methoden und ihrer Nebeneffekte, und (3), Beginn von zusätzlichen Untersuchungen von Proteinen und Polymorphismen, um herauszufinden, warum die Steroide überhaupt wirken.

Die amerikanische Gesundheitsbehörde, National Institutes of Health, NIH, wird diese internationale Studie wahrscheinlich finanzieren. Das Studien-Steuerungskomitee wird die vollständigen Anträge 2007 nach einem geplanten Treffen in Holland stellen.

Trotz ihrer Nebenwirkungen haben die Steroide immer noch eine wichtige Rolle zu spielen für die Duchenne-Patienten. Obgleich die sich nähernden genetischen Therapien in der nicht zu fernen Zukunft zur Verfügung stehen werden, wird eine optimierte Steroidbehandlung der „Goldstandard“ sein, mit dem andere Behandlungen zu vergleichen sind. Und weil die genetischen Medikamente teuer sein werden und die Entwicklungsländer sie sich wahrscheinlich nicht leisten können, müssen die wesentlich billigeren Steroid-Medikamente dort noch viele Jahre lang angewendet werden.

*Kate Bushby* beendete ihren Vortrag mit den Worten: „Die meisten Kinder, die mit Prednison behandelt wurden, haben ganz allgemein von diesen Medikamenten profitiert. Der durchschnittliche Verlauf der Krankheit, ihre *natural history*, hat sich seit der weitverbreiteten Anwendung der Corticosteroide deutlich verändert. Zusammen mit den ausgearbeiteten Methoden der Orthopäden und der Herz- und Lungenspezialisten wird die Behandlung mit Steroiden gemäß der bald endgültigen und optimierten Empfehlungen nach sorgfältiger Abwägung der Nebenwirkungen weiterhin das Leben der Duchenne-Jungen sehr positiv verändern.“

#### **Durchlesen durch vorzeitige Stoppcodons mit PTC124:**

*Richard Finkel* vom Kinderhospital in Philadelphia, ein leitender Wissenschaftler der PTC124-Entwicklung, teilte vorläufige Ergebnisse der Phase-IIa-Studie mit. Damit aktualisierte er die Informationen, die drei Monate früher *Langdon Miller*, der Leiter der medizinischen Forschung der Firma **PTC Therapeutics** in South Plainfield NJ beim Parent-Project-Treffen in Cincinnati mitgeteilt hatte.

Etwa 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 Dystro-

phin, fertig ist. Diese Mutationen heißen Nonsense-Mutationen, weil nach ihnen die Proteinsynthese nicht weitergeht. Sie werden auch Stoppmutationen genannt oder vorzeitige Stoppcodons.

PTC124 ist ein orales Medikament, das also durch den Mund verabfolgt wird, es ist ein weißes kristallines Pulver, das mit Wasser, Milch oder Saft zu einer Suspension aufgeschwemmt werden kann. Es ist chemisch so synthetisiert worden, daß es die Nonsense-Mutationen umgehen kann. Es wurde in einem Medikamenten-Suchprogramm von PTC Therapeutics entwickelt. Es handelt sich dabei um ein vollständig neues Medikament, das Erste seiner Art, und ist deshalb nicht zu vergleichen mit allen anderen Medikamenten. Es hilft den Zellvorgängen, eine der genetischen Ursachen der Duchenne-Dystrophie zu umgehen, aber es ist nicht Teil einer Gentherapie und es veranlaßt auch kein Exon-Skipping. Obgleich das Antibiotikum Gentamicin ähnlich wirkt, ist PTC124 nicht mit Gentamicin verwandt, und es ist auch kein Antibiotikum. PTC124 ist noch nicht im Handel, denn es wird mit klinischen Studien noch weiterentwickelt.

Weil PTC124 Nonsense-Mutationen in der mRNA umgeht und nicht im Gen selbst, kann man damit auch andere Erbkrankheiten behandeln, die von Nonsense-Mutationen verursacht werden, darunter die Mukoviszidose, für die PTC Therapeutics bereits eine Phase-II klinische Studie durchführt.

Nur die 15% der Duchenne-Jungen, deren Krankheit von einer Nonsense-Mutation verursacht wird, werden mit PTC124 behandelt werden können. Deshalb ist es notwendig, die genaue Mutation eines Duchenne-Jungen zu kennen, um festzustellen, ob er überhaupt eine Nonsense-Mutation hat. Nur wenn das zutrifft, könnte PTC124 ein Medikament für ihn sein.

Um sicherzustellen, daß PTC124 ein Duchenne-Medikament sein kann, wurden präklinische Experimente an Zellkulturen und mit mdx-Mäusen durchgeführt. Nach der oralen Gabe an lebende Tiere erschien Dystrophin normaler Länge in ihren Muskelfasern, die danach wesentlich widerstandsfähiger wurden gegen erzwungene Verlängerungen der Muskeln. In Experimenten mit Ratten und Hunden wurde kein Durchlesen durch *normale* Stoppcodons beobachtet. Toxizitätsstudien mit hohen Dosen des Medikamentes an Ratten und Hunden führten im allgemeinen zu keinen ernsten oder akuten Nebenwirkungen. Diese Daten zeigen, daß es gerechtfertigt war, mit klinischen Studien an Duchenne-Patienten zu beginnen.

Bei der ersten klinischen Erprobung von PTC124 wurden zwei Phase-I Studien durchgeführt mit 61 gesunden 18 bis 30 Jahre alten Freiwilligen. Diese Studien zeigten, daß das Medikament sicher ist und wenige Nebenwirkungen verursacht. Dosierungen bis zu 100 mg/kg/Tag wurden von diesen gesunden Erwachsenen gut vertragen, dies ist eine größere Dosis als sie Duchenne-Patienten bekommen würden. Dieses Ergebnis erlaubte es, mit einer Phase-IIa-Studie zu beginnen.

Der erste Teil dieser Phase-IIa klinischen Studie mit 26 fünf bis 13 Jahre alten Duchenne-Patienten ist jetzt abgeschlossen. Sechs Jungen erhielten eine Dosis von 16 mg/kg/Tag und 20 Jungen 40 mg/kg/Tag des Medikamentes in drei Portionen pro Tag. Sie hatten verschiedene Stoppmutationen: 19 hatten das Stoppcodon UGA, 5 UAG und 2 UAA, die auf die Exons 6 bis 70 verteilt waren.

Die Patienten wurden bis zu 21 Tagen vor der Behand-

lung klinisch getestet, dann erhielten sie 28 Tage lang täglich das Medikament, und schließlich wurden sie nach weiteren 28 Tagen abschließend intensiv untersucht. Muskelbiopsien wurden vor und nach der Behandlung am Fußmuskel *Extensor digitorum brevis*, EDB, durchgeführt, um auf die teilweise Wiederherstellung der Produktion von Dystrophin normaler Länge zu testen. Andere chemische und Funktionstests wurden ebenfalls vorgenommen, um den therapeutischen Effekt zu messen und die Sicherheit zu überprüfen.

Noch sehr vorläufige Daten zeigten, daß in Zellkulturen mit Muskelzellen aus dem ersten Biopsiematerial Dystrophin normaler Länge nachgewiesen werden konnte, nachdem diese Kulturen direkt mit PTC124 versetzt wurden. Die Muskelbiopsien, die nach der 28tägigen Behandlung mit dem Medikament erhalten wurden zeigten eine wenig sichtbare Erhöhung des Dystrophins in einigen der Jungen. Wie bereits bei der Phase-I Studie, zeigten sich auch bei dieser Studie keine ernstesten Nebenwirkungen.

Aber die Menge des neuen Dystrophins war noch zu niedrig für eine genügende und zuverlässige therapeutische Wirkung. Jedoch einige Eltern und Lehrer berichteten, daß die Jungen nach der Behandlung mehr Ausdauer hatten, und aktiver und weniger müde waren als vorher. Dies sind keine richtigen wissenschaftliche Ergebnisse, sie müssen deshalb im Detail überprüft werden.

Eine der Gründe, warum nicht in allen Jungen neues Dystrophin gefunden wurde, könnte sein, daß die PTC124-Konzentration im Blut unterhalb des angestrebten Konzentrationsbereiches von 2 bis 10 Mikrogramm/ml Plasma war, möglicherweise verursacht durch den im Vergleich mit Erwachsenen schnelleren Abbau des Medikamentes in Kindern. Eine längere Behandlung könnte auch notwendig sein, um eine bessere Dystrophin-Produktion zu erhalten. Deshalb wurde die Phase-IIa-Studie modifiziert, indem 12 weitere Duchenne-Jungen aufgenommen wurden, die 80 mg/kg/Tag PTC124 über 28 Tage erhalten werden, damit eine Blutkonzentration von mindestens 2 bis 10 Mikrogramm/ml Plasma erreicht wird.

Die abschließenden Daten werden im Jahr 2007 mitgeteilt werden. PTC Therapeutics plant, längere Studien über drei bis sechs Monate Ende 2007 zu beginnen.

**Hochregulieren von IGF-1:** *Nadia Rosenthal* vom europäischen Laboratorium für Molekularbiologie in Monterotondo bei Rom beschrieb den Einfluß des natürlichen Wachstumsfaktors IGF-1 auf Muskeln und die Rolle, die er als therapeutisches Mittel gegen Duchenne-Muskeldystrophie spielen könnte.

IGF-1, Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor, ist ein Protein aus etwa 70 Aminosäuren in einer Kette mit drei stabilisierenden Brücken, es hat deswegen eine ähnliche Form wie Insulin. Es existiert in mehreren Formen mit etwas verschiedenen Strukturen. Die Wirkungen einiger dieser verschiedenen Formen hängt davon ab, wo sie im Körper produziert werden. Eine dieser sog. Isoformen, mIGF-1, die das Wachstum von Muskelzellen stimuliert, könnte als mögliches therapeutisches Mittel für Duchenne-Kinder in Frage kommen.

mIGF-1 stimuliert sehr gut die Regeneration von Muskeln und unterstützt die Bildung von funktionierenden Muskeln, weil es die Synthese von neuem Protein aktiviert. Eine begrenzte Verletzung eines Muskeln führt zu einer plötzlichen Anstieg der Produktion von mIGF-1,

deshalb könnte es für eine Kombination mit anderem möglichen Duchenne-Therapien geeignet sein. Es könnte die Muskeln in gutem Zustand halten, während die genetische Ursache durch eine genetische Technik behoben wird.

Um die Frage zu beantworten, was passieren würde, wenn die Menge des mIGF-1 in den Muskeln über die normale Menge hinaus vergrößert wird, wurden transgene *normale* Mäuse gezüchtet, die keine Dystrophie hatten, aber zusätzliche IGF-1-Gene in den Kernen ihrer Muskelzellen. Diese *nicht-dystrophischen* Mäuse mit einer hohen Konzentration von mIGF-1 zeigten nach 14 Monaten eine starke Muskelhypertrophie, also vergrößerte Fasern. Andere Effekte waren: die Tiere hatten weniger Fett, ihre Muskelmasse und Muskelkraft war auch im Alter besser erhalten, und Verletzungen ihrer Muskeln heilten schneller. Das zusätzliche mIGF-1 verursachte keine Herzprobleme, begünstigte nicht die Entwicklung von Krebs und zeigte keine pathologischen Nebenwirkungen. *Dystrophische mdx-Mäuse*, die nach transgener Manipulation auch zusätzliche IGF-1-Gene enthielten, hatten weniger Entzündungen und Fibrose und eine stark verzögerte Muskeldegeneration. Das heißt, mIGF-1 verbessert die Zellsysteme für eine wirksamere Muskelregeneration.

Die Frage war jetzt, ob die eine oder die andere Isoform von IGF-1 besser wirksam ist als mIGF-1. Die Proteinkodierende Sequenz des IGF-1-Gens ist relativ klein, seine wenigen Exons werden auf dem Weg zur mRNA durch alternatives Spleißen verschieden angeordnet, so daß verschiedene Verlängerungspeptide, *extension peptides* E, entstehen. Die Isoform mIGF-1 enthält die EA-Variante dieses Peptids – ein Peptid ist ein kurzes Stück Protein –, so daß sie vor allem in Skelett- und Herzmuskeln aktiv ist. EA bedeutet, daß diese Form ein Verlängerungs- oder Signalpeptid hat, das ungefähr 35 Aminosäuren lang ist.

Ein Student in Dr. Rosenthals Team arbeitete drei Jahre lang, um transgene Tiere zu züchten, die jeweils eine der vier wichtigeren Isoformen von IGF-1 enthielten. Nur die Isoformen, die mit dem zusätzlichen EA-Peptid vergrößerte die Muskelmasse, erhöhte die Kraft und unterstützte die Regeneration. Experimente mit IGF-1-Isoformen, die andere E-Peptide enthielten, zeigten, daß sie nur die Regeneration fördern konnten. Das bedeutet, daß man nicht die Muskelmasse vergrößern muß, um die Regeneration zu verbessern und aufrechtzuerhalten. E-Peptide sind sehr wichtig für eine Muskelregeneration, die vom IGF-1 verursacht werden kann. Ein künstlich hergestelltes IGF-1 ohne ein E-Peptid hatte keine positive Wirkung auf Muskeln.

Das System, das die Muskeln reguliert und an dem das IGF-1 beteiligt ist, ist also viel komplizierter als man zunächst annahm. Möglicherweise gibt es noch sog. *Bindeproteine* an der Außenseite der Muskelzellmembranen, die das mIGF-1 stabilisieren. Wenn das EA-Peptid vorhanden ist, begünstigt das mIGF-1 das Wachstum der Muskeln und ihre Regeneration. Wenn das EA-Peptid fehlt, gibt es weiterhin die Regeneration, aber die Muskelmasse vergrößert sich nicht. Die Einzelheiten dieses Prozesses sind noch nicht vollständig verstanden. Doch die Kenntnis des genauen Wirkungsmechanismus ist äußerst wichtig bevor IGF-1 ein therapeutisches Medikament für Kinder mit Duchenne-Dystrophie werden kann.

Doch ein solches Medikament wird immer nur eine Zusatztherapie sein können, weil es nicht die genetische Ursache der Krankheit behebt. Wahrscheinlich wird man eine

Therapie mit einem Wachstumsfaktor wie IGF-1 mit Stammzellen kombinieren müssen oder mit AONs, Myostatin-Hemmstoffen oder anderen kleinen Molekülen. Wenn man mIGF-1 im Laboratorium synthetisieren könnte, das ein stabiles EA-Peptid enthält, würde das zu einer geeigneten Therapie führen können. Im Idealfall wäre es vielleicht möglich, diese wirksamste Form des IGF-1 in die Muskeln zu bringen, ohne sein Gen einbringen zu müssen, d.h., ohne Gentechnik. Die gereinigte Verbindung ohne das EA-Peptid in die Blutzirkulation zu injizieren oder direkt in die Muskeln, oder eine der undefinierten Mischungen der verschiedenen Formen zu essen, wie sie im Internet angeboten werden, wird wirkungslos oder sogar gefährlich sein.

Ein Interview mit *Nadia Rosenthal* über die Hoffnung, die die Eltern nicht verlieren sollen, während sie auf eine genetische Therapie warten, steht in meinem Bericht über das Treffen in Monaco im Januar 2005 auf meinen Internetseiten: [www.duchenne-forschung.de](http://www.duchenne-forschung.de).

**Hemmung von Myostatin:** Diese Zusammenfassung beginnt mit einer Einführung in das bisherige Wissen über die Natur und die Wirkung von Myostatin – wie in meinen früheren Berichten beschrieben – und enthält dann das, was, die *Ian Graham* von *George Dicksons* Laboratorium im Centre for Biomedical Sciences, Royal Holloway, der Universität von London über seine neuen Arbeiten vortragen hat.

*Myostatin* wird in Muskeln und anderen Organen gebildet, und zirkuliert im Blut als inaktives Protein, das aus 375 Aminosäuren besteht. Um biologisch aktiv zu werden, werden die ersten 266 Aminosäuren, das *Propeptid*, abgespalten. Daraufhin lagern sich zwei Ketten des Restproteins von jeweils 109 Aminosäuren zu einem Doppelring zusammen. Das abgespaltene Propeptid bleibt lose mit dem Doppelring verbunden und deaktiviert ihn dadurch weiterhin. Das Propeptid wird entfernt und schnell abgebaut, wenn sich der Proteinkomplex an sein Rezeptormolekül *Aktivin* an der Außenseite der Muskelzellmembran anlagert. Dieser *Myostatin-Aktivin-Komplex* veranlaßt eine Reihe von chemischen Reaktionen auf der anderen Seite der Membran, also innerhalb der Zelle, eine *Signalkaskade*, die schließlich die genetische Regulation unterbricht, die normalerweise zur Neubildung von Muskelproteinen führt. Dieser Prozeß begrenzt deshalb das Muskelwachstum. 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, sie sind hypertrophiert. 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 8 Jahre alter Junge gefunden, dessen Skelettmuskeln etwa doppelt so groß wie in einem normalen Kind sind. Weil eine Mutation in seiner Familie den normalen Spleißvorgang der drei Myostatin-Exons geändert hatte, hat der Junge sehr wenig Myostatin in seinen Muskeln. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, daß eine Hemmung des Myostatins zu einem verstärkten Muskelwachstum

auch in Duchenne-Jungen führen würde.

Die Firma **Wyeth Research** in Collegeville bei Philadelphia hat einen Antikörper gegen Myostatin entwickelt, MYO-029, mit dem sich in Tierversuchen die Muskelmasse deutlich vergrößern ließ. In Menschen verursacht der Antikörper keine Immunreaktionen, weil er eine „menschliche“ Struktur besitzt, er ist „humanisiert“. Er kann in die Blutbahn oder unter die Haut injiziert werden.

In Zusammenarbeit mit *Kathryn Wagner* in Baltimore und *Lee Sweeney* in Philadelphia, hat Wyeth jetzt dieses potentielle Antikörper-Medikament in einer Phase-I/II-Studie an 108 erwachsenen muskelkranken Patienten getestet, unter ihnen waren einige Becker-Patienten. Die Studie ist jetzt abgeschlossen. Ihre Ergebnisse, die positiv sein sollen, werden im Frühjahr 2007 veröffentlicht werden.

*George Dickson* und seine Kollegen haben jetzt zusammen mit Wyeth neue Experimente zur Hemmung von Myostatin begonnen. Wenn das Propeptid freigesetzt wird, nachdem sich der aktive Teil des Myostatins an den Rezeptor gebunden hat, dann ist seine Kette aus 266 Aminosäuren instabil, sie wird im Blutstrom mit einer Halbwertszeit von nur zwei Stunden abgebaut. Die Wissenschaftler schlugen dann vor, das Gen für das Propeptid in die Muskeln zu transferieren mit dem Ziel, die Konzentration dieses natürlichen Hemmstoffs des Myostatins dauernd auf hohem Niveau zu halten. Sie versuchten dies mit normalen Mäusen und fanden, daß der beste Vektor für diesen Gentransfer der Typ 8 des adeno-assoziierten Virus, AAV8, war, der die nicht-teilenden Muskelzellen infizieren kann.

Nach der lokalen Injektion dieser Vektorkonstruktion in den Tibialis-anterior Muskel dieser nicht-dystrophischen Mäuse zeigten sie nach vier Wochen eine Vergrößerung der Muskelmasse um 30%, die nach 10 Wochen auf 40% anstieg. Die systemische Injektion in die Blutzirkulation dieser normalen Mäuse erhöhte die Muskelmasse um 25% und diese Erhöhung war nach 10 Wochen noch vorhanden. Die Muskelkraft war auch verbessert, selbst die der langsamen Muskelfasern. Falls diese Resultate auch in Duchenne-Jungen erhalten werden könnten, würde diese Methode sie länger vor dem Rollstuhl bewahren.

Es waren nur vorläufige Experimente mit normalen Mäusen, die diese Ergebnisse zeigten. Sie müssen jetzt mit mdx-Mäusen wiederholt werden. Klinische Studien mit Patienten könnten folgen, wenn die Ergebnisse mit Mäusen und anderen Tieren weiterhin positiv sein sollten. Eine Myostatin-Therapie würde jedoch die genetische Ursache der Krankheit nicht beeinflussen, aber sie könnte wahrscheinlich in Verbindung mit genetischen Behandlungen wie Dystrophin-Gentransfer und Exon-Skipping deren therapeutische Wirkung verstärken.

**Klinische Studie mit SNT-MC17/Idebenone:** *Thomas Meier*, wissenschaftlicher Direktor der Firma **Santhera Pharmaceuticals** in Liestal bei Basel, konnte nicht am Treffen in London teilnehmen. Er schickte die folgende Zusammenfassung seines geplanten Vortrags:

SNT-MC17 ist eine Substanz, die Mitochondrien schützt, die „Kraftwerke“ der Zellen, in denen der universelle biologische Energieträger Adenosintriphosphat, ATP, durch oxidative Phosphorylierung erzeugt wird. Mit dieser Verbindung, die auch *Idebenone* genannt wird, wurde vor kurzem eine klinische Studie in den Vereinigten Staaten in Zusammenarbeit mit der Gesundheitsbehörde NIH mit Erfolg abgeschlossen, in der ihre Wirksamkeit gegen die

neurologischen Symptome der Friedreich-Ataxie bewiesen wurden, einer anderen seltenen neuromuskulären Krankheit, die oft mit einer Kardiomyopathie, einer ernsten Erkrankung des Herzmuskels, verbunden ist. Eine Phase-III klinische Studie gegen Friedreich-Ataxie wird jetzt in Europa durchgeführt.

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, verglichen mit 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 etwa im zweiten Halbjahr 2007 zur Verfügung stehen.

**Klinische Studie mit Prednison und Cyclosporin:** Unter der Leitung von *Rudolf Korinthenberg* an der Kinderklinik der Universität Freiburg, der nicht in London war, wird eine klinische Studie mit Prednison und Cyclosporin in Deutschland durchgeführt.

Im Moment sind die beiden Kortisonpräparate Prednison und Deflazacort die einzigen Medikamente, die für die Jungen mit Duchenne-Dystrophie eine spürbare Besserung bringen. Die Prednisonbehandlung hat aber Nebenwirkungen. Deswegen haben einige Kliniker in einer Reihe von deutschen Muskelzentren entschieden, die gesamte Prednisondosis zu reduzieren, indem man zwar die normale Dosis gibt, aber nicht kontinuierlich, sondern nur 10 Tage hintereinander und dann 10 Tage aussetzt, um auf diese Weise die Wirkung zu erhalten, aber wenigstens einige der Nebenwirkungen vermeidet.

Es zeigte sich aber, daß die Wirkung etwas geringer ist, als wenn man Prednison durchgehend täglich gibt. Um diese Situation zu verbessern, wurde vorgeschlagen, die Prednisonbehandlung mit Cyclosporin zu kombinieren. Cyclosporin ist ein Medikament, das die Immunreaktionen herabsetzt. Es hat einen anderen Wirkungsmechanismus als Kortison. Es hat auch Nebenwirkungen, aber sie sind in der Langzeitbehandlung etwas günstiger als mit Prednison.

Die Studie mit diesen beiden Medikamenten begann in Deutschland Anfang 2004, in der eine Hälfte der Patienten

3,5 bis 4 mg/kg/Tag Cyclosporin kombiniert mit 0,75 mg/kg/Tag Prednison und die andere Hälfte die gleiche Dosis Prednison allein bekommt. Jeder der Patienten nimmt 15 Monate lang an der Studie teil. Zur Zeit, im Januar 2007, werden 150 Patienten behandelt oder sie haben ihre Behandlung schon abgeschlossen. Einige weitere Patienten werden noch im Februar aufgenommen. Mindestens 150 Patienten waren notwendig, um die Studie korrekt auswerten zu können. Sie wird dann in das Jahr 2008 weiterlaufen, so daß erst danach die Ergebnisse zur Verfügung stehen werden.

Erfahrungen über die kombinierte Wirkung von Cyclosporin und Prednison können noch nicht mitgeteilt werden, weil die Studie doppelblind ist, d.h., weder die Patienten noch die Ärzte wissen, ob neben dem Prednison ein bestimmtes Kind auch Cyclosporin bekommen hat oder ein Placebo, also eine neutrale Substanz. Was jetzt schon gesagt werden kann, ist, daß die Studie gut durchführbar ist und daß es keine gravierenden Nebenwirkungen gegeben hat. Von den 150 Patienten sind bisher nur zwei aus der Studie ausgeschieden, einer, weil er schon recht bald die Gehfähigkeit verloren hat, und der andere, weil bei ihm eine Zuckerkrankheit ausbrach, die vorher nicht entdeckt worden war.

**Oxidativer Streß und Duchenne-Dystrophie:** *Joe McCord* von der Universität von Colorado und der Firma **LifeVantage Corp.** in Denver sprach über einen neuen Weg, den *oxidativen Streß* therapeutisch zu kontrollieren. Der oxidative Streß ist an den Ursachen von mehr als 100 Krankheiten beteiligt, darunter ist auch die Duchenne-Muskeldystrophie.

Jede Zelle, auch jede Muskelzelle, enthält viele Mitochondrien. Dies sind ovale Strukturen, die etwa 0,002 mm lang sind und einen Durchmesser von 0,0005 mm haben, d.h., sie sind etwa so groß wie ein Bakterium. Sie sind die „Kraftwerke“ der Zellen, weil sie die energiereiche Verbindung Adenosintriphosphat, ATP, durch den Prozeß der *oxidativen Phosphorylierung* bilden, durch die „Verbrennung“ von kohlenstoffhaltigen Substanzen unter Verbrauch von Sauerstoff. Die Endprodukte dieser Energieerzeugung sind Kohlendioxid und Wasser. Aber etwa 1-2% des verbrauchten Sauerstoffs wird nicht in Wasser verwandelt, sondern in freie *Superoxid-Radikale*. Solche freien Radikale haben eine ungerade Zahl von Elektronen, die sie besonders reaktionsfähig machen. Die Zelle verteidigt sich gegen diese giftigen Produkte mit zwei sehr aktiven Enzymen. Das eine ist die *Superoxid-Dismutase* SOD, die die Radikale in Wasserstoffperoxid umwandelt, das weniger reaktiv aber immer noch ein Oxidationsmittel ist. Das andere Enzym ist die *Katalase*, die aus Wasserstoffperoxid Wasser und Sauerstoff macht, die beide vollständig harmlos sind.

Wenn die Produktion der Superoxid-Radikale den normalen Anteil von 2% übersteigt, bekommen die Zellen oxidativen Streß, und das passiert jedesmal wenn die Zelle verletzt wird. Muskelzellen werden dystrophisch, wenn große Mengen von Kalzium-Ionen durch die Zellmembran hindurch in das Innere gelangen. Dadurch schwellen die Mitochondrien an und platzen mit der Konsequenz, daß mehr als normale Mengen von Superoxid-Radikale entstehen, mehr als die Zelle zerstören kann. Der Überschuß an Radikalen oxidiert dann Fette und Proteine, modifiziert Enzyme, schädigt DNA und kann selbst Krebs erzeugen.

Sie beschleunigen auch den Altersprozeß.

Der oxidative Streß kann aber auch von Entzündungen verursacht werden. Weiße Blutkörperchen sind die einzigen Zellen, die freie Radikale absichtlich produzieren, weil sie sie brauchen, um hereinkommende Bakterien und Viren zu töten und zu verdauen. Aber dieser Prozeß schädigt auch die Wirtszellen und veranlaßt die Muskelzellen, Proteine in den Blutkreislauf abzugeben wie z.B. die Creatinkinase CK. Entzündungen verändern auch Signalprozesse und können zu Apoptose führen, also zur Selbstzerstörung, zum „Selbstmord“, der Zellen. Oxidativer Streß löst auch Fibrose aus, die Bildung von Narbengewebe in Krankheiten mit chronischen Entzündungen, darunter ist auch die Duchenne-Muskeldystrophie, bei der elastisches Muskelgewebe durch unnachgiebiges Bindegewebe ersetzt wird.

Vor 20 Jahren schon wurde gefunden, daß die Menge des häufigsten Produkts des oxidativen Streß, nämlich peroxidierte Fette, in Duchenne-Jungen im Durchschnitt um 35% erhöht ist. Bis vor kurzem war es unmöglich, das oxidative Gleichgewicht wiederherzustellen. Aber jetzt, im Jahr 2006, konnten *Werner Böcker* und seine Kollegen in Deutschland zeigen, daß in Duchenne- und Becker-Patienten die Muskelfasern und Blutgefäße starken oxidativen Streß entwickeln durch eine Verringerung des biologisch aktiven Stickoxids, NO, das ein „gutes“ freies Radikal ist. Dieses gasförmige Hormon wird vom Enzym NO-Synthase, NOS, erzeugt. Es reguliert, unter anderem, die Elastizität der Blutgefäße, die für den Blutdruck wichtig ist. Das Enzym NOS ist im dystrophischen Muskelgewebe hochreguliert, um die Menge an NO zu normalisieren, aber das gelingt nicht wegen der Muskeldegeneration und auch, weil das NO mit den Superoxid-Radikalen reagiert. Das Produkt dieser Reaktion ist das Peroxinitrit-Ion, OONO<sup>-</sup>, ein weiteres Oxidationsmittel, das den oxidativen Streß noch intensiviert.

In früheren Laboratoriumsexperimenten, in denen man die Enzyme Superoxid-Dismutase und Katalase zu isolierten und durchströmten Herzen gab, wurde schon gezeigt, daß der oxidative Streß blockiert werden kann, wenn man den Überschuß an freien Radikalen zerstört und damit auch die Freisetzung von Creatinkinase vermeidet. In anderen Studien konnte nachgewiesen werden, daß man mit Superoxid-Dismutase die erhöhten Mengen des Proteinfaktors TGF-beta heruntersetzen kann, der Fibroblasten veranlaßt, Fibrose zu erzeugen.

Die Muskeln von Duchenne-Jungen funktionieren relativ gut bis sie ungefähr drei Jahre alt sind. Danach brems der oxidative Streß allmählich die normale Muskelregeneration. Seine Konsequenzen sind chronische Entzündungen, Fibrose und auch Intelligenzprobleme. Für eine Duchenne-Therapie wäre es wichtig, wenn diese Prozesse in diesem Alter oder früher unterbrochen werden könnten.

Also glaubte man, daß es einfach wäre, dies zu errei-

chen, indem man bekannte Antioxidationsmittel, wie die Vitamine A und E nimmt. Aber in vielen Studien ist gezeigt worden, daß große Mengen dieser Vitamine keine Wirkung auf den oxidativen Streß haben. Auch einfach 600 Gramm Früchte und Gemüse zu essen hatte keinen Effekt auf die oxidative Schädigung der DNA. Die „antioxidativen“ Vitamine sind aus anderen Gründen wichtig, aber sie reduzieren nicht den oxidativen Streß.

Eine andere Möglichkeit wäre es, die Menge der beiden Enzyme Superoxid-Dismutase und Katalase zu erhöhen, die, wie gesagt, den Überschuß an freien Radikalen zerstören können. Immerhin kann ein Molekül Vitamin C zwei Moleküle freie Radikale eliminieren aber nicht mehr. Jedoch ein Molekül Superoxid-Dismutase kann eine Million freie Radikale in jeder Sekunde eliminieren und diese Aktivität für lange Zeit aufrechterhalten.

Aus diesem Grund hat Dr. McCord zusammen mit der Firma LifeVantage eine Nahrungsergänzung entwickelt, die „adaptogene“ Substanzen aus fünf Pflanzenarten enthält, die die beiden antioxidierenden Enzyme wirksam hochregulieren, um den oxidativen Streß herabzusetzen, vor allem die Peroxidierung der Fette.

Dieses Mittel hat den Markennamen *Protandim*®, es enthält Extrakte aus den Pflanzen *Bacopa monnieri*, *Silbum marianum* oder Milchdiestel, *Withania somnifera* auch als Ashwagandha bekannt, *Curcuma longa*, die Gelbwurz, and *Camellia sinensis* oder grüner Tee. Die aktive Verbindung aus grünem Tee ist (-)-Epigallocatechingallat oder EGCG, das schon von *Urs Rüegg* in Genf als wirksam bei Duchenne-Muskeldystrophie beschrieben wurde.

Im Jahr 2006 wurde Protandim an 29 gesunden Personen im Alter von 20 bis 78 Jahren klinisch getestet. Mehrere Messungen wurden am Beginn der Studie durchgeführt, sowie 30 und 120 Tage nach der täglichen Gabe von Protandim, gemessen wurden auch die Aktivitäten der Superoxid-Dismutase und der Katalase. Die durchschnittlicher Erhöhung der Aktivität nach 120 Tagen betrug 30% für die Superoxid-Dismutase und 54% für die Katalase, und die Peroxidierung der Fette war deutlich gehemmt worden. Wichtig für den altersbedingten oxidativen Streß war die Tatsache, daß nach 30 Tagen Protandim die altersbedingte Erhöhung der Fett-Peroxidation praktisch verschwunden war, und die absolute Menge dieser modifizierten Fette war insgesamt um durchschnittlich 40% verringert worden.

Zusammengefaßt heißt das, daß die Duchenne-Muskeldystrophie zwar von einem spezifischen genetischen Defekt verursacht wird, aber daß es inzwischen viele Hinweise darauf gibt, daß oxidativer Streß im Krankheitsverlauf eine zunehmende Bedeutung für die Progression bekommt. Die neuen Entwicklungen zur wirksamen Behandlung des oxidativen Streß rechtfertigen es, klinische Studien mit Duchenne-Patienten in Erwägung zu ziehen.

## Diagnostik und Registrierung.

**Warum sollte man die Mutationen, die Veränderungen des Dystrophin-Gens bestimmen lassen? *Stephen Abbs*** ist Direktor des DNA Laboratoriums im Guy's Hospital in London. Die Frage im Titel seines Vortrags ist praktisch die gleiche, die auch von *Kevin Flanigan* beim Treffen in Cincinnati im Juli 2006 gestellt wurde. Deswegen ist ein Teil dieser Zusammenfassung ähnlich wie die über Dr.

Flanigans Vortrag in meinem Cincinnati-Bericht.

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. Dies ist das gleiche Prinzip wie

damals vor 20 Jahren, als Brüche im Chromosom und Deletionen in einer bestimmten Region des kurzen Arms des X-Chromosoms in Patienten mit Duchenne-Muskeldystrophie gefunden wurden aber nicht in muskelgesunden Menschen. Dies war ein Beweis, daß diese Veränderungen Muskeldystrophie verursachten, und dadurch war es *Louis Kunkel* und seinen Kollegen möglich, das Dystrophin-Gen zu finden und zu charakterisieren.

Das wird im Prinzip immer noch so gemacht, denn wenn man eine pathogene, eine Krankheit auslösende, Veränderung im Dystrophin-Gen findet, bestätigt dies die klinische Diagnose einer Duchenne- oder Becker-Muskeldystrophie. 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 seiner über die Mutter verwandten weiteren Familien, in denen Duchenne-Überträgerinnen gefunden werden können. Außerdem sind vorgeburtliche, pränatale, und Präimplantationsdiagnosen nur möglich, wenn bekannt ist, welches Gen für die Krankheit verantwortlich ist. Und um das zu bestätigen, muß man die genaue Mutation in der Familie kennen. Schließlich werden die zukünftigen Therapien, wie das Exon-Skipping oder das Durchlesen durch Stoppcodons, es erfordern, daß die spezifische Mutation im Dystrophin-Gen des Patienten bekannt ist.

Etwa 60% der Dystrophin-Mutationen sind Deletionen ganzer Exons, etwa 10% sind Duplikationen ganzer Exons, etwa 30% sind Punktmutationen, die 1 bis 4 Nukleotide betreffen, und etwa 1% sind Inversionen, komplexe Umlagerungen oder Mutationen weit im Innern von Introns.

Um Deletionen und Duplikationen ganzer Exons zu finden, 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.

Ich habe versucht, diese komplizierte Methode in einem Abschnitt zu beschreiben: 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", als Form oder Muster, 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.

Wenn mit der MLPA-Methode keine Mutation gefunden werden kann, hat der Patient wahrscheinlich eine Punktmutation, die nur ein oder wenige Nukleotide der etwa 2,2 Millionen Nukleotide des Gens geändert hat. Es gibt zwei allgemeine Wege, um diese Mutationen zu identifizieren. Der eine Weg ist, alle 79 Exons zu überprüfen, um zu sehen, ob es welche gibt, die sich anders als normale Exons verhalten. Dann müssen diese auffälligen Exons sequenziert werden, um bestimmen zu können, ob die Änderung ihrer Sequenz eine normale Variation des Gens ist, ein Polymorphismus, oder ob es die Mutation ist, die die Muskeldystrophie verursacht hat. Der andere Weg ist, von vornherein alle 79 Exons zu sequenzieren, dies ist aber der wesentlich teurere Weg.

Weil das Gen so groß ist, wurden mehrere Methoden für die Überprüfung, das „Scannen“, der Exons entwickelt. Dr. Abbs erwähnte 9 verschiedene Methoden. Eine davon ist die in seinem Laboratorium am meisten angewendete Methode, die von seiner Kollegin *Emma Ashton* ausgearbeitet wurde, sie heißt auf Englisch *fluorescent multiplex conformation sensitive capillary electrophoresis*, FM-CSCE. Eine ähnliche Methode wird in seinem Laboratorium jetzt von *Annabel Whibley* entwickelt, die *temperature gradient capillary electrophoresis*, TGCE. Die Instrumente für die Entwicklung der TGCE-Methode hat das britische Gesundheitsministerium finanziert, um die Einführung der genetischen Tests in Großbritannien zu beschleunigen.

Die FM-CSCE-Methode verwendet 12 Fluoreszenz-Multiplex-PCR-Ansätze, mit denen 84 DNA-Fragmente aus allen 79 Exons multipliziert werden. Die von der DNA des Patienten stammenden PCR-Produkte werden mit den entsprechenden PCR-Produkten aus der DNA einer gesunden Person vermischt. Dabei gibt es Duplexe, Zusammenlagerungen von zwei Partnern. Da die DNA des Patienten und die normale DNA zum größten Teil übereinstimmen, haben beide Partner der meisten Duplexe die gleiche Struktur, sie sind *Homoduplexe*. Wenn der Partner, der vom Patienten stammt, eine Punktmutation enthält, stimmen die Basensequenzen der beiden Partner nicht vollständig überein, der DNA-Duplex hat an dieser Stelle eine Ausbuchtung in der Doppelhelix. Er ist dann ein *Heteroduplex* und wandert in einem Elektrophorese-Experiment mit einer anderen Geschwindigkeit als der entsprechende Homoduplex. Diese verschiedenen Wanderungsgeschwindigkeiten erlauben es, Heteroduplexe zu identifizieren und zu isolieren. Und ein Exon von der DNA eines Patienten, das solch einen Heteroduplex liefert, kann dann sequenziert werden, um die Mutation zu finden, die den Heteroduplex verursacht hat. Diese Änderung der Sequenz, diese Mutation, muß dann darauf geprüft werden, ob sie die Ursache für die Muskeldystrophie ist oder nur eine normale Variation, ein Polymorphismus.

Wenn weder Deletionen noch Duplikationen und auch keine Punktmutation gefunden werden in einem Jungen mit typischen Duchenne-Symptomen, dann könnte er eine Mutation haben, die schwierig nachzuweisen ist, weil es

eine komplexe Umlagerung, eine Inversion, oder vielleicht auch eine Mutation in einem der Introns des Gens gegeben hat. Diese Mutationstypen, die in etwa 1% der Duchenne-Patienten vorkommen, werden im allgemeinen nicht in der DNA entdeckt, sondern sie müssen in der mRNA gesucht werden.

Um diese seltenen Mutationen im Dystrophin-Gen zu finden, muß seine mRNA aus Biopsie-Material isoliert und untersucht werden. Steve Abbs erwähnte ein Beispiel, wo ein neues Exon mit 71 Nukleotiden zwischen die normalen Exons 44 und 45 eingefügt wurde, weil das Gen eine Punktmutation weit innerhalb des Introns 44 hatte, das mit 250.000 Nukleotiden eines der längsten Introns des Dystrophin-Gens ist. Diese Mutation war ungefähr 9.000 Nukleotide vom Exon 45 entfernt aufgetreten, und weil die üblichen Mutations-Nachweismethoden in der DNA nur etwa 50 Nukleotide der Introns an den Grenzen zu den Exons überprüfen können, hat die FM-CSCE-Methode diese ungewöhnliche Mutation des Gens nicht entdeckt.

Dr. Abbs diskutierte auch eine neue, in seinem Laboratorium entwickelte Methode zur genetischen Analyse von durch künstliche Befruchtung erzeugten Embryos. Diese Methode der *Präimplantations-Gendiagnose*, englisch abgekürzt PGD, wird *preimplantation genetic haplotyping*, PGH, genannt. Diese Methode ist in Großbritannien von der *Human Fertilization and Embryology Authority*, HFEA, genehmigt worden.

Bei dieser PGH-Methode zur Präimplantationsdiagnose wird eine einzelne Zelle aus einem Embryo entnommen, der erst aus 8 Zellen besteht, und diese isolierte Zelle wird auf mehrere kurze polymorphe Markierungssequenzen im Dystrophin-Gen getestet, um festzustellen, welche elterliche Chromosomen sie geerbt hat. Dies ist eine Methode, die bei allen geeigneten Familien angewendet werden kann, ohne daß man die genaue Mutation kennen und nachweisen muß. Dr. Abbs erwähnte als ein Beispiel, die Analyse von acht Embryonen, deren Mutter eine Deletion der Dystrophin-Exons 12 bis 16 hatte. Der PGH-Test zeigte, daß sieben Embryonen, drei männliche und vier weibliche, das X-Chromosom mit dem normalen Dystrophin-Gen der Mutter geerbt hatten, so daß sie keine Duchenne-Dystrophie bekommen würden. Aber der achte Embryo, ein weiblicher, hatte das X-Chromosom mit dem mutierten Dystrophin-Gen von der Überträger-Mutter geerbt, so daß das Mädchen, das daraus entstanden wäre, als neue Überträgerin die Krankheit hätte weitervererben können.

Dieses Beispiel zeigt die Bedeutung der Präimplantationsdiagnostik: sie erlaubt es den Eltern sicherzustellen, daß ihr nächstes Kind weder ein Duchenne-Junge noch ein Duchenne-Überträger-Mädchen sein wird. Obgleich der PGH-Test in diesem Beispiel in der einzelnen Zelle der Embryonen gar nicht die Deletion der Exons 12 bis 16 nachzuweisen brauchte, war es doch wichtig, die Mutation in dieser Familie zu kennen, sonst hätte man mit dem PGH-Test unter Umständen den Embryo auf das falsche Gen untersucht.

Dr. Abbs sagte zum Abschluß seines Vortrags, daß die moderne Diagnostik jetzt präzise Diagnosen für 98% der Jungen mit Duchenne-Symptomen liefert und für 93% der Jungen mit Becker-Symptomen. Der Rest der Jungen hat sehr wahrscheinlich andere neuromuskuläre Erkrankungen. Bei etwa der Hälfte dieser Fälle wurde bisher eine Mutation des FKRP-Gens gefunden, die eine kongenitale Muskeldystrophie verursacht.

**Duchenne-Register:** *Robin Sharp*, Vater eines Duchenne-Jungen, ist der Computer-Spezialist des britischen Parent Projects. Er beschrieb in Einzelheiten das neue Online-Register, das vom Parent Project eingerichtet wurde mit dem Ziel, alle diagnostischen und klinischen Daten von möglichst vielen Duchenne- und Becker-Patienten in Großbritannien zu speichern. Dieses Register wird wichtige Vorteile bringen für die Patienten, ihre Familien, ihre Ärzte und Betreuer, und auch für die Forscher, die an der Entwicklung wirksamer Therapien arbeiten.

Die Vorteile für die Patienten und ihre Familien sind: (1) Sie werden schnellen Zugang haben zu den aktuellsten Informationen über alle Betreuungsmaßnahmen und medizinischen Behandlungen, so daß die Patienten auf dem bestmöglichen Gesundheitszustand gehalten werden können. (2) Die Wissenschaftler werden einen kontrollierten Zugang zu den persönlichen Daten einer großen Zahl von Patienten haben. Dies wird ihre Forschungsarbeiten erleichtern und ihnen helfen, neue Projekte im Interesse der Patienten zu beginnen. (3) Die genauen Daten werden ihre Anträge auf finanzielle Unterstützung erfolgreicher machen. (4) In das Register müssen alle Daten eines Patienten eingegeben werden, und dies wird sicherstellen, daß diese Daten mit den modernsten Methoden erhalten werden. (5) Die vollständigen molekularen Einzelheiten einer Mutation werden wichtig sein für die Teilnahme an klinischen Studien und später für die wirksamste Therapie.

Der Nutzen für die klinischen Spezialisten wird sein: (1) Sie werden einen kontrollierten Zugang zu allen Daten ihrer Patienten haben. (2) Das Register wird Informationen liefern für die effektivste Behandlung jedes einzelnen Patienten und es dadurch ermöglichen, daß sie eine optimale und individuell angepaßte Betreuung und Behandlung erhalten. (3) Der Kliniker kann die Teilnahme an einer geeigneten klinischen Studie vorschlagen und den Patienten während der Studie begleiten. (4) Deshalb können der klinische Spezialist und auch der Hausarzt eine zentrale Rolle für die Betreuung des Patienten spielen.

Um die Daten eines Patienten in das Register eingeben zu können, sollten die Familien die Verwaltung des britischen Parent Projects bitten, ihnen ein Formular zu schicken. Dieses Formular kann auch aus dem Internet heruntergeladen werden: [www.dmdregistry.org](http://www.dmdregistry.org). Die Eltern oder der Patient selbst tragen dann alle nicht-medizinischen persönlichen Daten ein, wie Geburtsdatum, Adresse, usw. Dieses Formular wird dem klinischen Arzt gegeben, der alle medizinischen und diagnostischen Daten einträgt und es dann an das Büro des Parent Project zurückschickt. Von dort wird es an das DNA-Laboratorium von Dr. *Steve Abbs* im Guy's Hospital in London weitergeleitet, wo die molekular-genetischen Einzelheiten bestimmt wurden, die online in das Register eingetragen werden.

Das Programm des Registers kann dann voraussagen, welche Behandlungsmöglichkeiten zur Verfügung stehen werden, z.B., welche Exons geskippt werden müßten und welche pharmakologischen Methoden angewendet werden könnten.

Die vollständig ausgefüllten Formulare mit den therapeutischen Voraussagen werden dann online oder per Post an die Eltern und die zuständigen Ärzte zurückgegeben, damit alle Daten überprüft und, falls nötig, korrigiert werden können.

Das Register kann auch die Wohnorte aller in Großbritannien registrierten Patienten anzeigen und so helfen, Pa-

tienten für geographisch begrenzte Studien und als mögliche Teilnehmer von Patienten- und Elterngruppen zu finden.

Das Register hat auch ein „Steuerungs“-Komitee, das die Funktion des Programms überwacht, Änderungen vorschlägt, und Kliniker und Forscher autorisiert für den Zugang zu allen oder ausgewählten Daten. Seine Mitglieder

sind die folgenden Genetiker und Kliniker: Steve Abbs, Emma Ashton, Kate Bushby, Francesco Muntoni, Terry Partridge, Federico Roncaroli, Su Stenhouse.

Alle etwa 2.000 Duchenne- und 500 Becker-Patienten in Großbritannien sollten ihre Daten in das Register eintragen lassen. *Das Register ist auch offen für Patienten in anderen Ländern!*

### **Nicht den Wald vor lauter Bäumen übersehen! Abschließende Worte von Francesco Muntoni.**

Die Forschung nach einer Therapie der Duchenne-Muskeldystrophie bringt uns jetzt äußerst interessante Ergebnisse. Eine Reihe von ermutigenden neuen Ergebnissen bei den Versuchen, eine Änderung der Dystrophin-Produktion zu erreichen – Antisense-Oligonukleotide, PTC124, Gentransfer, u.a. – werden zum ersten Mal an Duchenne-Jungen getestet. Es gibt jetzt eine begründete Hoffnung, daß sie das Fortschreiten der Krankheit verlangsamen werden. Außerdem sind andere pharmakologische Mittel, die die kranken Muskeln ohne Dystrophin unempfindlich gegen die Degeneration machen können, erfolgreich an dystrophischen Mäusen und Hunden getestet worden, und es ist wahrscheinlich, daß man mit ihnen bald klinische Studien durchführen wird.

Bei diesen so positiven Nachrichten ist es verständlich,

daß manche Familien, Patienten und Ärzte meinen, eine endgültige Heilung für Duchenne-Dystrophie würde bald gefunden. Wir dürfen jedoch nicht vergessen, daß der Zeitbedarf und die Auswirkungen noch nicht bekannt sind, die die Umsetzung dieser neuen experimentellen Erfolge in die klinische Praxis haben werden.

Deshalb ist es unbedingt notwendig, daß jedes kranke Kind an den besten, heute schon bekannten Betreuungsmaßnahmen teilnimmt, die das Fortschreiten der Krankheit verlangsamen können. Steroide und Medikamente für das Herz lösen das Grundproblem nicht, aber ohne Zweifel gewinnen die Kinder Zeit damit und erhöhen ihre Chance, von einer zukünftigen Therapie zu profitieren. Unsere kranken Jungen müssen deshalb optimal betreut werden, um in einem guten Zustand zu bleiben.

---

Wie ich am Anfang dieses Berichtes schon schrieb, habe ich nur die mehr wissenschaftlichen Vorträge hier zusammengefaßt, die Vorträge, die auf dem Treffen in London gehalten wurden und die wichtigen Informationen von anderen Forschern, die nicht in London waren. Auf dem Treffen gab es aber noch 12 weitere Vorträge über medizinische, soziale und auch rechtliche Themen. Sie könnten später einmal in einem getrennten, mehr medizinischen Bericht beschrieben werden, der Grundlage für eine optimale Betreuung der Patienten sein könnte. An dieser Stelle soll aber noch eine neue Arbeitsgruppe des Parent Projects erwähnt werden:

**PPUK Arbeitsgruppe über Verhalten und Lernen:** Auf der Konferenz teilte *Veronica Hinton* von der Columbia Universität in New York Einzelheiten mit über ihre Forschungen zu Verhaltens- und Lernschwierigkeiten bei Jungen mit Duchenne-Muskeldystrophie und stellte die neue PPUK Informationsbroschüre „Verhalten und Lernen“ vor. *Janet Hoskin* eine Spezialistin für Legasthenie leitete eine Vortragsreihe über Leseschwierigkeiten und die Einrichtung eines Programms für frühes Lesen und Schreiben. Die Einzelheiten von Dr. Hintons Untersuchungen sind vom PPUK veröffentlicht worden: *PPUK Learning and Behaviour Toolkit for Duchenne Muscular Dystrophy*. Dieser „toolkit“ kann zur kostenlosen Zusendung telephonisch angefordert werden: 0044-208-556 9955.

---

Diesen Bericht habe ich im Dezember 2006 und Januar 2007 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 – bzw. werden dort stehen – unter [www.duchenne-forschung.de](http://www.duchenne-forschung.de). Die nächste Jahrestagung des amerikanischen *Parent Project Muscular Dystrophy*, PPMD, wird im Juli 2007 in Philadelphia stattfinden. Dies wird die nächste Gelegenheit sein, wieder einen Bericht über alle neuen Duchenne-Forschungsergebnisse zu schreiben. 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)