

Wege der Forschung zu einer Therapie der Duchenne-Muskeldystrophie.

Aktualisiert im März und April 2008

Dies ist eine neue Art der Forschungsberichte, die ich, *Dr. Günter Scheuerbrandt*, Biochemiker aus Deutschland, für Euch schreibe, die Duchenne-Jungen und jungen Männer und ihre Familien, die wissen möchten, wie die Arbeit der Wissenschaftler und Ärzte in vielen Laboratorien der Welt vorankommt auf dem Weg zu wirksamen Therapien der Duchenne-Muskeldystrophie. Meine früheren Berichte, vor allem die letzten drei über die Parent-Project-Treffen in Cincinnati 2006, in London 2006 und in Philadelphia 2007 (www.duchenne-information.eu) enthielten ziemlich ausführliche Zusammenfassungen der Forschungsergebnisse, über die bei diesen Treffen berichtet wurde. Aber auch andere wichtige Forschungen werden durchgeführt, über die auf diesen Treffen noch nicht gesprochen wurde. Ich habe jetzt praktisch alle Zusammenfassungen der letzten drei Berichte für diesen Bericht überarbeitet und mit neuen Informationen aktualisiert, die vor allem beim ActionDuchenne-Treffen in London im November 2007 mitgeteilt wurden. Außerdem habe ich Zusammenfassungen von wichtigen neuen Veröffentlichungen hinzugefügt. Hinweise auf einige der wichtigsten Publikationen stehen am Ende einiger der Zusammenfassungen.

Dies ist jetzt ein grundlegender Text, der die Ergebnisse bis März und April 2008 berücksichtigt. Ich werde ihn von Zeit zu Zeit mit neuen Ergebnissen aktualisieren, zum ersten Mal nach dem Parent-Project-Treffen in Philadelphia im Juli 2008. Er wird dann auf Deutsch, Englisch und Spanisch einige Monate danach zur Verfügung stehen. Wie bisher sind alle meine Berichte, auch dieser, keine wissenschaftlichen Veröffentlichungen mit vielen schwierigen Worten, denn ich habe versucht so zu schreiben, daß Ihr verstehen werdet, was für Euch in den Laboratorien geschieht.

Dieser Bericht, wie die früheren, enthält nur Zusammenfassungen über naturwissenschaftliche Ergebnisse. Ich werde aber versuchen, in neuen Ausgaben dieses Berichtes auch Zusammenfassungen über neue medizinische und soziale Betreuungsmaßnahmen aufzunehmen, über die auf den Treffen und in Veröffentlichungen berichtet wird.

In den Zusammenfassungen erwähne ich nur die Namen der Laboratoriumsdirektoren, sie haben aber auch Kollegen, Assistenten und Studenten, die mit ihnen im Team an den Projekten arbeiten, über die hier berichtet wird, aber es ist unmöglich sie alle zu nennen. Alle Direktoren, deren Arbeit genannt wird, hatten die Gelegenheit, die Entwürfe meiner Texte zu sehen, um sie zu korrigieren und zu ergänzen, wenn das nötig war, und praktisch alle haben es getan. Deshalb sollte dieser Bericht keine oder sehr wenige Fehler enthalten, für die ich aber allein verantwortlich bin.

Wenn Ihr Fragen zur Forschung habt, schreibt mir einen E-Mail-Brief auf Deutsch, Englisch, Französisch, Spanisch oder Italienisch. Ich werde versuchen, alle zu beantworten, allerdings nur auf Deutsch oder Englisch.

Diesen Bericht habe ich im Auftrag von drei wichtigen Duchenne-Organisationen geschrieben, vom **TREAT-NMD-Exzellenz-Netzwerk** der Europäischen Union, dessen Verwaltung im Institut für Humangenetik der Universität Newcastle upon Tyne in England ist, und von den beiden Duchenne-Elterngruppen **PPMD** in Middletown, Ohio, USA, und **ActionDuchenne** in London.

Biochemische und biologische Grundlagen

Wie machen die Gene Proteine? Gene sind funktionelle Einheiten des genetischen Materials **Desoxyribonukleinsäure, DNA**. (Das A ist die Abkürzung für das englische Wort *acid*, Säure. Im Deutschen werden aber meistens auch die englischen Abkürzungen DNA, und für die ähnliche Ribonukleinsäure RNA verwendet.) Die Struktur der DNA sieht wie eine verdrehte Leiter aus, die *Doppelhelix*. Jede Sprosse dieser Leiter besteht aus jeweils zwei von vier verschiedenen kleinen Molekülen, den **Basen Adenin, Guanin, Thymin und Cytosin**, abgekürzt A, G, T und C. Aus Raumgründen können die Sprossen nur zwei verschiedene Basenkombinationen

enthalten, die **Basenpaare** A-T und G-C. Wenn zum Beispiel GGCTTAATCGT die Sequenz (die Reihenfolge) dieser Basen auf einem Strang der Leiter ist, muß die Sequenz auf dem gegenüberliegenden Strang CCGAATTAGCA sein, so daß beide Sequenzen *komplementär* zueinander sind:

```
-GGCTTAATCGT-  
| | | | | | | | | |  
-CCGAATTAGCA-
```

Solche Sequenzen der Basen, der *genetischen Buchsta-*

ben, sind die **genetischen Informationen** für die Entwicklung und Funktion eines lebenden Organismus, sie werden von einer Generation an die nächste weitergegeben.

Die meisten Gene tragen die Instruktionen für die Biosynthese von **Proteinen**. Im Zellkern wird die genetische Instruktion der aktiven Gene **exprimiert**, sie wird auf eine andere genetische Substanz kopiert, **transkribiert**, auf die **Prä-messenger-Ribonukleinsäure**, auch *Transkript* oder abgekürzt **Prä-mRNA** genannt. Die meisten Gene bestehen aus aktiven oder kodierenden Abschnitten, den **Exons**, die die Information für die Proteine enthalten, und den oft sehr viel längeren **Introns**, die nicht nur „genetic junk“ (genetischer Müll) sind, wie man früher glaubte, sondern auch Informationen für die Kontrolle der Genaktivität enthalten.

Nach der Transkription werden die Introns aus der Prä-mRNA entfernt und die Exons zur messenger-RNA oder mRNA, zusammengesetzt, **gespleißt**, die dann zu den **Ribosomen** wandert, den Protein-synthetisierenden Strukturen im Zytoplasma außerhalb des Zellkerns. (Auf Deutsch heißt die messenger RNA „Boten-RNA“, meistens verwenden wir aber auch dafür die englische Abkürzung mRNA.) Die Ribonukleinsäuren, RNAs, benutzen die Base U, Uracil, anstelle der sehr ähnlichen Base T der DNA. **Spleißstellen** sind bestimmte Sequenzen innerhalb der Exons und an den Exon-Intron-Grenzen, die für die präzise Entfernung der nicht-kodierenden Intronsequenzen aus der Prä-mRNA notwendig sind. Das Spleißen selbst wird von den **Spleißosomen** ausgeführt, das sind Komplexe aus vielen Proteinen und kurzen RNAs.

In der Sequenz der mRNA bilden drei aufeinanderfolgende Basen ein **Codon** (ein *genetisches Wort*), das, mit drei Ausnahmen, eine der 20 verschiedenen Bausteine der Proteine (Eiweißkörper), der **Aminosäuren**, determiniert (bestimmt) gemäß des **genetischen Codes**. Es gibt keine Zwischenräume zwischen den Codons. In den Ribosomen werden die genetischen Codewörter abgelesen, in die Sprache der Proteine *übersetzt*, und diese aus vielen, oft Tausenden, ihrer Aminosäure-Bausteinen, zu einer langen Kette zusammengesetzt. Die drei erwähnten Ausnahmen sind die Codons UAA, UAG und UGA, die **Stoppcodons** sind, an denen die Biosynthese (die biologische Produktion) eines Proteins aufhört.

Das Dystrophin-Gen und -Protein: Duchenne- und Becker-Muskeldystrophie werden durch **Mutationen**, (Schädigungen) des **Dystrophin-Gens** verursacht, das die Information für die verschiedenen Formen des Proteins **Dystrophin** trägt. Seine Sequenz ist 2.220.223 Basen lang, damit ist es das bei weitem längste der bisher bekannten menschlichen Gene. Nur 11.058 Basen, 0,5%, in den 79 Exons des Dystrophin-Gens bestimmen die Sequenz der 3.685 Aminosäuren des normalen Dystrophin-Proteins in den Muskelzellen.

Wie groß sind das Dystrophin-Gen und sein Protein? Die Doppelhelix-Struktur des Dystrophin-Gens ist 0,75 mm lang. Zusammen mit den nach letzter Zählung 20.488 menschlichen Genen paßt sie in einen Zellkern von etwa

0,01 mm Durchmesser hinein, weil das genetische Material extrem kompakt gefaltet ist. Ein Molekül des normalen Dystrophin-Proteins ist viel kürzer als sein Gen, es ist 125 Nanometer (= 0,000125 mm) lang. Auf einen Zentimeter passen 8.000 aneinandergereihte Dystrophin-Moleküle. Ein Gramm Muskelgewebe enthält 114 Milliarden Dystrophin-Moleküle. Dies macht deutlich, welche Aufgabe die Wissenschaftler haben: Um die Krankheit mit einer genetischen Therapie aufzuhalten und die Muskeln wieder funktionsfähig zu machen, muß das geschädigte Gen in jeder Muskelzelle ersetzt oder repariert werden, damit mindestens 30% der normalen Zahl an neuen Dystrophin-Molekülen gebildet wird. Die neuen Moleküle müssen nicht genau gleiche Struktur wie das normale Dystrophin haben, sie können kürzer sein, aber sie müssen richtig funktionieren. Und das bedeutet, daß viele Milliarden neue Dystrophin-Moleküle in jedem Gramm Muskel wiedererscheinen müssen, und ein Kind hat viele Kilogramm Muskelgewebe.

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

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

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

ten verursacht.

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

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

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

Da die Drei-Buchstaben-Codons der mRNA in den Ribosomen eines nach dem anderen ohne Zwischenraum gelesen werden, bleibt das **Leseraster** erhalten, englisch **in-frame**, wenn die Mutation ganze Codons aus drei Buchstaben entfernt oder zugefügt hat. Das Dystrophin kann zwar noch produziert werden, aber es ist länger oder kürzer als normal. Wenn diese Änderungen nur unwichtige Strukturen des Dystrophins betreffen, kann es immer noch zumindest teilweise seine Aufgaben erfüllen. Dann entsteht die gutartige Form der Dystrophie, **Becker-Muskeldystrophie**.

Wenn jedoch die Mutation das Leseraster um ein oder zwei Basen verschoben hat, bleibt es nicht erhalten, es ist **out-of-frame**. Dann wird eine Reihe von falschen Aminosäuren ab der Mutationsstelle in das wachsende Protein eingebaut bis schließlich ein neues, ein **vorzeitiges Stopp-**

codon erreicht wird. Das unfertige Dystrophin kann seine normale Funktion nicht erfüllen, es verschwindet, und es entwickelt sich die **Duchenne-Muskeldystrophie**.

Dystrophin im Gehirn. Dystrophin kommt nicht nur in den Muskelfasern vor, sondern auch in anderen Organen wie z.B. im Gehirn und in der Retina der Augen. Das Dystrophin in den Muskeln mit einem Molekulargewicht von 420 kd, Kilodaltons (420.000 mal schwerer als ein Atom Wasserstoff) ist das längste der fünf *Isoformen* (ähnliche Proteine verschiedener Größe). Im Gehirn kommt dieses normale Dystrophin, aber auch die vier kürzeren Formen, vor allem in den Synapsen vor, die die Nervenzellen miteinander verbinden, und auch in den Wänden der Blutgefäße des Gehirns, in der sog. Blut-Hirn-Schranke. Das bedeutet, daß diese Dystrophine für die Kommunikation zwischen den Nerven wichtig sind, und auch für die richtige Funktion der Blut-Hirn-Schranke, die nur für solche Substanzen durchlässig ist, die für die normale Aktivität des Gehirns notwendig sind.

Das Dystrophin-Gen hat sieben Promotoren, Basensequenzen, die den Beginn der Proteinsynthese bestimmen. Die ersten drei Promotoren am Anfang des Gens kontrollieren die Synthese des normalen Proteins, die anderen vier befinden sich weiter im Inneren des Gens und produzieren kürzer als normale Dystrophin-Proteine. Das heißt, daß Mutationen, die vor einem bestimmten Promoter geschehen sind, nicht die Produktion und die Struktur des Proteins beeinflussen, das von diesem Promoter kontrolliert wird. Zum Beispiel: Duchenne-Jungen mit Mutationen in der ersten Hälfte ihres Gens können immer noch ihre kurzen Dystrophin-Isoformen für das Gehirn produzieren im Gegensatz zu den Mutationen in den hinteren Regionen des Gens, deren Gehirn-Dystrophine dann auch fehlen werden. Dies erklärt warum manche Duchenne-Jungen Lern- und Verhaltensschwierigkeiten haben und andere Jungen nur wenige oder gar keine.

Da die verschiedenen Dystrophin-Isoformen auch in der Retina des Auges gefunden wurden, kann die Lage der Mutation auch für die Schwierigkeiten beim Farbsehen bei einigen Duchenne-Jungen verantwortlich sein.

Mitgeteilt von Prof. **Francesco Muntoni** vom Imperial College in London.

Exon Skipping

Exon-Skipping ist keine Heilung. Mit der *Exon-Skipping-Technik* (Überspringen von Exons) versucht man, die schnelle Duchenne- in die mildere Becker-Muskeldystrophie zu verlangsamen. *Diese Methode verändert nicht das Gen selbst* mit seiner Mutation, sondern beeinflusst nur, wie die genetische Information des geschädigten Gens abgelesen und weiterverarbeitet wird. Exon-Skipping wird deshalb *keine vollständige Heilung* der Duchenne-Dystrophie sein; es wird nur das Ausmaß ihrer Symptome abmildern, es wird *nur eine Therapie* sein.

Wenn eine Mutation, eine Deletion, Duplikation oder Punktmutation, das Leseraster der mRNA, verschoben und damit Duchenne-Dystrophie ausgelöst hat, kann das Raster wiederhergestellt werden, wenn aus der mRNA ein oder mehrere Exons mit *Antisense-Oligoribonukleotiden*,

AONs, künstlich entfernt werden. Dies sind kurze RNA-Stücke, deren Sequenzen so konstruiert sind, daß sie sich gezielt und genau an ihre komplementäre Sequenz der Prä-mRNA innerhalb des zu entfernenden Exons oder in seinen Endregionen anlagern und *nirgendwo sonst*. Diese AONs beeinflussen dadurch den Spleißprozeß, so daß das oder die ungewünschten Exons nicht mehr in der mRNA enthalten sind, sie werden *geskippt*, übersprungen.

Da die geskippte mRNA kürzer als normal ist, ist das Dystrophin-Protein auch kürzer, es enthält weniger Aminosäuren. Wenn die fehlenden Aminosäuren Teil unwichtiger Regionen sind, z.B. der Stabregion, kann das kürzere Protein noch seine stabilisierende Aufgabe für die Muskelzellmembranen erfüllen. Das Ergebnis ist dann eine Änderung der schweren Duchenne-Symptome in die der viel

milderen der Becker-Dystrophie.

Für die ersten klinischen Exon-Skipping-Studien werden zwei Arten von chemisch stabilisierten AONs verwendet. Sie müssen stabilisiert sein, weil sie dann in den Muskelzellen nicht oder nur langsam von Enzymen zerstört werden, die Nukleinsäuren abbauen. Die zwei Typen dieser AONs sind die 2'-O-Methyl-Phosphorothioate, die zu 2'-O-Methyls abgekürzt werden, und die Morpholinos.

Klinischer Exon-Skipping-Versuch in Holland. Der erste klinische Versuch an Menschen mit der Exon-Skipping-Technik wurde in Holland zwischen Januar 2006 und März 2007 durchgeführt. Er war nur geplant, um einen *proof of principle* (einen grundlegenden Beweis) zu liefern, aber nicht, um den behandelten Jungen einen therapeutischen Vorteil zu bringen. Es war eine lokale Studie an einer kleinen Stelle eines einzelnen Muskels, des *Tibialis-anterior*-Muskels des Schienbeins, der mit dem 2'-O-Methyl-Antisense-Oligoribonukleotid *PRO051* gegen Exon 51 behandelt wurde. Die holländischen Forscher hatten in Laboratoriumsexperimenten mit diesem Typ eines chemisch stabilisierten AONs bereits viele Jahre gearbeitet. Dabei konnten sie Dystrophin-Exons in Muskelzellen nicht nur in Zellkulturen erfolgreich skippen, sondern auch in lebenden Mäusen und Hunden nach lokalen und systemischen Injektionen (in den Blutkreislauf).

Vor dem Beginn dieser ersten klinischen Exon-Skipping-Studie wurden klinische und molekulargenetische Tests für jeden teilnehmenden Jungen durchgeführt, um sicher zu sein, daß die Exon-Skipping-Methode in den lebenden Jungen tatsächlich Becker-Dystrophin mit der erwarteten Struktur erzeugen wird. Vier Jungen, die schon den Rollstuhl benutzen mußten, nahmen an dieser offenen Studie teil. Sie waren zwischen 10 und 13 Jahre alt und hatten nachgewiesene Deletionen der Exons 50, 52, 48-50 and 49-50 ihres Dystrophin-Gens. Sie wurden hintereinander behandelt, d.h., nur nachdem bei einem Jungen die Ergebnisse positiv waren und keine ernststen Nebenwirkungen auftraten, wurde der nächste Junge behandelt. Jeder Junge erhielt einmalig vier Injektionen von 0,2 mg *PRO051* gelöst in 0,2 ml physiologischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl) unter lokaler Anästhesie in eine kleine Region von 1,5 cm Länge des *Tibialis-anterior*-Muskels.

Nach vier Wochen wurde an der Injektionsstelle etwas Muskelgewebe durch eine Biopsie entnommen und auf die erwartete geskippte mRNA und das verkürzte Dystrophin getestet. Diese Tests zeigten, daß 64%, 85%, 97% und 73% der noch vorhandenen dystrophischen Fasern nach dieser Behandlung neues Dystrophin an ihren Membranen enthielten. Im Vergleich zu Laminin- α 2, einem Protein, das nicht von der Dystrophie betroffen ist, betrug der Gehalt an neuem Dystrophin 33%, 35%, 17% und 25%. Dieser Vergleich berücksichtigt das Ausmaß der Muskeldegeneration. Ohne diese Korrektur hatte der 13 Jahre alte Junge mit sehr viel Bindegewebe und Fett in seinen Muskeln nur 3% der normalen Mengen an Dystrophin, während es beim Jungen mit den am wenigsten betroffenen Muskeln 12% waren. Molekulare Sequenzierungsmethoden bewiesen dann, daß das neue Dystrophin die erwartete Struktur mit einem wiederhergestellten Leseraster hatte. Es war nicht möglich festzustellen, ob die Menge des neuen Dystrophins genügt hätte, um den Fortschritt der Krankheit im

gesamten Muskel zu verzögern, weil das Volumen des behandelten Muskelgewebes zu klein war.

Diese Ergebnisse bedeuten, daß eine Exon-Skipping-Behandlung, sobald sie zur Verfügung steht, begonnen werden müßte, solange die meisten Muskeln noch weitgehend intakt sind, d.h., sofort nachdem die Mutation, die das Leseraster verschoben hat, nachgewiesen wurde.

Die holländischen Forscher haben jetzt eine Phase-I/II klinische Studie begonnen, um die Wirkung, die Sicherheit, die Verträglichkeit und die möglichen Nebenwirkungen des *PRO051*-AONs zu überprüfen, das systemisch in den Blutkreislauf injiziert wird, damit es alle Muskeln erreichen kann, auch die der Lungen und des Herzens. Die Studie ist eine Zusammenarbeit der Universitäten Löwen in Belgien und Leiden in Holland, sowie des Königin-Silvia-Kinderkrankenhauses in Schweden. Die teilnehmenden Patienten werden zur Zeit ausgewählt.

Die Injektionen werden subkutan erfolgen (unter die Haut), weil bereits an Mäusen und Affen gezeigt werden konnte, daß diese Anwendung ohne ernste Nebenwirkungen zu Exon-Skipping in allen getesteten Muskeln einschließlich des Herzens und des Zwerchfells führt, und weil dadurch die vielen Arzt- und Krankenhausbesuche vermieden würden, falls wiederholte Behandlungen notwendig werden sollten.

Die Exon-Skipping-Technik mit den 2'-O-Methyl-AONs wurde an der Universität Leiden von Prof. **Gerjan van Ommen**, Dr. **Judith van Deutekom** und ihren Teams entwickelt, aber für die Organisation und die Durchführung der klinischen Versuche ist jetzt die Firma *Prosensa B.V.* in Leiden unter ihrem Präsidenten Dr. **Gerard Platenburg** verantwortlich. Dr. van Deutekom ist jetzt Forschungsdirektorin von *Prosensa*.

An dieser systemischen Studie werden zwölf 5 bis 15 Jahre alte Duchenne-Jungen teilnehmen, sie wird fünf Wochen dauern mit einer subkutanen Injektion in jeder Woche. Weil noch nicht bewiesen wurde, ob die bei den Tierversuchen verwendete AON-Dosis auch in Kindern sicher sein wird, wird man den systemischen Versuch mit einer sehr niedrigen Dosis von 0,5 mg/kg/Injektion beginnen, die dann langsam bis maximal 10 mg/kg/Injektion erhöht wird (Dosis-Eskalation).

Prosensa hat bereits Gramm-Mengen des AONs gegen Exon 51 in klinischer Reinheit für die kommende Studie produziert. Es sind auch schon AONs mit optimierten Strukturen gegen die Exons 43, 44, 45, 46, 50, 52 and 53 hergestellt worden. Alle diese AONs, einschließlich des Anti-51-AONs, würden es erlauben, über 65% aller Patienten mit Deletionen zu behandeln. Aus finanziellen Gründen entwickelt *Prosensa* aber zur Zeit nur die AONs gegen die Exons 44, 51 und 52 für die volle klinische Anwendung und die Vermarktung.

Die Firma braucht mehr Kapital für die Entwicklung anderer AONs und dankt für die bedeutende finanzielle Unterstützung von Elternorganisationen wie die *Parent-Projects* in Holland und Deutschland, von der französischen Muskeldystrophiegesellschaft *AFM* und von anderen Organisationen.

Van Deutekom JC, Janson AA, Ginjaar IB, et al. Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide *PRO051* (Lokale Wiederherstellung des Dystrophins mit Antisense-Oligonukleotid *PRO051*). *N Engl J Med* 2007;

357; 2677-86. Hoffman, EP. Skipping toward personalized molecular medicine (Springen zu einer personalisierten molekularen Medizin). *N Engl J Med* 2007; 357; 2719-22.

Klinische Exon-Skipping-Studie in England. Eine zweite klinische Studie mit Exon-Skipping wird in England vom *MDEX Consortium* unter der Leitung von Prof. **Franco Muntoni** vom Imperial College London durchgeführt. Das MDEX Konsortium wurde vom britischen Gesundheitsministerium gegründet und hat neun Wissenschaftler als Mitglieder sowie Vertreter der Elternorganisationen Muscular Dystrophy Campaign, ActionDuchenne und Duchenne Parents Support Group.

Acht verschiedene Antisense-Oligos, AONs, wurden in Zellkulturen von menschlichen normalen und Duchenne-Muskeln und in nicht-dystrophischen Mäusen, die menschliche Dystrophin-Gene enthielten, getestet. Die besten Ergebnisse wurden mit dem *Morpholino-AON H51A* erhalten, das von Prof. **Steve Wilton** in Perth, Australien, entwickelt wurde und mit dem Prof. **Dominic Wells** in London zeigen konnte, daß es für eine klinische Langzeitbehandlung geeignet ist. Dieses Morpholino-AON mit dem Namen AVI-4658 wird in klinischer Reinheit von der Firma AVI BioPharma Inc. in Portland, Oregon, in den USA hergestellt.

Drei Gruppen von je drei Duchenne-Jungen, die 12 bis 18 Jahre alt sind und nicht mehr gehen können, nehmen an der Studie teil. Jede Gruppe bekommt eine von drei verschiedene Dosen, 0,09, 0,297 und 0,9 mg Morpholino-AON in 0,9 ml physiologischer Salzlösung, einmalig in neun lokalen Injektionen direkt in die *Extensor-digitorum-brevis*-Muskeln an der Außenseite eines Fußes gespritzt. Dieser Muskel wurde gewählt, weil er leicht erreichbar ist und ohne Konsequenzen durch eine Biopsie entfernt werden kann, falls nicht-akzeptable Nebenwirkungen auftreten sollten. Der Muskel des anderen Fußes erhält zur Kontrolle nur Injektionen der Salzlösung. Intensive klinische Untersuchungen einschließlich zweier Biopsien vor und 30 Tage nach den Injektionen gehören zum Studienprogramm.

Nachdem die Zustimmung von allen drei britischen Genehmigungsbehörden am Ende eines langwierigen Antragsprozesses erteilt wurde, bekam der erste Junge seine AON-Injektionen am 18. Dezember 2007. Es wird erwartet, daß die Ergebnisse der ganzen Studie noch 2008 mitgeteilt werden können.

Sobald diese erste Studie positive Ergebnisse zeigt, wird eine systemische Studie, deren Planung bereits weit fortgeschritten ist, mit der subkutanen Injektion des AVI-4658-AONs in den Blutkreislauf beginnen. Eines der entscheidenden vorklinischen Tierexperimente für die Vorbereitung dieser Studie waren sieben wöchentliche AON-Injektionen in die Schwanzvene von mdx-Mäusen, nach denen mehr als 50% der normalen Menge Dystrophin in den meisten ihrer Muskeln gefunden wurde, die nach 14 Wochen immer noch vorhanden war.

Es ist vorgesehen, in dieser systemischen Studie vier Gruppen von noch gehfähigen Duchenne-Jungen mit wöchentlichen subkutanen systemischen Injektionen zu behandeln, die mit einer niedrigen Dosis von etwa 600 mg AON beginnen und dann auf etwa 3 Gramm erhöht werden, wie es für einen Jungen von 10 Jahren berechnet wurde. In früheren klinischen Studien für andere Krankheiten

wurden AON-Dosen von bis zu 300 mg/kg/Tag gut vertragen, deshalb ist die Anfangsdosis in dieser Duchenne-Studie sehr niedrig. Die Ziele der Studie sind, auf Sicherheit und Verträglichkeit zu testen und auch auf Änderungen der Muskelfunktion und der Muskelkraft. Und man hofft, daß die niedrigste Dosis bestimmt werden kann, die genügend Exon-Skipping verursacht und von den Kindern ohne ernste Nebenwirkungen vertragen wird.

Eine ausführliche Beschreibung der lokalen Studie steht im Internet: <http://clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00159250>

Arechavala-Gomez V, Graham IR, Popplewell LJ, et al. and Muntoni F. Comparative analysis of antisense oligonucleotide sequences for targeted skipping of exon 51 during dystrophin pre-mRNA splicing in human muscle (Vergleichsanalyse von Antisense-Oligonucleotid-Sequenzen zum Skippen von Exon 51 während des Spleißens der mRNA in menschlichen Muskeln). *Human Gene Therapy*, 2007; 18; 798-810.

Exon-Skipping mit U7-Genstransfer: Die Wissenschaftler am Généthon-Institut in Evry bei Paris, Prof. **Luis Garcia** und Dr. **Aurélie Goyenvalle** (jetzt an der Universität Oxford) und ihre Mitarbeiter kombinieren Exon-Skipping mit Gentherapie, indem sie die Muskelzellen dazu bringen, die AONs selbst zu produzieren, damit sie nicht wiederholt injiziert werden müssen. Dies kann erreicht werden, wenn man in die Muskelzellen modifizierte *U7-snRNAs* transfiziert, die die genetische Information für die Bildung der AONs enthalten. *U7-snRNAs* sind kleine RNAs im Zellkern (small nuclear RNAs), die eine ähnliche Struktur wie die Spleißfaktoren haben. In einem zweiten Forschungsprogramm haben die französischen Forscher eine mehr allgemein anwendbare Exon-Skipping-Technik entwickelt, bei der auch ein Transfer von U7-Genen mit Viren verwendet wird.

Um den ersten Forschungsweg zu testen, wurde ein modifiziertes Gen für das *U7-snRNA* konstruiert, bei dem die DNA-Sequenzen für zwei AONs hinzugefügt wurden, die für das Skippen von Exon 23 der mdx-Mäuse notwendig sind. Die kurzen snRNAs werden, wie alle anderen RNAs auch, von Genen „gemacht“. Diese modifizierten U7-Gene, U7 SD23/BP22, wurden zusammen mit Kontrollsequenzen in AAV-Typ-2-Vektoren eingebaut und zunächst lokal in einzelne Muskeln der mdx-Mäuse und dann auch systemisch in ihren Blutkreislauf injiziert. Dies führte zur Bildung von Dystrophin ohne die vom Exon 23 determinierten Aminosäuren in bis zu 80% der Fasern der behandelten Muskeln. Dieses neue und verkürzte Dystrophin wanderte an seine normale Position unter den Muskelzellmembranen und blieb dort mehr als ein Jahr lang unverändert und ohne Immunreaktionen zu verursachen. Die dystrophischen Prozesse in den mdx-Muskeln, d.h., ihre beschleunigte Degeneration und Regeneration waren damit vollständig zum Stillstand gebracht worden. Diese systemisch behandelten mdx-Mäuse, die zum Testen in einem Laufband physisch belastet wurden, entwickelten nicht die sonst in unbehandelten mdx-Mäusen auftretenden Muskelschädigungen.

Diese U7-Genstransfertechnik wurde dann zur Behandlung der klinisch dystrophischen GRMD-Appoptierhunde (golden retriever) eingesetzt. Diese Hunde haben eine Mutation in der Spleißstelle des Exons 7, die durch Skippen

der Exons 6 und 8 „repariert“ werden kann. Mit den modifizierten U7-Vektoren, die die Antisense-Strukturen gegen die Exons 6, 7 und 8 enthielten, wurde zwei Monate nach einer einzigen lokalen Injektion in einen Muskel verkürztes Dystrophin in fast normaler Menge erhalten. Eine „regionale“ systemische Injektion in ein Bein bei blockierter Blutzirkulation erzeugte große Mengen neuen Dystrophins, das auch nach sechs Monaten noch vorhanden war.

Auf dem zweiten Forschungsweg mit diesem U7-Gen-transfer wird Exon-Skipping durch einen neuen und fast universellen U7snRNA-Vektor vermittelt, der eine komplementäre DNA-Sequenz zum Exon enthält und einen freien Anhang mit Bindungsstellen für die heterogenen nuklearen Ribonukleoproteine A1/A2 (hnRNP), die den Spleißprozeß aller Exons hemmen. Die komplementäre Sequenz des übertragenen Gens wird zuerst in eine kleine RNA überschrieben, und diese lagert sich dann an das zu skippende Exon an. Da es die Strukturen mit sich bringt, die die hnRNPs anziehen, wird diese Gensequenz das Skipping des Exons induzieren, weil diese Proteine die Spleiß-Proteinkomplexe, die *Spleißosomen*, stören, die sich an den Enden des betreffenden Exons in der Prä-mRNA befinden. Das heißt, diese Art des Exon-Skippings wird nicht durch die üblichen AONs verursacht, sondern von diesen universellen Proteinen, die für die Blockade des Spleißens aller Exons gleich sind. Diese Methode ist schon erfolgreich im Labor auf das Skipping von Exon 51 in isolierten Myoblasten von Duchenne-Patienten angewendet worden.

Diese Technik wurde entwickelt, weil man hofft, damit den langdauernden Genehmigungsprozeß zu vermeiden, der für viele, oder sogar alle AONs des normalen Skippings notwendig sein könnte, denn diese Technik verwendet nur eine universelle Struktur des DNA-Anhangs (des „DNA-Schwanzes“) zusätzlich zu den komplementären DNA-Sequenzen gegen das zu skippende Exon.

Goyenvalle A, Vulin A, Fougereousse F, et al, and Garcia L, and Danos O. Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping (Erhaltung von dystrophischen Muskeln durch Exon-Skipping, das durch U7 snRNAs ausgelöst wird). *Science* 2004; 306; 1796-99.

Multi-Exon-Skipping in dystrophischen Hunden. Bei vielen der Duchenne-Muskeldystrophien, deren Ursache Deletionen, Duplikationen und Punktmutationen sind, werden zwei oder mehr Exons geskippt werden müssen, um das Leseraster wiederherzustellen. Weil die dystrophischen Hunde ein Doppel-Exon-Skipping brauchen, würden Experimente mit ihnen den Weg öffnen für ein Multi-Exon-Skipping bei Duchenne-Jungen mit diesen schwierigeren Mutationen. Nach theoretischen Überlegungen wurde sogar vorausgesagt, daß ein gleichzeitiges Skipping der 11 Exons 45 bis 55 zu einer Becker-Dystrophie mit sehr milden Symptomen führen würde in bis zu 63% der Duchenne-Jungen mit Deletionen. Bisher ist es aber nicht gelungen, so viele Exons auf einmal zu skippen trotz bereits zwei Jahre dauernden Versuchen, dies zu erreichen.

Prof. **Terence Partridge** vom Children's National Medical Center in Washington und seine Kollegen haben begonnen, ein Multi-Exon-Skipping in dystrophischen Apportierhunden, GRMD auszuarbeiten. Im Gegensatz zu den mdx-Mäusen mit ihren milden dystrophischen Sym-

ptomen, sind diese Hunde stark körperlich behindert. Deshalb sollten Experimente mit ihnen Ergebnisse liefern, die man auch in klinischen Studien an Duchenne-Jungen erwarten dürfte. Und es könnten mit diesen Hunden auch Experimente über viele Jahre durchgeführt werden, weil sie viel länger als Mäuse leben.

Diese Hunde haben eine Mutation in der Spleißstelle von Exon 7 in ihrem Dystrophin-Gen, die die Deletion von Exon 7 in der mRNA verursacht und eine Leserasterverschiebung mit einem vorzeitigen Stoppcodon wenig später. Ein Skipping der beiden benachbarten Exons 6 und 8 würde das Leseraster wiederherstellen.

In einer ersten *lokalen* Studie injizierten die Forscher verschiedene Mengen eines Cocktails aus drei Morpholino-AONs, zwei verschiedene gegen Exon 6 und ein drittes gegen Exon 8, in den *Tibialis-anterior*-Muskel junger erwachsener GRMD-Hunde. Zwei Wochen später wurde nach Biopsien an den Injektionsstellen Muskelgewebe erhalten, in dem neues und verkürztes Dystrophin in allen Muskelfasern nachgewiesen wurde, die auch eine fast normale Struktur hatten. Doch zusätzlich zu den beiden Exons 6 und 8, wurde auch Exon 9 geskippt; dies beeinflusst aber nicht das Leseraster. In vorläufigen Experimenten an Gewebekulturen mit Morpholinos nur gegen Exon 6 wurden ebenfalls die drei Exons 6, 8 und 9 geskippt, dies geschah aber nicht, wenn die Morpholinos direkt in die Muskeln injiziert wurden; der Morpholino-Cocktail gegen Exons 6 und 8 war notwendig, um die drei Exons in den Muskeln der lebenden Tiere zu skippen. Deshalb kann man sich nicht darauf verlassen, daß Ergebnisse von Experimenten an Gewebekulturen sich ohne weiteres auf ein lebendes Tier oder einen Menschen übertragen lassen.

Für eine *systemische* Anwendung erhielten in Zusammenarbeit mit Dr. *Shin'ichi Takeda* an der General Animal Research Facility in Tokio, drei zwei Monate alte Hunde Injektionen der drei AONs in ihre Beinvenen, was auch zum Skipping der drei Exons 6, 8 und 9 führte. Nach zwei Monaten hatte ein großer Teil der Skelettmuskeln das vorausgesagte verkürzte Dystrophin abhängig von der Dosis produziert. In den Herzmuskeln erschien kein neues Dystrophin, weil, wie bereits bekannt war, die Morpholino-AONs nicht in das Herz wandern.

Mit mehreren Muskelfunktionstests wurde gezeigt, daß der körperliche Zustand der behandelten Hunde so blieb, wie er am Beginn der Behandlung war, während die nicht-behandelten Hunde während dieser Zeit stark degenerierten. Die systemische Behandlung hatte demnach die Muskeldegeneration gestoppt. Zur Analyse der Muskelstruktur wurden Kernresonanztests (NMR) durchgeführt. Diese nichtinvasive Technik brachte die gleichen Ergebnisse wie Tests an Muskelgewebe aus Biopsien. Dies wird für die klinischen Studien mit Duchenne-Jungen wichtig sein, weil dadurch weniger Biopsien notwendig werden.

Das heißt, Morpholino-AONs sind gut wirksam in einem großen Tier mit einer dem Menschen ähnlichen Körperstruktur. Sie sind nicht toxisch und verursachen keine Immunabstoßung. Sie werden aber wiederholt angewendet werden müssen, weil ihre Wirkung nicht dauerhaft ist. Das jedoch ist ein Vorteil, weil die Behandlung unterbrochen werden kann, wenn Probleme auftreten. Und sie wirken nur in Geweben, wie Muskeln, in denen das Dystrophin-Gen zur Prä-mRNA transkribiert wird. Die Einzelheiten

dieser sehr positiven Ergebnisse werden in Kürze veröffentlicht werden.

Bérout C, Tuffery-Giraud S, Matsuo M, et al. Multi-exon skipping leading to an artificial DMD protein lacking amino acids from exons 45 through 55 could rescue up to 63% of patients with Duchenne muscular dystrophy (Ein Multi-Exon-Skipping, das zu einem künstlichen DMD-Protein führt, dem die Aminosäuren der Exons 45 bis 55 fehlen, könnte bis zu 63% der Patienten mit Duchenne-Muskeldystrophie retten). *Human Mutation* 2007; 28(2); 196-202.

Exon-Skipping mit Peptid-Nukleinsäuren. Zwei Typen von Antisense-Oligoribonukleotiden (AONs) für das Exon-Skipping werden schon in klinischen Studien an Duchenne-Jungen getestet: die 2'-O-Methyl-phosphorothioate (2'-O-Methyle) in Holland, und die *Morpholinos* in England.

Eine andere Gruppe von AONs, *Peptid-Nukleinsäuren* (PNAs), werden auch auf ihre Exon-Skipping-Eigenschaften getestet. Ribonukleinsäuren (RNAs) und Peptid-Nukleinsäuren haben verschiedene Strukturen ihrer Ketten: In den RNAs wechseln Phosphat- und Ribose-Einheiten einander ab, während es bei den PNAs aneinandergereihte Aminosäuren sind. Wegen ihrer nicht-ionischen (ungeladenen) Peptidbrücken, -CO-NH-, ähneln die PNAs in ihren Eigenschaften elektrisch neutralen Proteinen. Sie sind wasserlöslich, sehr stabil und können leicht modifiziert werden, damit sie die normalen DNA- und RNA-Basen in der richtigen räumlichen Anordnung und gewünschten Se-

quenz enthalten. Sie können sich dann mit hoher Affinität an jede ausgewählte komplementäre DNA- und RNA-Sequenz anlagern. Kurze Antisense-PNAs mit Ketten aus 20 bis 30 Basen werden bereits in Exon-Skipping-Experimenten so wie die anderen beiden AON-Typen getestet.

Dr. **Matthew Wood** und seine Kollegen an der Universität Oxford begannen, mit Antisense-PNAs zu arbeiten, deren Ketten aus der einfachsten Aminosäure Glyzin aufgebaut waren, um das Exon 23 der mdx-Mäuse zu skippen. Experimente an Zellkulturen und dann mit Injektionen in einen einzelnen Tibialis-anterior-Muskel junger und alter lebender mdx-Mäuse zeigten, daß drei Wochen nach einer einzelnen Injektion viele Muskelfasern neues Dystrophin enthielten, das mehr als acht Wochen lang stabil blieb.

Um die Wirkung der Injektionen zu verbessern, wurden die PNAs konjugiert, d.h., mit anderen Peptiden und Proteinen kombiniert, z.B. mit synthetischen Peptiden vor allem aus der Aminosäure Arginin, mit den Transfer-Regionen des TAT-Proteins des HIV-Virus, und der funktionalen Struktur des AAV-Hüllproteins.

Die positiven Ergebnisse des Exon-Skippings mit diesen PNA-Konjugaten konnten weiter verbessert werden, zumindest in Zellkultur, durch neue Antisense-PNAs, deren Ketten abwechselnd aus Prolin und einer anderen Aminosäure besteht, die, wie Prolin, eine fünfgliedrige Ringstruktur hat.

Die Einzelheiten dieser Experimente können hier nicht mitgeteilt werden, weil sie noch nicht veröffentlicht sind. Sie sind sehr ermutigend, denn sie zeigen, daß mit Antisense-PNAs sehr wirksames Exon-Skipping möglich ist.

Transfer des Dystrophin-Gens.

Transfer des Dystrophin-Gens mit einem Virus-Vektor. Der Transfer (die Übertragung) eines modifizierten Dystrophin-Gens mit adeno-assoziierten Viren (AAV) als Vektor (als Transporter-Virus) in die Muskelzellen ist eine der Strategien für eine Therapie der Duchenne-Muskeldystrophie. Erfolgreiche Experimente mit dystrophischen Mäusen und Hunden haben in der Firma *Asklepius* in Chapel Hill, North Carolina, zur Entwicklung eines *BioStrophin™ biological nano particle* (eines biologischen Nano-Teilchens) des AAV Serumptyps 2.5 beigetragen, mit denen der erste klinische Versuch für diese Gentherapie-Methode durchgeführt wird.

Die ziemlich kleinen Viren können von den Zellen, die sie infizieren, nicht vermehrt werden, weil die meisten ihrer eigenen Gene entfernt wurden. Diese Modifikation schaffte Raum für die kodierenden (Informationen übertragenden) Sequenzen eines therapeutischen Gens, das transportiert werden soll, das nicht länger als etwa 5.000 Basenpaare ist. Deswegen mußte die cDNA des normalen Dystrophins, die aneinandergehängten 79 Exons ohne die Introns, die etwa 14.000 Basenpaare lang ist, stark verkürzt werden um Teile des Exons 17 und aller Exons von 18 bis 59 und von 70 bis 79. Die Übertragung eines solchen Mini-Gens würde deshalb die Duchenne-Muskeldystrophie nicht heilen können, sondern sie nur in die viel langsamer voranschreitende Becker-Dystrophie abändern.

Das bedeutet, daß das erwartete Becker-Dystrophin et-

wa nur ein Drittel so lang sein wird wie das normale Protein. Im Jahr 1990 wurde ein 61 Jahre alter Becker-Patient diagnostiziert, der noch gehen konnte und der dieses verkürzte Dystrophin in seinen Muskeln hatte.

Obgleich das klinische Ergebnis ähnlich wie beim zukünftigen Exon-Skipping sein wird, wird es *nicht mutati-onsspezifisch* sein. Alle Duchenne-Patienten würden von dieser Gentransfer-Methode profitieren können, wenn sie einmal vollständig entwickelt ist.

Nach Tests auf Sicherheit und Toxizität des Mini-Dystrophin-Vektors in Versuchstieren wurde 2006 und 2007 eine doppelblinde Phase-Ia klinische Studie an sechs Duchenne-Jungen, die älter als fünf Jahre waren, unter der Leitung von Prof. **Jerry Mendell** an der Nationalen Kinderklinik der Ohio State University in Columbus durchgeführt.

Die Jungen erhielten die Injektionen des BioStrophins an drei 0,5 cm voneinander entfernten Stellen des Bizepsmuskels eines Armes, während in den Bizeps des anderen Armes nur physiologische Salzlösung gespritzt wurde. Zwei verschiedene Dosen wurden für jede der beiden Gruppen aus drei Patienten gegeben. Nach vier Wochen wurden von vier der Patienten Muskelproben nach Biopsien aus der Injektionsstelle erhalten, von den zwei anderen nach 12 Wochen.

Es sind keine Nebenwirkungen aufgetreten, die auf die Gentherapie zurückgeführt werden könnten, d.h., die Methode wird gut vertragen. Alle Einzelheiten der Ergebnisse

werden veröffentlicht, sobald alle Daten ausgewertet sind.

Es wird nicht erwartet, daß es für die Jungen in dieser ersten Studie bereits eine therapeutische Wirkung gibt. Ihr Hauptzweck war es, einen *proof of principle* zu liefern, ob diese Art der Gentherapie nicht nur in den Skelettmuskeln von Mäusen und Hunden wirksam ist, sondern auch in menschlichen Muskeln ohne nicht-akzeptierbare Nebenwirkungen, wie eine Immunabwehr gegen das neue Mini-Dystrophin oder das Vektormaterial.

Zur Vorbereitung des nächsten Schritts wurden weitere Tierexperimente durchgeführt mit dem Ziel, die Bedingungen für die erste klinische Studie an Duchenne-Jungen mit regionalen systemischen Injektionen zu finden. Die Vektoren sollen dabei nur in die Blutzirkulation der Beine injiziert werden, weil die Vektoren nur in begrenzten Mengen produziert werden können. Dadurch ließe sich die Verteilung der Viren in den ganzen Körper vermeiden aber trotzdem wahrscheinlich die Gehfähigkeit verlängern.

Eine einzelne Injektion von sowohl AAV-Typ-6 oder Typ-8 Mini-Dystrophin-Vektoren in die vorübergehend blockierte Blutzirkulation eines Hinterbeins von mdx-Mäusen produzierte Mini-Dystrophin in mehr als 80% der Fasern in den Beinmuskeln und eine deutliche Verbesserung ihrer Funktion bis zu einem Jahr.

Diese Experimente wurden mit Makaue-Affen wiederholt, deren Körperstruktur und Gewicht ähnlich wie die eines kleinen Kindes sind. Aber diese Tiere hatten keine Dystrophie, sie hatten also ihr eigenes Dystrophin. Die Vektoren transportierten ein grün fluoreszierendes künstliches Signalprotein, das durch ihr Fluoreszenzlicht leicht nachzuweisen ist. Die Ergebnisse waren wieder sehr positiv: 60 bis 80% der Fasern in den Beinmuskeln enthielten das transferierte fluoreszierende Protein.

Aufgrund dieser ermutigenden Ergebnisse der Studien an Mäusen und Affen wird jetzt eine Brücken-Phase-Ia-Studie mit Duchenne-Jungen vorbereitet, die noch 2008 oder erst 2009 beginnen kann. Nach dieser Studie mit der regionalen Anwendung werden die teilnehmenden Jungen wahrscheinlich länger laufen können als ohne die Behandlung und somit eine deutliche Verbesserung ihrer Lebensqualität erhalten.

Rodino-Klapac LR, Janssen ML, et al. and Mendell JJ. A translational approach for limb vascular delivery of the micro-dystrophin gene without high volume or high pressure for treatment of Duchenne muscular dystrophy (Ein Versuch zur Übertragung des Mikro-Dystrophin-Gens in die Blutgefäße der Gliedmaßen zur Behandlung der Duchenne-Muskeldystrophie mit kleinen Flüssigkeitsmengen und ohne hohen Druck). *Journal of Translational Medicine*, 2007; 5; 45.

Gentransfer mit Plasmiden. In Zusammenarbeit mit der französischen Muskeldystrophiegesellschaft AFM begann die Firma *Transgène* in Straßburg 1995 einen Dystrophin-Gentransfer mit Plasmiden zu entwickeln. Diese Arbeiten wurden damals von Dr. *Serge Braun* geleitet, der jetzt Forschungsdirektor der AFM ist. Für diese Technik wurden die aneinandergehängten 79 DNA-Exons des Dystrophin-Gens, die cDNA, mit ihren Kontrollstrukturen in das genetische Material von Plasmiden eingebaut. Plasmide sind kleine kreisförmige DNA-Strukturen ohne Proteine, *nackte DNA*, in Bakterien außerhalb des Zellkerns, die sie

hauptsächlich resistent gegen Antibiotika machen.

Nach erfolgreichen Experimenten an Muskelzellkulturen und mit dystrophischen Mäusen und Hunden wurde eine erste klinische Studie Ende 2000 mit neun Duchenne- und Becker-Patienten gestartet, die älter als 15 Jahre waren, denn sie mußten in der Lage sein, ihre „informierte“ (ihre verstandene) Einwilligung zu geben. Die Plasmidlösung wurde in einen einzelnen Muskel des Unterarms injiziert. Etwas neues Dystrophin in normaler Länge erschien in bis zu 25% der Muskelfasern um die Injektionsstelle herum. Es gab keine Immunreaktionen, weder gegen die Plasmidkonstruktion noch gegen das neue Dystrophin. Diese Phase-I-Studie zeigte also, daß der Gentransfer mit nackter DNA eine sichere Methode ist

Die französischen Forscher begannen dann eine Zusammenarbeit mit dem Team von Dr. *Jon Wolff* in der Firma *Mirus* in Madison/ Wisconsin, bei der ähnliche Plasmidkonstruktionen in die Venen von einzelnen Gliedmaßen von Mäusen, Ratten und Affen *unter Druck* injiziert wurden. Der Druck wurde durch die kurzzeitige Blockade der Blutzirkulation mit einer Blutdruckmanschette erzeugt.

Sobald genügend Plasmidvektoren mit dem genetischen Material des Dystrophin-Gens zur Verfügung stehen, wird eine klinische Studie mit Duchenne-Patienten begonnen, weil diese Methode der Übertragung des Gens normaler Länge für Patienten wichtig ist, denen nicht mit Exon-Skipping geholfen werden kann.

Myogene Zellübertragung. Prof. *Jacques Tremblay* und seine Kollegen an der Laval Universität in Québec City, Kanada, arbeiten weiter an der Myoblastentransfer-Technik, die jetzt *Übertragung myogener Zellen* genannt wird.

In einer klinischen Studie mit neun Duchenne-Patienten konnten sie zeigen, daß nach der Injektion normaler myogener Zellen, Myoblasten, eines Verwandten in acht Patienten bis zu 26% der Muskelfasern neues normales Dystrophin erzeugt werden konnte. Die sehr zahlreichen Injektionen der myogenen Zellen erfolgten in einem Abstand von ein bis zwei Millimeter Entfernung voneinander in eine kleine Region des Schienbeinmuskels *Tibialis anterior*.

Diese Art der Zelltransplantation hätte mehrere Vorteile: (1) Das neue Dystrophin-Gen würde die normale Länge haben und seine eigenen Kontrollsequenzen mit sich bringen; (2) die Wirkung würde langfristig sein; (3) die Technik könnte mit pharmakologischen Behandlungen kombiniert werden, und vor allem, (4) sie könnte auch älteren Patienten helfen.

Da etwa 100 Injektionen pro Quadratmeter Muskeloberfläche notwendig sind, wurde die Technik zuerst an mehreren Affen ohne Probleme ausprobiert, bevor sie an zwei mehr als 18 Jahre alten Duchenne-Patienten angewendet wurde. Beide Patienten erhielten ihre Injektionen unter Lokalanästhesie in einen oder mehrere ganze Muskeln. Einer der Patienten war bei der Behandlung 26 Jahre alt. Achtzehn Monate später hatten 34% der Muskelfasern in einem Biopsiepräparat des älteren Patienten das vom Spender der myogenen Zellen stammende Dystrophin. In diesem Patienten hatte die Zelltransplantation die Stärke des Muskels verdoppelt, der den Daumen bewegt, es war der einzige Muskel, den der Patient noch bewegen konnte. Doch da der Patient wußte, wohin er die Injektionen bekommen hatte, ist es möglich, daß es sich dabei um einen

Placebo-Effekt handelte.

Der zweite Patient war 18 Jahre alt, er erhielt die myogenen Zellen nur in den Muskel, der das Handgelenk bewegt. Er zeigte eine kleine Verbesserung der Muskelkraft nach drei Monaten, die jedoch nach sechs Monaten wieder verschwunden war. In dem behandelten Muskel dieses Patienten konnten nach sechs Monaten keine Dystrophin-positiven Fasern mehr nachgewiesen werden und es gab Zeichen einer Zellabwehr. Beide Patienten versicherten, sie

wären ohne zu zögern bereit, weitere Injektionen in andere Muskeln zu bekommen.

Dr. Tremblay und seine Kollegen versuchen jetzt, die Transplantation myogener Zellen mit der Hemmung von Myostatin zu kombinieren, und sie arbeiten auch an der Entwicklung einer „tolerigenen“ Technik, die es erlauben würde, langfristig ohne immununterdrückende Medikamente auszukommen.

Stammzellen

Muskelregeneration mit differenzierenden embryonalen Stammzellen. Während der Entwicklung eines Embryos erscheinen die Vorläufer der Skelettmuskeln sehr früh als *Somiten*, das sind mesodermale Strukturen auf beiden Seiten des embryonalen Neuralrohrs. Unter dem Einfluß von Transkriptionsfaktoren (Proteinen, die die Gen-Aktivität kontrollieren, hier besonders Pax3) differenzieren die Somiten (sie entwickeln sich zu mehr spezialisierten Zellen) und bilden, unter anderen Strukturen, die Myotome, welche sich weiter zu Myoblasten, Myotuben und schließlich zu Muskelfasern entwickeln. Wenn es möglich wäre, aus den nicht-dystrophischen Somiten diejenigen Zellen zu isolieren, die zu den Myotomen werden, könnten man sie vermehren und dann zur Regeneration von dystrophischen Muskelzellen einsetzen, weil sie ihr intaktes Dystrophin-Gen mit sich bringen würden.

Prof. **Rita Perlingeiro** und ihr Team im Southwestern Medical Center der Universität von Texas in Dallas haben versucht, in Zellkulturen solche frühen Somiten-Zellen aus embryonalen Stammzellen von Mäusen zu isolieren. Sie stellten fest, daß die differenzierenden embryonalen Stammzellen den Transkriptionsfaktor Pax3 brauchen, um in den Somiten die myogenen (die muskelbildenden) Zellen zu bilden. Sie mußten dazu das Gen für den Faktor Pax3 in das X-Chromosom gentechnisch einfügen. Mit Hilfe der Fließzytometrie (einer Zellsortierungsmethode) konnten die Forscher die myogenen Zellen aus diesen durch Pax3 induzierten embryonalen Stammzellen isolieren, nachdem sie sich fünf Tage lang differenziert hatten. Stammzellen, die den PDGF α -Rezeptor hatten und nicht den Flk-1-Rezeptor, produzierten eine Zellpopulation, die nur Muskelfasern enthielten und kein Krebsrisiko mit sich brachten.

Zellen mit diesen Eigenschaften wurden multipliziert und dann lokal in den Tibialis-anterior-Muskel und in die Blutzirkulation von mdx-Mäusen injiziert. Neues Dystrophin erschien in 11 bis 16% aller Muskelfasern, wodurch sich die Muskelkraft deutlich verbesserte. Wie in anderen Gentherapie-Experimenten gezeigt worden war, brauchen für einen deutlichen therapeutischen Effekt nicht alle Fasern eines Muskels Dystrophin enthalten. Deshalb kann dieser Weg über die embryonalen Stammzellen zu einer wirksamen Therapie der Duchenne-Muskeldystrophie werden.

Darabi R, Gehlbach K, Bachoo RM, et al. and Perlingeiro RCR. Functional skeletal muscle regeneration from differentiating embryonic stem cells (Regeneration funktionsfähiger Skelettmuskeln mit differenzierenden embryonalen Stammzellen). *Nature Medicine*, 2008;14:134-143.

Muskelregeneration mit Muskelstammzellen. Stammzellen, die für eine Duchenne-Therapie benutzt werden können, sollten die folgenden Eigenschaften haben: (1) Sie müssen leicht aus menschlichem biologischen Material, wie Muskelgewebe, isoliert werden können; (2) sie sollten leicht im Laboratorium zu vermehren sein bis zu Mengen, die für eine systemische Behandlung von Kindern notwendig sind; (3) es sollte möglich sein, in sie „gesunde“ Dystrophin-Gensequenzen mit Virusvektoren zu transferieren; (4) die systemische Injektion in die Blutzirkulation sollte möglich sein; (5) sie müssen vom Blut in die Muskeln wandern können; (6) sie müssen im dystrophischen Muskelgewebe zu großen Mengen von funktionsfähigen Muskelzellen führen mit Dystrophin und funktionsfähigen Satellitenzellen, und (7) sie sollten keine ernstesten Nebenwirkungen hervorrufen, vor allem keinen Krebs.

Zwei Typen von Zellen sind identifiziert worden, die diese Eigenschaften haben und die keine embryonalen sondern adulte (erwachsene) Stammzellen sind: *Mesoangioblasten* und *Perizyten*, die an der Außenseite der Kapillaren (der kleinen Blutgefäße) im Muskelgewebe vorkommen von dort isoliert werden können.

Nach positiven Experimenten mit Mesoangioblasten an Mäusen, denen das Protein *Alpha-Sarkoglykan* fehlte, isolierten Prof. **Giulio Cossu** und seine Kollegen im Stammzell-Institut des Hospitals San Raffaele in Mailand den Mesoangioblasten ähnliche Zellen aus den Wänden der Kapillaren von normalem und dystrophischem menschlichen Muskelgewebe, die sie *Perizyten* nannten. Sie injizierten diese Zellen systemisch in mdx-Mäuse, deren Immunsystem inaktiviert war. Bevor die italienischen Forscher die dystrophischen Perizyten injizierten, transferierten sie in sie mit Virusvektoren Minidystrophin-Gene. In beiden Fällen produzierten danach eine große Zahl der Muskelfasern der mdx-Mäuse neues Dystrophin und ihre Muskelfunktion hatte sich deutlich verbessert.

Als nächsten Schritt zur einer Anwendung beim Menschen, behandelte Dr. Cossus Team vier dystrophische Hunde systemisch mit Zellen aus ihrem eigenen Muskelgewebe (autologe Behandlung), in die das Gen für das menschliche Minidystrophin transferiert worden war. Sechs andere dystrophische Hunde wurden mit den Zellen von gesunden Hunden behandelt (heterologe Behandlung), die das normale Dystrophin-Gen und -Protein enthielten; dies erforderte aber eine Immununterdrückung mit Cyclosporin.

Die Ergebnisse waren viel besser nach der heterologen als nach der autologen Behandlung. Ein Hund, der die Zellen durch einen Katheter in die Aorta erhielt, konnte fünf

Monate nach der letzten von fünf wöchentlichen Behandlungen gut laufen. Die anderen fünf Hunde erholten sich viel langsamer.

Die autologen Experimente mit den Hunden werden jetzt wiederholt mit Stammzellen, die längere Dystrophin-Gensequenzen enthalten. Außerdem werden Kontrollexperimente durchgeführt, um den Einfluß von Cyclosporin allein zu bestimmen, und um zu sehen, ob die Satellitenzellen auf den neuen Muskelfasern auch funktionsfähig sind. Nach weiteren Langzeitversuchen, wiederum mit Hunden, und der Herstellung der Zellen nach klinischen Reinheitsvorschriften, wird eine klinische Phase-I-Studie mit Duchenne-Patienten begonnen, um die Sicherheit zu prüfen und um nachzuweisen, ob sich wenigstens etwas neues Dystrophin gebildet hat.

Muskel-Regeneration mit genetisch exon-geskippten Stammzellen. Die Arbeitsgruppen von Prof. *Luis García* am Généthon-Institut in Évry bei Paris und von Prof. *Yvan Torrente* im Stammzell-Laboratorium der Universität Mailand arbeiten zusammen an einer neuen Gentherapie der Duchenne-Muskeldystrophie. Sie isolierten Stammzellen aus Muskeln von Duchenne-Patienten, reparierten die mRNA ihres Dystrophins mit einer genetischen Exon-Skipping-Methode und transferierten sie in mdx-Mäuse, wo sie deren Muskelfasern regenerierten und ihre dystrophischen Symptome deutlich abmilderten.

Es folgt hier eine sehr vereinfachte Zusammenfassung einer komplizierten Forschungsstrategie, zu der viele, hier nicht erwähnte, zusätzliche biochemische Kontroll- und Aktivitäts-Experimente gehören und auch biologische Muskelfunktionstests.

Die Stammzellen – es waren hauptsächlich Satellitenzellen – wurden aus biotischem Material von Duchenne-Jungen erhalten, die eine Deletion der Exons 49 und 50 hatten. Für ihre Experimente verwendete das französisch-italienische Forscherteam nur die etwa 1% der Zellen, die das Marker-Protein CD133 in ihren Membranen enthielten. Es war bereits bekannt, daß diese Zellen in der Lage sind, Muskelzellen zu reparieren und neue im geschädigten Muskelgewebe zu bilden. Diese CD133-positiven Zellen wurden in Zellkultur im Laboratorium vermehrt und dann

mit Lentivirus-Vektoren behandelt, die in ihrem genetischem Material die Gene von zwei AONs für das Skippen von Exon 51 trugen. Diese Technik ähnelte derjenigen für das genetische Skippen von Exon 23 der mdx-Mäuse, das in diesem Bericht auf Seite 5 beschrieben ist.

Vierundzwanzig Stunden vor den Experimenten mit zwei Monate alten scid/mdx-Mäusen, die weder Dystrophin noch ein funktionierendes Immunsystem hatten, mußten die Tiere schwimmen, damit sie durch diesen körperlichen Streß ihren Degenerations-Regenerations-Prozeß intensivierten. Vierundzwanzig dieser Mäuse erhielten 20.000 bis 40.000 der genetisch veränderten menschlichen Zellen von einem Duchenne-Jungen in drei Injektionen lokal in einen Tibialis-anterior-Muskel gespritzt. Sechs andere Mäuse wurden systemisch behandelt durch die Injektion von 500.000 dieser Stammzellen in die Oberschenkelarterie eines Beins. Einundzwanzig und 45 Tage nach diesen lokalen und systemischen Injektionen wurden viele Tests durchgeführt, um das Ergebnis dieser komplexen Gentherapie zu dokumentieren.

Gefunden wurde eine verbesserte Muskelregeneration, eine große Menge des erwarteten Dystrophin-Proteins in den regenerierten Fasern ohne die Aminosäuren, die von den Exons 49, 50 und 51 determiniert werden, eine verbesserte Muskel-Morphologie (Muskelstruktur) und eine deutlich normalisierte Muskelfunktion.

Diese Technik öffnet den Weg zu einer neuen Duchenne-Therapie. Bevor jedoch klinische Studien beginnen können, muß der Mechanismus des Exon-Skippings mit Lentivirus-Vektoren genau verstanden sein, weil sich diese Viren mit ihrer Ladung in das genetische Material irgendeines Chromosoms der Muskelzellen nach dem Zufallsgang einbauen. Möglicherweise könnten sie deswegen andere Gene stören oder sogar Tumoren auslösen.

Benchaouir R, Merigalli M, Farini A, et al. and García L, Torrente Y. Restoration of human dystrophin following transplantation of exon-skipping-engineered DMD patient stem cells into dystrophic mice (Wiederherstellung des menschlichen Dystrophins in mdx-Mäusen nach der Transplantation von Stammzellen eines Duchenne-Patienten, an denen Exon-Skipping durchgeführt wurde). *Stem Cell* 2007; 1; 646-657.

Pharmakologische Therapien

Behandlung mit Steroiden. Bei der Jahrestagung von ActionDuchenne (früher PPUK) in London im November 2007 gab Prof. *Adnan Manzur* vom Hammersmith Hospital in London eine Übersicht über den heutigen Stand der Steroid-Behandlung, der zur Zeit einzigen medikamentösen Behandlung, die erwiesenermaßen die Muskeln von Duchenne-Jungen für eine begrenzte Zeit erhalten kann. Die Behandlung ist jetzt zum „Goldstandard“ geworden, mit dem andere, neu entwickelte Behandlungen verglichen werden.

Bisher sind 47 klinische Studien mit Steroiden in vielen Ländern durchgeführt worden, aber nur sechs davon waren wissenschaftlich einwandfreie doppelblinde Studien mit vollständig veröffentlichten Ergebnissen. In den meisten Studien wurde die tägliche Gabe der Medikamente untersucht, aber andere Methoden, wie 10 Tage mit und dann

10 Tage ohne Medikation, oder nur 10 aufeinanderfolgende Tage mit Medikation pro Monat wurden auch geprüft. Hier folgt eine Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse:

Die erste der Doppelblindstudien wurde 1991 von *Fenichel* und Kollegen in den USA mit 99 Duchenne-Jungen durchgeführt, die 0,75 mg/kg/Tag Prednison über zwei Jahre bekamen. Die Ergebnisse zeigten zum ersten Mal wissenschaftlich einwandfrei, daß diese Behandlung die Muskelkraft der Patienten über etwa drei Jahre verbessern und stabilisieren kann. Aber 73% der Jungen hatten Nebenwirkungen, meistens übermäßige Gewichtszunahme.

In einer Doppelblindstudie in Deutschland wurden von *Reitter* und Kollegen im Jahr 2000 die beiden Steroide *Prednison* und *Deflazacort* in einer Behandlung von 100 Jungen miteinander verglichen. Die Gewichtszunahme war

bei den mit Prednison behandelten Jungen deutlich größer als bei denen, die Deflazacort bekamen. Aber Deflazacort führte mehr als Prednison zu relativ unbedeutenden Katarakten (Trübungen der Augenlinsen). Diese Studie ist bisher nicht vollständig veröffentlicht worden.

Biggar und Mitarbeiter in Kanada veröffentlichten 2006 die Ergebnisse einer offenen Langzeitstudie an 74 Jungen, die 10 bis 18 Jahre alt waren. Vierzig Jungen wurden täglich mit 0,9 mg/kg/Tag Deflazacort im Durchschnitt 5,5 Jahre lang behandelt. Die 34 nicht behandelten Jungen verloren ihre Gehfähigkeit im Durchschnitt mit 9,8 Jahren. Von den behandelten Jungen konnten 81% noch mit 12 Jahren gehen, 76% mit 15 Jahren und 30% mit 18 Jahren. Die Atem- und Herzfunktionen blieben deutlich besser und eine Skoliose (Rückgratverkrümmung) entwickelte sich weniger häufig in den behandelten Jungen.

King und Kollegen in den USA untersuchten 2007 den klinischen Verlauf von 143 Jungen, von denen 75 täglich hauptsächlich mit Deflazacort im Durchschnitt 8 Jahre lang behandelt worden waren, 68 Jungen wurden nicht behandelt. Die behandelten Jungen konnten durchschnittlich 3,3 Jahre länger gehen und hatten ein deutlich geringeres Risiko, eine Skoliose zu entwickeln als die nicht behandelten Jungen. Aber sie hatten gegenüber den nicht behandelten Jungen ein erhöhtes Risiko für Brüche des Rückgrats und der Beine wegen einer Osteoporose.

Dr. Manzur beendete seine Übersicht mit folgender Schlußfolgerung: „Die Langzeitanwendung der Steroide Prednison und des ähnlichen Deflazacort verbessern die Muskelkraft und Muskelfunktion, verlängern die Gehfähigkeit um einige Jahre, verbessern die Lungen- und Herzfunktionen, reduzieren das Risiko für Skoliosen, und verbessern die Lebensqualität.“

Die positiven Wirkungen sind deutlicher, wenn die Behandlung früh begonnen wird, ungefähr im Alter von vier Jahren, und wenn die Medikamente täglich gegeben werden. Die Nebenwirkungen, besonders von Prednison, sind erhöhter Appetit und das führt zu übermäßigem Gewichtszuwachs und einem Cushing-Gesicht (Mondgesicht), falls eine strikte proteinreiche und fettarme Diät vom Beginn der Behandlung an nicht eingehalten wird. Beide Medikamente verursachen auch ein reduziertes Wachstum, ein erhöhtes Risiko für Knochenbrüche und in manchen Fällen Verhaltensänderungen. Deflazacort führt zu ziemlich gutartigen Katarakten, die nicht behandelt werden müssen.“

Da weitere Forschungen nötig sind, plant das *North Star Clinical Network* (das klinische Netz „Polarstern“ von 15 britischen Zentren mit den Elternorganisationen Muscular Dystrophy Campaign und ActionDuchenne), die Steroid-Therapie von noch gehfähigen Duchenne-Jungen zu optimieren und zu standardisieren, indem eine klinische Datenbank eingerichtet wird und allen Jungen über vier Jahren oder sogar früher eine tägliche und unterbrochene Behandlung angeboten wird mit wissenschaftlichen und klinischen Tests und Untersuchungen vor, während und nach der Behandlung.

TREAT-NMD, das *European Neuromuscular Network* hat auf acht Seiten vorläufige Empfehlungen für eine standardisierte klinische Betreuung bei Duchenne-Muskeldystrophie veröffentlicht, darunter auch über die Behandlung mit Steroiden. Dieser englische Text kann aus dem Internet unter www.treat-nmd.eu/soc/eng/dmd/ heruntergela-

den werden.

Fenichel GM, Florence JM, Pestronk A, Mendell JR, et al. Long-term benefit from prednisone therapy in Duchenne muscular dystrophy (Vorteile einer Langzeittherapie mit Prednison bei Duchenne-Muskeldystrophie. *Neurology* 1991;12; 1874-1877.

Biggar WD, Harris VA, Eliasoph L, Alman B. Long-term benefits of deflazacort treatment for boys with Duchenne muscular dystrophy in their second decade (Vorteile einer Langzeitbehandlung von Duchenne-Jungen mit Deflazacort in ihrem zweiten Lebensjahrzehnt). *Neuromuscular Disorders* 2006; 16; 249-255.

King WM, Ruttencutter R, Nagaraja HN, et al. Orthopedic outcome of long-term daily corticoid treatment in Duchenne muscular dystrophy (Orthopädische Konsequenzen einer täglichen Langzeitbehandlung mit Steroiden). *Neurology* 2007; 68; 1607-1613.

Klinischer Versuch mit Prednison und Cyclosporin.

Eine solche Studie wird in Deutschland unter der Leitung von Prof. *Rudolf Korinthenberg* an der Kinderklinik der Universität Freiburg durchgeführt, deren Ziel es ist, die Nebenwirkungen bei der Behandlung mit Prednison durch die Kombination mit Cyclosporin möglicherweise zu reduzieren. Cyclosporin ist ein Medikament zur Unterdrückung von Immunreaktionen.

Diese Studie hat 2004 an 15 deutschen Muskelzentren begonnen. Eine Hälfte der Patienten erhält 3,5 bis 4 mg/kg/Tag Cyclosporin kombiniert mit 0,75 mg/kg/Tag Prednison und die andere Hälfte die gleiche Prednison-Dosis allein mit einem Placebo anstelle von Cyclosporin. Jeder Patient wird 15 Monate lang behandelt. Um die Studie korrekt auswerten zu können, müssen mindestens 150 Patienten teilnehmen. So viele sind inzwischen aufgenommen worden, und die meisten haben ihre Behandlung schon beendet.

Weil die Studie doppelblind durchgeführt wird, können keine Ergebnisse über die Wirkung der kombinierten Prednison-Cyclosporin-Behandlung mitgeteilt werden, bevor alle Daten vollständig ausgewertet sind. Die Studie ließ sich aber gut durchführen, und es sind keine ernstesten Nebenwirkungen aufgetreten. Eine detaillierte Veröffentlichung wird für Ende 2008 erwartet.

Hochregulieren von Utrophin, um Dystrophin zu ersetzen.

Utrophin ist ein Protein, dessen Struktur und Funktion dem Dystrophin sehr ähnlich sind. Beim Menschen liegt sein Gen auf Chromosom 6, es hat 75 Exons und ist etwa eine Million Basenpaare lang. Es kommt in vielen Geweben des Körpers vor, auch in Muskeln, dort ist es aber in den motorischen Endplatten, den *neuromuskulären Synapsen* konzentriert, an denen die motorischen Nerven die Muskelzellmembranen kontaktieren. In der 12. Woche der fötalen Entwicklung eines Kindes, enthalten die Muskelmembranen sowohl Utrophin als auch Dystrophin. Das Utrophin verschwindet dann, bis bei der Geburt nur noch Dystrophin allein an den Muskelmembranen vorkommt. Utrophin ist also eine fötale Form des Dystrophins.

Mdx-Mäuse, deren Utrophin-Gen experimentell inaktiviert (knocked out) wurde, deren Muskeln also weder Dystrophin noch Utrophin enthalten, haben Duchenne-ähnliche Symptome im Gegensatz zu „normalen“ mdx-Mäusen,

deren Muskeln auch ohne Dystrophin weniger schwere Schädigungen zeigen. Wenn man die Menge des Utrophins in mdx-Mäusen mit genetischen Methoden, die beim Menschen nicht angewendet werden können, um das Drei- bis Vierfache erhöht, kann die Entwicklung ihrer ziemlich milden dystrophischen Symptome vermieden werden. In Duchenne-Patienten verteilt sich das wenige Utrophin von den Endplatten her auf die ganzen Muskelzellmembranen, und je mehr Utrophin ein Patient hat, desto später braucht er einen Rollstuhl. Das bedeutet, daß eine *Hochregulierung* des Utrophin-Gens zu einer Therapie der Duchenne-Dystrophie führen würde.

Utrophin existiert in zwei ähnlichen Formen, aber nur eine der beiden, das A-Utrophin kommt ausschließlich in ziemlich kleinen Mengen in den neuromuskulären Synapsen aller Muskelzellen vor. Die Forscher begannen deshalb, nach Substanzen zu suchen, die das Gen für das A-Utrophin hochregulieren und dann dessen Protein zu den Muskelzellmembranen schicken können, wo es die in Duchenne-Jungen vom Dystrophin verlassenen Stellen einnehmen würde.

Diese Forschungs- und Entwicklungsarbeiten wurden von Prof. Dame *Kay Davies* an der Universität Oxford begonnen und werden jetzt von ihr und ihren Mitarbeitern an der Universität zusammen mit der von ihr gegründeten Firma *Summit plc* in der Nähe von Oxford weitergeführt, dort unter der Leitung von Dr. *Jon Tinsley*.

Bis Ende 2007, wurden über 30.000 chemische Substanzen in einem automatischen Suchverfahren („Screening“) auf ihre Eigenschaft getestet, die Aktivität des Utrophin-Gens in Muskelzellkulturen von mdx-Mäusen hochzuregulieren. Einige aktive Verbindungen wurden dabei identifiziert, und die aussichtsreichsten werden jetzt chemisch optimiert und in lebenden mdx-Mäusen getestet mit dem Ziel, die Menge des A-Utrophins genügend stark in allem Muskeln der Tiere zu vergrößern.

Zusätzliche Screeningtests mit dystrophischen Zebrafischen werden jetzt durchgeführt, um möglicherweise weitere potentielle Medikamente für die Behandlung der Duchenne-Dystrophie zu finden. Zebrafisch-Embryos sind sehr klein (2-3 mm), durchsichtig und nach 24 Stunden voll entwickelt. Ihre Muskelstruktur kann in polarisiertem Licht (Lichtwellen in einer Schwingungsebene) unter dem Mikroskop gut gesehen und analysiert werden. Die Muskelpathologie (die erkrankte Muskelstruktur) der Embryonen ist ähnlich wie die der Duchenne-Muskeln.

Nach weiterer Optimierung führte die aktivste Verbindung, SMT C1100, in mdx-Mäusen zur Wiederherstellung ihrer Muskelfunktionen, weil ihre Degeneration, Fibrose, Fettablagerung und chronischen Entzündungen deutlich vermindert waren. Nach täglichen Injektionen über 28 Tage gab es keine Nebenwirkungen. Wenn die jetzt laufenden toxikologischen Untersuchungen und die Produktion weiter positiv verlaufen, könnten noch 2008 Studien zur Sicherheit mit gesunden Freiwilligen beginnen, auf die dann 2009 klinische Studien mit Duchenne-Patienten folgen werden.

Hochregulieren des Utrophin-Gens mit Biglykan. Während der Embryonalentwicklung ist das Protein Biglykan an der Außenseite der Skelett- und Herzmuskelmembranen lokalisiert und verbindet dort mit seinen beiden Enden die

Proteine Alpha- und Gamma-Sarkoglykan, die beides Komponenten des Dystrophin-Proteinkomplexes sind. Biglykan ist wichtig für die Regulation vieler Signal- und Strukturproteine der Muskelmembranen. Mit Experimenten an nicht-dystrophischen Mäusen, deren Biglykan-Gen deaktiviert war, konnten Prof. *Justin Fallon* und seine Mitarbeiter von der Brown-Universität in Providence, Rhode Island, zeigen, daß beim Fehlen von Biglykan viele Proteine des Dystrophin-Komplexes verschwinden. Die Behandlung dieser Mäuse mit lokalen und systemischen Injektionen von rekombinantem (künstlich hergestelltem) menschlichen Biglykan führte zur Wiederherstellung der Proteine Beta-Syntrophin und Alpha-Dystrobrevin. Dies war ein Hinweis darauf, daß der Dystrophin-Komplex wieder gebildet wurde.

Der überraschendste Befund war aber, daß zwei bis drei Wochen nach einmaligen systemischen Injektionen von menschlichem Biglykan in mdx-Mäuse ihre normal niedrige Menge von Utrophin etwa 2,5-fach hochreguliert war. Nach drei Monaten wiederholter systemischer Injektionen waren die Muskeln dieser Mäuse viel resistenter gegen Schädigungen durch erzwungene Streckungen.

Da die beiden Proteine, an die sich Biglykan bindet, nur in Skelett- und Herzmuskeln vorkommen, könnte Biglykan vor allem in diesen beiden Muskelarten aktiv sein und deswegen nur wenige Nebenwirkungen verursachen. Immunreaktionen sollten kein Problem sein, weil Biglykan während der Embryonalentwicklung in Menschen schon vorhanden ist. Weil es außerhalb der Muskelzellen aktiv ist, müßte es, wenn es als Medikament verwendet wird, nicht die Muskelmembranen durchqueren.

Mit weiteren Tierexperimenten werden jetzt die Bedingungen einer Behandlung optimiert. Und sobald genügend menschliches Biglykan in klinischer Reinheit zur Verfügung steht, könnten klinische Phase-I-Studien in etwa zwei Jahren beginnen.

Transfer des Utrophin-Gens. Prof. *George Karpati* und seine Kollegen an der McGill-Universität in Montreal, Kanada, übertrugen das vollständige Utrophin-Gen mit einer einzigen Injektion eines Adenovirus-Vektor-Systems in den *Tibialis-anterior*-Muskel von neugeborenen und erwachsenen mdx-Mäusen. Danach erschien in 58% der Fasern des injizierten Muskels der neugeborenen und in 35% der erwachsenen Mäuse Utrophin an den Stellen unterhalb der Membranen, die normalerweise vom Dystrophin in gesunden Mäusen besetzt sind. Die Proteine des Dystrophin-Komplexes waren wieder vorhanden und blieben es mindestens ein Jahr lang.

Das neue Utrophin an den Zellmembranen vermied die Nekrose (die dystrophische Schädigung) des injizierten Muskels in den neugeborenen und stoppte sie in den erwachsenen Mäusen. Physiologische Tests zeigten, daß die Funktion des gesamten behandelten Muskels verbessert war. Da Utrophin normalerweise in den neuromuskulären Endplatten vorkommt, gab es keine Immunabwehr gegen das neue Utrophin.

Jedoch die erhöhte Menge an Utrophin in den erwachsenen Mäusen, nicht aber die in den neugeborenen, verschwand mit der Zeit wieder. Dies bedeutet, daß eine solche genetische Behandlung, wenn sie erfolgreich in Duchenne-Jungen wiederholt werden kann, so früh wie mög-

lich angewendet werden müßte.

Deal JR, Danialou G, Larochelle N, et al., and Karpati G. Successful compensation for dystrophin deficiency by a helper-dependent adenovirus expressing full-length utrophin (Erfolgreiche Kompensation des Fehlens von Dystrophin mit einem helferabhängigen Adenovirus, der das normal lange Utrophin-Gen trägt). *Molecular Therapy* 2007; 15; 1767-74.

Durchlesen durch vorzeitige Stoppcodons mit PTC124.

In 13 bis 15% aller Duchenne-Patienten wird die Krankheit durch eine Nonsense-(Unsinn)-Mutation im Dystrophin-Gen verursacht. Diese Art einer Punktmutation ist eine Veränderung einer einzelnen Base in der DNA, die ein vorzeitiges Stoppcodon in der Dystrophin-mRNA verursacht, das zum Abbruch der Proteinsynthese führt, bevor das neue Dystrophin aus seinen Aminosäuren fertig zusammengesetzt ist. Das unfertige Dystrophin ist zu kurz für eine normale Funktion, es wird zerstört, und Duchenne-Muskeldystrophie entwickelt sich.

Die Firma *PTC Therapeutics Inc.* in South Plainfield, New Jersey, hat unter der Leitung von Dr. *Langdon Miller* das Medikament PTC124 entwickelt, das es dem Proteinsynthetisierenden System in der Zelle ermöglicht, durch ein vorzeitiges Stoppcodon *hindurchzulesen*, so daß ein Protein normaler Länge entstehen kann. Diese Art der Behandlung ist weder eine Gentherapie noch Exon-Skipping. Um zu entscheiden, ob ein Junge mit Duchenne-Muskeldystrophie mit PTC124 behandelt werden kann, muß durch eine genetische Analyse bewiesen sein, daß er ein vorzeitiges Stoppcodon in seiner Dystrophin-mRNA hat.

Eine ausführliche Veröffentlichung über dieses neue Medikament einschließlich seiner molekularen Struktur ist im Mai 2007 mit einem Kommentar in der Zeitschrift *Nature* erschienen.

PTC124 ist ein weißes kristallines Pulver, das, in Wasser oder Milch aufgerührt, einfach geschluckt werden kann. PTC124 wurde als eine der aktivsten Substanzen in einem automatischen Suchprogramm unter etwa 800.000 Verbindungen mit niedrigem Molekulargewicht entdeckt, die auf ihre Durchlese-Fähigkeit geprüft wurden. Sie wurde dann chemisch optimiert und im Laboratorium intensiv getestet. In vorklinischen Experimenten konnte in Muskelzellkulturen Dystrophin produziert werden. Mit mdx-Mäusen, die ein vorzeitiges Stoppcodon im Exon 23 ihres Dystrophin-Gens haben, konnte gezeigt werden, daß durch PTC124 wieder normal-langes Dystrophin erschien, das zu einer verminderten Schädigung durch Muskelkontraktionen führte und zu einer Erniedrigung der Creatinkinase-(CK)-Aktivität im Blut. Das bedeutet, daß PTC124 den Muskeln helfen könnte, eine der genetischen Ursachen der Duchenne-Muskeldystrophie zu überwinden.

PTC124 liest nicht durch normale Stoppcodons hindurch, die eine andere strukturelle Umgebung haben, verglichen mit vorzeitigen Stoppcodons. Studien zur Toxizität in Mäusen, Ratten und Hunden mit hohen Dosen zeigten akzeptable Ergebnisse für eine Fortführung der weiteren Entwicklung dieses potentiellen Medikaments.

Eine klinische Phase-I-Studie mit PTC124 wurde mit 61 gesunden, 18 bis 30 Jahre alten erwachsenen Freiwilligen durchgeführt, die das Medikament dreimal pro Tag zwei Wochen lang erhielten. Mit dieser Behandlung konn-

te eine Konzentration im Serum von 2 bis 10 Mikrogramm/ml aufrechterhalten werden, von der bekannt war, daß sie in mdx-Mäusen wirksam ist. Eine Dosis von bis zu 100 mg/kg/Tag wurde von diesen gesunden Erwachsenen ohne Nebenwirkungen gut vertragen. Diese Dosis ist größer als die, die für Duchenne-Jungen vorgesehen ist.

Diese Ergebnisse erlaubten den Beginn einer klinischen Phase-IIa-Studie, die zwischen Dezember 2005 und Mai 2007 durchgeführt wurde, und an der 38 Duchenne-Jungen im Alter von 5 bis 17 Jahre teilnahmen. Sie waren eine repräsentative Gruppe von Patienten: 33 konnten noch gehen, 29 erhielten Steroide, 26 hatten UGA, 6 UAG und 6 UAA als vorzeitige Stoppcodons in den Exons 6 bis 70.

Mit der Studie sollte noch keine therapeutische Wirkung erzielt werden. Sechs Jungen erhielten 16 mg/kg/Tag PTC124, 20 Jungen 40 mg/kg/Tag und 12 Jungen 80 mg/kg/Tag aufgeteilt in drei Portionen pro Tag. Die Patienten wurden bis zu 21 Tage vor der Behandlung klinisch getestet und überwacht, erhielten dann das Medikament an 28 Tagen, und wurden schließlich noch einmal 28 Tage klinisch untersucht und getestet. Muskelgewebe wurde in Biopsien vor und nach der Behandlung vom *Extensor-digitorum-brevis*-(EDB)-Fußmuskel entnommen und auf neues Dystrophin normaler Länge getestet.

Vor der Behandlung war Muskelgewebe von den ersten Biopsien im Laboratorium mit PTC124 behandelt worden. Die von der Dosis abhängige Produktion von normal-langem Dystrophin konnte im Muskelgewebe von allen Jungen nachgewiesen werden.

Bei den Analysen des Muskelgewebes aus den Biopsien nach der Behandlung wurde in 19 der 38 Jungen neues Dystrophin in kleinen Mengen gefunden. Warum es nicht in allen Jungen und nicht in größeren Mengen gefunden wurde, könnte daran gelegen haben, daß die Behandlung nicht genügend lange erfolgte und daß der EDB-Muskel möglicherweise nicht der beste Muskel für die Analyse war, weil seine Degeneration und Regeneration sehr langsam verläuft.

Jedoch alle Jungen zeigten eine Erniedrigung ihrer hohen CK-Werte während der Behandlung. Sie erhöhten sich nach der Behandlung wieder, wie es bei einem Medikament erwartet war, das dauernd genommen werden muß.

Einige Eltern und Lehrer bemerkten zwei bis vier Wochen nach der ziemlich kurzen Behandlung, daß die Jungen aktiver waren, größere Ausdauer hatten, und weniger müde waren als vor der Behandlung.

Obgleich diese anekdotischen Beobachtungen mit Vorsicht betrachtet werden müssen, deutet der zeitliche Verlauf dieser symptomatischen Veränderungen auf eine medikamentöse Wirkung hin. Einige milde bis mäßige negative Effekte wurden auch beobachtet, sie waren aber nicht eindeutig von PTC124 verursacht worden und klinisch belanglos.

Um die Vor- und Nachteile von PTC124 über einen längeren Zeitraum zu bestimmen, ist jetzt mit einer randomisierten und kontrollierten klinischen Langzeit-Phase-IIb Studie (mit einer Doppelblindstudie) begonnen worden. An dieser Studie werden 165 Patienten teilnehmen, die mindestens 5 Jahre alt sind und noch 75 Meter oder mehr laufen können. Jungen, die bereits Steroide bekommen, können sie weiterhin nehmen. Die Teilnehmer werden randomisiert (nach dem Zufall) einer von drei Studi-

engruppen zugeteilt: entweder bekommen sie eine hohe oder eine niedrige PTC124-Dosis oder ein Placebo. Die Behandlung wird 48 Wochen dauern. Gemessen wird während der Behandlung vor allem die Entfernung, für die die Jungen sechs Minuten brauchen („primary outcome measurement“), und mit der gleichen Messung vor der Behandlung verglichen. Zusätzlich werden 10 weitere Messungen („secondary outcome measurements“) vorgenommen. Nach der Studie werden alle Patienten, auch diejenigen, die Placebo bekommen hatten, an einer Langzeit-Therapie mit der hohen PTC124-Dosis teilnehmen können.

Für diese Studie ist ein internationales Komitee gegründet worden, das die Zusammenarbeit vieler klinischer Zentren in Europa, Australien, Israel, Kanada und den Vereinigten Staaten organisieren und beaufsichtigen wird. Die Professoren **Kate Bushby** und **Thomas Voit** sind die europäischen Experten in dem Komitee. Die Studie wird in den USA bereits durchgeführt, in den anderen Ländern wird sie vorbereitet. Falls diese umfangreiche Phase-IIb-Studie gute therapeutische Wirkungen zeigt, wird die Zulassung zur Vermarktung von den Behörden FDA in den USA und EMEA in Europa beantragt werden.

Welch EM, Barton ER, Zhuo J. PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations (PTC124 therapiert genetische Krankheiten, die von Unsinn-Mutationen verursacht werden). *Nature* 2007; 447: 87-91. Schmitz A, Famulok M. Ignore the nonsense (Kümmere Dich nicht um den Unsinn!). *Nature* 2007; 447: 42-3.

Projekt Katalyse ist ein Programm der Firma *PTC Therapeutics* zur Identifizierung und Entwicklung von kleinemolekularen chemischen Substanzen als mögliche Medikamente zur Therapie der Duchenne-Muskeldystrophie.

Unter der Leitung von Dr. **Ellen Welch** wurde das Projekt im Mai 2004 gestartet mit dem Ziel, unter mehreren Hunderttausend Substanzen mit automatischen Testmethoden diejenigen zu finden, die die Produktion, die *Expression*, von vier Proteinen in Muskelzellen herauf- oder herunterregulieren, die die Muskelstruktur in Duchenne-Patienten erhalten oder verbessern können.

Das Herunterregulieren von *Myostatin* und das Hochregulieren des muskelspezifischen *insulinartigen Wachstumfaktors* (IGF-1) würde das Muskelwachstum und die Regeneration fördern. Das Hochregulieren von *Utrophin* und *Alpha7-Integrin* würde die Muskelmembranen stabilisieren und dadurch die Muskelfunktion verbessern.

Die automatischen Methoden zum Auffinden dieser potentiellen Duchenne-Medikamente verwenden ein neu entwickeltes Testverfahren, bei dem die Lichtintensität eines Reporter-Proteins gemessen wird, des Enzyms *Luziferase* aus Glühwürmchen. Eine kleine Zahl von Substanzen mit wenigstens einigen der erwünschten Eigenschaften sind gefunden worden und wurden auch bereits im Laboratorium chemisch optimiert. Außerdem wurde mit Arbeiten an einem anderen Protein begonnen, der *sarkoplasmatischen Reticulum-Ca-ATPase* (SERCA2a), die helfen könnte, die kontraktilen Funktionen des Herzens zu erhalten.

Alle diese sehr aussichtsreichen potentiellen Medikamente werden weiter optimiert, so daß klinische Phase-I-Studien in naher Zukunft beginnen könnten.

Hemmung von Myostatin: *Myostatin* ist ein zunächst inaktives Protein aus 375 Aminosäuren, das in den Muskelzellen gebildet wird und von dort in den Blutkreislauf gelangt. Es wird aktiviert, wenn ein Teil seiner Struktur, das sog. *Propeptid*, abgespalten wird, so daß es sich an das Rezeptor-Protein *Activin II* in den Muskelmembranen binden kann. Dort aktiviert es in der Zelle in einer Reihe von chemischen Reaktionen eine Kette von Signalproteinen (eine Kaskade), die schließlich den Zellkern erreichen und dort Muskelgene blockieren. *Myostatin begrenzt* dadurch das Wachstum der Muskeln.

Es gibt Rinder, die belgische *Blaue Rasse*, und Hunde, *Bully Whippets*, englische Rennhunde, die sehr muskulös sind, weil ihr *Myostatin-Gen* durch eine spontane Mutation inaktiviert worden war. Und in Berlin wurde 1999 ein körperlich sehr starker Junge gefunden, dessen Muskeln etwa doppelt so stark wie bei einem normalen Kind sind

Hemmung von Myostatin durch einen Antikörper.

Erwachsene mdx-Mäuse mit einem inaktivierten *Myostatin-Gen*, die weder *Dystrophin* noch *Myostatin* bilden können, haben mehr normale Muskelfasern, weniger Fibrose (Narbengewebe) und regenerieren ihre Muskeln schneller als „normale“ mdx-Mäuse, wie Prof. **Kathryn Wagner** und ihre Mitarbeiter im Wellstone-Muskelzentrum der Johns-Hopkins-Universität in Baltimore zeigen konnten.

Dies deutet darauf hin, daß das Herunterregulieren oder die Hemmung von *Myostatin* die Regeneration von Muskelfasern in Duchenne-Jungen stimulieren könnte, so daß sie nicht so schnell degenerieren oder sogar größer würden.

Die Firma *Wyeth Pharmaceuticals* in Collegeville bei Philadelphia in Zusammenarbeit mit Dr. **Wagner** publizierete vor kurzem die Ergebnisse einer klinischen Phase-I/II-Studie mit *Myo-029*, einem spezifischen menschlichen Antikörper gegen *Myostatin*, der systemisch injiziert wurde. Die Studie wurde an 116 Erwachsenen mit Muskeldystrophie einschließlich Becker-Patienten durchgeführt, die intravenös *Myo-029* in vier verschiedenen Dosen zwischen 1 und 30 mg/kg alle zwei Wochen über 24 Wochen bekommen gefolgt von 12 Wochen klinischer Überwachung.

Das Ziel dieser Studie war es, auf Sicherheit zu testen und auf eventuelle Wirksamkeit. Die Ergebnisse zeigten, daß bei der untersuchten Dosierung *Myo-029* sicher war und daß es auch die Muskelmasse in Becker-Patienten vergrößerte. Es konnte jedoch keine Verbesserung der Muskelfunktion am Ende der sechs Monate dauernden Behandlung nachgewiesen werden. Weitere klinische Studien mit anderen *Myostatin-Hemmstoffen* sind jetzt von mehreren pharmazeutischen Firmen in den USA geplant.

Wagner KR, Fleckenstein JL, Amato AA, et al. and Mendell JR. A phase I/II trial of MYO-029 in adult subjects with muscular dystrophy Eine Phase-I/II klinische Studie mit MYO-029 an erwachsenen Patienten mit Muskeldystrophie). *Ann. Neurology* 2008; March 11.

Hemmung von Myostatin mit seinem Propeptid.

Prof. **Keith Foster** von der School of Biological Sciences der Universität London und seine Kollegen verwendeten ein stabilisiertes *Propeptid*, um *Myostatin* zu binden und es dadurch zu inaktivieren. Sie transferierten die genetische Sequenz für das *Propeptid* mit Plasmiden (nackte DNA) in einen einzelnen Muskel von nicht-dystrophischen Mäusen, oder systemisch mit einem AAV8-Vektor in ihre Blutzir-

kulation. In beiden Fällen vergrößerten sich nach 10 Wochen vor allem die langsamen Muskelfasern und verbesserte sich die Muskelfunktion um jeweils 20-30%. Allerdings führte die gleiche Behandlung von mdx-Mäusen nicht zu vergrößerten Muskeln oder verbesserter Funktion. Eine gleichzeitige Übertragung der Gene für Propeptid und Mini-Dystrophin zeigte in mdx-Mäusen auch keine positive Wirkung. Aber diese Kombination wäre in Zukunft eine therapeutische Strategie, um neue Fasern zu erzeugen und sie auch zu vergrößern. Mdx-Mäuse brauchen wahrscheinlich eine höhere Dosierung, denn sie produzieren mehr Myostatin als nicht-dystrophische Mäuse. Dies wird jetzt weiter untersucht.

Hemmung von Myostatin mit Follistatin. *Follistatin-344* ist ein hormonähnliches Protein, das aus einer Kette von 344 Aminosäuren besteht und durch die Abspaltung von 29 Aminosäuren von seinem Carboxylende zu Follistatin-315 aktiviert wird. Follistatin-315 zusammen mit zwei ähnlichen Proteinen, deren lange englische Namen zu FLRG und GASP-1 abgekürzt werden, sind an der Regulierung der Aktivität von Myostatin direkt beteiligt, indem sie *Activin*, seinen Rezeptor, und indirekt auch andere bisher unbekannte Reaktionswege blockieren.

Asst. Prof. **Brian Kaspar** vom Nationwide Children's Hospital der Ohio-State-University in Columbus und seine Kollegen transferierten die drei Gene für das menschliche Follistatin 344, FLRG und GASP-1 mit AAV-Typ-1-Vektoren lokal in einzelne Muskeln, *Quadriceps* und *Tibialis anterior*, von normalen und mdx-Mäusen. Zur Kontrolle wurde grünes fluoreszierendes Protein unter den gleichen Bedingungen transferiert. Die Injektion von 100 Milliarden AAV1-Vektoren in vier Wochen alte *normale* Mäuse führte nach 725 Tagen, etwa 2 Jahre, zu einer Vergrößerung der Körpermasse mit einer sichtbaren starken Vergrößerung der Muskeln nicht nur derjenigen, in die injiziert wurde, sondern auch in andere wie den *Triceps*. Das bedeutet, daß diese ziemlich lokale Behandlung auch andere Muskeln beeinflussen konnte. Mit dem funktionellen Festhaltetest – die Tiere müssen sich an einem drehenden Glasstab festhalten bis sie herunterfallen – konnte gezeigt werden, daß sich die allgemeine Muskelkraft des ganzen Tieres verbessert hatte.

In Experimenten, die die Bedingungen einer Behandlung von Duchenne-Jungen besser berücksichtigte, erhielten *mdx-Mäuse* entweder 10 oder 100 Milliarden Viruspartikel injiziert. Diese dystrophischen Mäuse waren bei der einmaligen Injektion entweder drei Wochen alt und wurden dann nach fünf Monaten untersucht, oder – und das wird für eine spätere Behandlung von älteren Patienten wichtig sein – sie waren bei der Injektion 210 Tage alt, das sind sieben Monate, als sie schon deutliche Krankheitssymptome hatten, und sie wurden bis zum Alter von 560 Tagen, also bis sie etwa 1½ Jahre alt waren, klinisch überwacht. Bereits 60 Tage nach der Behandlung zeigten sie eine Verbesserung der Muskelkraft, die bis zum Ende des Experiments erhalten blieb.

Bei all diesen Experimenten gab es keine offensichtlichen Sicherheitsprobleme, weder mit den Viren noch mit den therapeutischen Proteinen Follistatin und den beiden anderen. Das Ergebnis waren widerstandsfähige Muskeln mit vergrößerten Muskelfasern, reduzierten Entzündungen und weniger Fibrose verglichen mit Kontrolltieren.

Prof. **Kaspar** stellte am Ende der Veröffentlichung der Experimente fest: „Die überraschende Fähigkeit von Follistatin, eine lang anhaltende deutliche funktionelle Verbesserung der dystrophischen Muskeln in alten Tieren hervorzurufen, ermutigt uns, diese Methode klinisch zur Behandlung von neuromuskulären Krankheiten weiterzuentwickeln einschließlich für ältere Duchenne-Patienten.“

Haidet AM, Rizo L, Handy C, et al. and Mendell JR, Kaspar BK. Long-term enhancement of skeletal muscle mass and strength by single gene administration of myostatin inhibitors (Langzeit-Vergrößerung der Skelettmuskel-Masse und -Funktion durch einmalige Übertragung der Gene von Myostatin-Hemmstoffen). *Proc. Natl. Acad. Sciences* 2008; 105; 4318-4322.

Hemmung von TGF-beta. Der *transformierende Wachstumsfaktor beta* (TGFβ) ist ein Protein, das die Satellitenzellen (Muskelstammzellen) in regenerierendem Muskelgewebe hemmt. Mdx-Mäuse und auch Duchenne-Jungen haben erhöhte Konzentrationen von TGFβ, und das führt zu Fibrose (Narbengewebe), das von einer überhöhten Produktion von Bindegewebe und seiner Ablagerung zwischen den Muskelfasern verursacht wird, wo es den Platz von zerstörten Fasern einnimmt. Unter normalen Umständen hält das Bindegewebe die Muskelfasern zusammen, aber erhöhte Mengen führen zu Muskelsteifheit und Kontrakturen. Bindegewebe besteht hauptsächlich aus dem Protein Kollagen, einem ziemlich unelastischen Molekül, das von den Fibroblasten gebildet wird. Deshalb könnte die Hemmung der Aktivität von TGFβ mit einem Medikament eine mögliche Methode zur Vermeidung von Fibrose sein.

Prof. **Andrew Hoey** an der University of Southern Queensland in Toowoomba, Australien, und seine Mitarbeiter testeten deswegen *Pirfenidon*, ein zugelassenes Medikament für die Behandlung von Lungenfibrose. Acht Monate alte mdx-Mäuse wurden damit sieben Monate lang behandelt und hatten danach weniger TGFβ und eine wieder fast normal gewordene Herzfunktion, aber die Fibrose war in diesen alten Mäusen nicht vermindert worden. Mit weiteren Experimenten soll getestet werden, ob dieses Medikament in jüngeren Mäusen wirksamer ist.

Van Erp C, Irwin NG, Hoey AJ. Long-term administration of pirfenidone improves cardiac function in mdx mice (Die Langzeitbehandlung mit Pirfenidon verbessert die Herzfunktion in mdx-Mäusen). *Muscle Nerve* 2006, 34; 727-734.

Losartan und TGFβ. Dr. **Ronald Cohn** von der Johns-Hopkins-Universität in Baltimore versucht mit seinen Mitarbeitern ebenfalls, die Krankheit durch die Hemmung von TGFβ zu beeinflussen, das die Fibrose verursacht. Sie begannen ihre Arbeit mit älteren mdx-Mäusen, die eine weiter vorgeschrittene Muskeldystrophie haben als die jüngeren. Die Injektion von Cardiotoxin aus Schlangengift in nicht-dystrophische einzelne Muskeln ruft Schädigungen hervor, die aber innerhalb von zwei bis drei Wochen wieder verschwinden. In mdx-Muskeln ist diese Regeneration deutlich beeinträchtigt. Die Behandlung von mdx-Mäusen mit einem Antikörper gegen TGFβ verkürzt die Zeit für die Regeneration.

Da ein solcher Antikörper nicht auf dem Markt ist, be-

gannen die Wissenschaftler zu testen, ob *Losartan*, ein zugelassenes Medikament gegen hohen Blutdruck, die gleiche Wirkung hat, denn es blockiert den Angiotensin-II-Rezeptor, der einen Schritt weiter in der Reaktionskette der Signalproteine eingreift, die von TGF β beeinflusst wird. Es konnte tatsächlich gezeigt werden, daß eine mehr als ein Jahr lange Behandlung von drei Monate alten mdx-Mäusen mit Losartan viele ihrer dystrophischen Symptome abschwächt wie die Fibrose in den Muskeln und die Müdigkeit in Muskelfunktionstests. Die Mäuse wurden dadurch nicht geheilt, sie waren nur weniger krank. Wenn solche Ergebnisse auch mit Duchenne-Jungen erhalten würden, könnte eine Behandlung mit Losartan eine therapeutische Strategie sein wie andere pharmakologische Behandlungen, die die Symptome verringern aber an der genetischen Ursache der Krankheit nichts ändern.

Dr. *Cohn* und seine Team bereiten jetzt eine doppelblinde klinische Studie mit Losartan vor. Etwa 100 Duchenne-Jungen werden daran teilnehmen, die 5 bis 15 Jahre alt sind und noch gehen können. Die eine Hälfte der Jungen wird ein Jahr lang mit Losartan behandelt werden. Die andere Hälfte wird sechs Monate lang ein Placebo bekommen und dann sechs Monate auch Losartan erhalten. Alle Jungen in beiden Gruppen müssen weiterhin Steroide nehmen, wenn sie schon vor Beginn der Studie damit begonnen hatten. Die wichtigste Messung einer therapeutischen Wirkung, „the primary outcome measure“, wird die Zeit sein, die gebraucht wird, um 30 Fuß (etwa 10 Meter) zu gehen. Änderungen der Lebensqualität und der Atmungsfunktionen werden unter den vielen anderen zusätzlichen Messungen sein, den „secondary outcome measures“.

Die Forscher hoffen, diese Studie noch 2008 starten zu können. Ihre Ergebnisse werden dann etwa zwei Jahre später zur Verfügung stehen. Falls ein signifikanter therapeutischer Effekt nachgewiesen werden kann, wird sofort eine Empfehlung für die Behandlung mit Losartan veröffentlicht werden. Aber bis es soweit ist – und es ist wichtig, dies zu sagen – sollten die Eltern ihren kranken Kindern *kein Losartan geben*. Sie sollen aber alle bisherigen Behandlungsmaßnahmen weiterführen, einschließlich von Steroid- und anderen Behandlungen, um sie im bestmöglichen körperlichen Zustand zu halten.

Cohn RD, van Erp C, Habashi JP, et al. Angiotensin II type 1 receptor blockade attenuates TGF-beta-induced failure of muscle regeneration in multiple myopathic states (Eine Blockade von Angiotensin-II-Typ-I-Rezeptoren vermindert die von TGF β gestoppte Muskelregeneration in mehreren Muskelkrankheiten). *Nature Medicine* 2007; 13, 204-210.

Behandlung von Entzündungen. Der Abbau und das Absterben von Muskelzellen veranlaßt Entzündungszellen in das Muskelgewebe zu wandern, um dort die Zelltrümmer zu beseitigen. Steroide können Entzündungen unterdrücken, und das ist wahrscheinlich der Grund, warum das Medikament *Prednison*, dessen aktive Form *Prednisolon* und das mit ihm verwandte *Deflazacort* in der Lage sind, die Muskelmasse und Muskelkraft zu erhöhen sowie die Immunantwort zu unterdrücken, oft jedoch mit unangenehmen Nebenwirkungen.

Prof. *Melissa Spencer* an der Universität von Kalifornien

in Los Angeles führt mit ihren Mitarbeitern Experimente durch mit dem Ziel, die Steroide durch andere Medikamente zu ersetzen, die ebenfalls den Entzündungen und der Immunantwort ohne ernste Nebenwirkungen entgegenwirken.

Es konnte gezeigt werden, daß einige Zellarten des Immunsystems den Fortschritt der Krankheit beschleunigen. Sie produzieren *Zytokine*, Moleküle, die Entzündungen und die Entwicklung von Fibrose in mdx- und Duchenne-Muskeln begünstigen. In gesunden Menschen ist dies ein normaler Vorgang der Wundheilung, die schwaches Gewebe stabilisiert und die Heilung fördert. In Duchenne-Jungen kann dieser Vorgang nicht mehr kontrolliert werden und wird chronisch wie eine dauernd heilende Wunde. Deshalb wird angenommen, daß die Hemmung von Immunzellen und der aktiven Zytokine wahrscheinlich den Abbau und die Fibrose dystrophischer Muskeln verlangsamen würde. Es gibt bereits eine Reihe von entzündungshemmenden Medikamenten, die von der FDA zugelassen sind und die gegen die Immunzellen bei Duchenne-Dystrophie angewendet werden könnten. Wenn man solche bereits genehmigte Medikamente testen würde, könnte man schneller mit ihnen klinische Studien beginnen als mit einem neuen Medikament.

Vier dieser Medikamente gegen andere Krankheiten, werden bereits in Dr. Spencers Laboratorium an mdx-Mäusen getestet: *Galectin-1*, *Remicade*®, und *Enbrel*®, alle gegen rheumatische Arthritis, und *Anti-asialo GM1*, ein Antikörper, der bereits bei der Parkinson-Krankheit eingesetzt wird.

Osteopontin ist ein Protein, das im Blut vorkommt und viele Funktionen in der Knochenbiologie hat, sowie bei der Immunregulation, den Entzündungen und Krebsmetastasen. Seine Konzentration im Blut und in den Muskeln von mdx-Mäusen und Duchenne-Patienten ist erhöht. Mdx-Mäuse ohne Osteopontin haben eine bessere Muskelkraft, niedrigere CK-Werte und weniger Fibrose. Es wird jetzt versucht, ein Medikament zu finden, das Osteopontin in Duchenne-Patienten hemmt und das damit für eine Duchenne-Therapie benutzt werden könnte.

Idebenone. Weil das Dystrophin fehlt, sind nicht nur die Zellmembranen destabilisiert, sondern auch die Mitochondrien in den Muskelzellen der Duchenne-Patienten sind in Mitleidenschaft gezogen. In diesen „Kraftwerken“ der Zellen wird der universelle biologische Energieträger, Adenosintriphosphat (ATP), durch oxidative Phosphorylierung gebildet. Die synthetische Verbindung *Idebenone*, die von der Firma *Santhera Pharmaceuticals* in Liestal bei Basel unter der Leitung ihres wissenschaftlichen Direktors Dr. *Thomas Meier*, entwickelt wurde, ist chemisch mit dem natürlichen *Coenzym Q10* verwandt. Idebenone ist nicht nur ein starkes Antioxidanz, sondern, noch wichtiger, es erleichtert die Bildung von zellulärer Energie. Außerdem wurde es chemisch optimiert, damit es leicht in Zellen hineinkommt, vor allem auch in Muskelzellen.

Die Wirksamkeit von Idebenone wurde bereits für Patienten mit Friedreich-Ataxie bewiesen. Bei dieser neuro-muskulären Krankheit konnte Idebenone die neurologischen Funktionen verbessern und auch die hypertrophe Cardiomyopathie (die Vergrößerung des Herzens), die bei dieser Krankheit eine lebensbedrohende Komplikation ist.

Vor kurzem begannen Wissenschaftler an der Universität von Löwen in Belgien unter der Leitung von Prof. **Gunnar Buysse** zusammen mit Santhera zu prüfen, ob Idebenone auch bei Duchenne-Muskeldystrophie helfen könnte. Sie behandelten zunächst mdx-Mäuse 10 Monate lang – von kurz nach der Geburt bis in ihr Erwachsenenalter – mit Idebenone oder Placebo in einer Doppelblindstudie. Dabei wurden die Herzprobleme dieser dystrophischen Mäuse deutlich verringert. Vor allem ging die Sterblichkeit nach experimentell induziertem Herzstreß von 58% auf 19% zurück. Außerdem schnitten die behandelten Mäuse in einem allgemeinen Muskelfunktionstest deutlich besser ab, bei dem die Tiere freiwillig so lange wie sie wollten, in einem Laufrad rennen durften. Eine wissenschaftliche Beschreibung dieser aufschlußreichen Studie wird in Kürze veröffentlicht.

Diese Ergebnisse ermutigten die Forscher, eine doppelblinde und durch Placebo kontrollierte klinische Phase-II-Studie mit 21 Duchenne-Jungen im Alter von 8 bis 16 Jahren zu beginnen, wieder unter der Leitung von Prof. Buysse an der Universität Löwen. Dreizehn Jungen wurden 12 Monate lang täglich mit 450 mg Idebenone behandelt, die als 150-mg-Tabletten gegeben wurden, während 8 Patienten Placebo erhielten. Das wichtigste Ziel dieser Studie war es, die Wirkung von Idebenone auf die Herzmuskel-funktion zu ermitteln, die mit einer Methode gemessen wurde, mit der vor allem die bei Duchenne-Dystrophie am meisten betroffene Herzregion analysiert wurde. Patienten, die Idebenone bekamen, zeigten deutlich verbesserte Ergebnisse mit diesem Herzfunktionstest verglichen mit Placebo. Unter den weiteren Messungen waren Lungenfunktionstests, die auch bei Patienten, die Idebenone fast ein Jahr lang bekommen hatten, deutlich verbesserte Werte zeigten, während die Atmungsfunktionen bei den Patienten auf Placebo sich weiter verschlechterten.

Diese deutlichen Hinweise auf eine Verbesserung der Herz- und Lungenfunktionen durch Idebenone sind besonders ermutigend, denn diese Probleme verursachen sehr ernste Komplikationen in Patienten mit Duchenne-Dystrophie. Alle Ergebnisse dieser Studie werden auf dem Jahreskongreß 2008 der American Academy of Neurology mitgeteilt werden.

Zusammengefaßt sind dies die ersten deutlichen Hinweise auf eine klinische Wirkung von Idebenone auf die Herz- und Lungenfunktionen von Duchenne-Patienten. Diese Ergebnisse führten zur Entscheidung von Santhera, die klinische Entwicklung von Idebenone, das bereits zum „Orphan Drug“ erklärt wurde, fortzusetzen bis zu einer wirksamen Therapie der Duchenne-Muskeldystrophie.

Protandim zur Vermeidung von oxidativem Streß. Der Träger der biologischen Energie, die jede Zelle braucht, ist Adenosintriphosphat, ATP, das auch für die Muskelkontraktion notwendig ist. Es wird in großen Mengen in den Mitochondrien synthetisiert, die etwa so groß wie ein Bakterium sind und von denen es viele innerhalb der Zellen gibt. Sie verbrauchen Sauerstoff, um das energiereiche ATP durch oxidative Phosphorylierung zu bilden. Aber 1%-2% des verbrauchten Sauerstoffs wird in das sehr reaktive freie *Superoxid-Radikal* umgewandelt. Eine normale Zelle verteidigt sich gegen dieses toxische Produkt mit zwei Enzymen: *Superoxid-Dismutase*, SOD, die das Radi-

kal in Wasserstoffsuperoxid umwandelt, und *Katalase*, die das Wasserstoffsuperoxid weiter zu Wasser und Sauerstoff abbaut.

Muskelzellen ohne Dystrophin produzieren mehr als die normale Menge an Superoxid-Radikalen, deswegen haben sie oxidativen Streß, der dann zur Degeneration der Muskelfasern beiträgt, weil die beiden Enzyme den Überschuß an Radikalen nicht genügend schnell zerstören können, bevor sie chronische Entzündungen verursachen, sowie Fibrose, Peroxidation von Fettstoffen und eine Verlangsamung der Muskelregeneration, alles Symptome von etwa dreijährigen Duchenne-Jungen.

Für eine Duchenne-Therapie wäre es wichtig, diese Prozesse in diesem Alter oder früher zu unterbrechen. Eine Behandlung mit den antioxidativen Vitaminen E und C hat leider keine Wirkung. Eine andere Möglichkeit wäre es, die Menge der beiden Enzyme Superoxid-Dismutase und Katalase zu erhöhen. Und tatsächlich haben Experimente zeigen können, daß die Zugabe dieser beiden Enzyme zu isolierten Herzen von mdx-Mäusen den oxidativen Streß durch die Zerstörung des Überschusses von freien Radikalen blockiert.

Aus diesem Grund, entwickelte Prof. **Joe McCord** von der Universität von Colorado zusammen mit der Firma *Life Vantage Corp.* in Denver, die Naturstoffmischung *Protandim*®, um den oxidativen Streß zu reduzieren durch die Hochregulation der beiden antioxidativen Enzyme. *Protandim* enthält Extrakte von fünf Pflanzenarten: *Bacopa monnieri*, *Silibum marianum* oder Milchdiestel, *Withania somnifera*, auch als Ashwagandha bekannt, *Curcuma longa*, von dem das Gewürz Gelbwurz gewonnen wird, und *Camellia sinensis* oder grüner Tee

In einer klinischen Studie wurden 2006 29 gesunde, 20 bis 78 Jahre alte Personen täglich 120 Tage lang mit *Protandim* behandelt. Nach dem Ende der Studie waren die zwei wichtigsten Testergebnisse, daß die Aktivität der Superoxid-Dismutase im Durchschnitt um 30% zugenommen hatte, und die der Katalase um 54%, und daß die Peroxidation der Lipide deutlich gehemmt worden war.

Vor kurzem wurde gefunden, daß *Protandim* dadurch wirkt, daß es das sog. „antioxidant reponse element“ ARE stimuliert, einen genetischen Mechanismus, der nicht nur die Produktion von Superoxid-Dismutase und Katalase kontrolliert, sondern auch etwa zwei Dutzend andere wichtige antioxidative Enzyme. Außerdem wirken die fünf aktiven phytochemischen (pflanzlichen) Substanzen in *Protandim* zusammen mit einem starken Synergie-Effekt, so daß ihre gemeinsame Wirkung um viele Male größer ist als die Summe der Einzelwirkungen.

Nelson SK, Bose SK, et al. und McCord JM. The induction of human superoxide dismutase and catalase: A fundamentally new approach to antioxidant therapy (Die Stimulierung der menschlichen Superoxid-Dismutase und Katalase: Ein fundamental neuer Weg einer Antioxidanz-Therapie). *Free Radical Biol. & Med.* 2006; 40; 341-347. Velmurugan K, Alam J, McCord JM, und Pugazhenth S. Synergistic induction of heme oxygenase-1 by the components of the dietary supplement *Protandim* (Kombinierte Stimulierung der Häm-Oxygenase-1 durch die Bestandteile des Nahrungszusatzmittels *Protandim*). *Free Radical Biol. & Med.* 2007; 43, Suppl. 1; S97.

Hemmung von NFκB. An der Still-Universität in Kirksville, Missouri, entwickelten Prof. *George Carlson* und seine Kollegen eine Methode, mit der das Einströmen von Kalzium in isolierte stark dystrophische Fasern aus dem Ausatemungsmuskel *Triangularis sterni* (TS) von mdx-Mäusen gemessen werden kann, um festzustellen, ob, wie es vermutet wurde, ein verstärktes Einströmen von Kalzium für die dystrophischen Symptome verantwortlich ist. Die Ergebnisse zeigten jedoch, daß dieses Einströmen in die gestreßten Fasern nicht größer ist als das Einströmen in normale Muskelfasern unter den gleichen Bedingungen. Da andere Forscher gefunden hatten, daß passives Dehnen den Signalweg NFκB (ausgesprochen NFκappaB) in Muskeln aktiviert, versuchte Dr. Carlsons Team herauszufinden, ob diese Aktivierung auch für die Schädigung ihrer TS-Muskeln verantwortlich ist.

Das Protein NFκB kommt im Zytoplasma aller Zellen vor, aber es ist dort meistens durch ein anderes Protein inaktiviert, durch das hemmende Protein κB (IκB). Entzündungsprozesse, die Infektionen und auch die Zelldegeneration bekämpfen, aktivieren NFκB, und dies führt durch eine Signalkaskade (eine Reaktionskette) zur Hochregulierung vieler Gene, deren Proteine Antientzündungsfaktoren sind. Diese Faktoren stoppen die Entzündung, wenn sie nicht mehr gebraucht wird. Das Herunterregulieren dieser Faktoren wird jedoch durch genetische Mutationen blockiert oder auch durch Streßsituationen, die Entzündung geht weiter und chronische Krankheiten können sich entwickeln wie Arteriosklerose, Lungenfibrose, Asthma, rheumatische Arthritis und wahrscheinlich auch Duchenne-Muskeldystrophie.

Es gibt eine Reihe von Medikamenten, die die Aktivierung von NFκB am Beginn dieser Signalkaskade vermeiden können. Eines davon ist *Pyrrolidin-Dithiocarbamat*. Dr. Carlson und seine Mitarbeiter haben dieses Medikament an ihren isolierten TS-Muskelfasern von mdx-Mäusen getestet und dabei gefunden, daß durch diese Behandlung ihr Durchmesser größer wurde und ihre Funktion sich deutlich verbesserte. Es gibt andere Medikamente, die die NFκB-Reaktionskette hemmen und die für die Behandlung von anderen Krankheiten zugelassen sind. Eines davon ist *Sulfasalazin*. Dieses und andere werden jetzt im Laboratorium getestet, um festzustellen, ob klinische Versuche mit ihnen durchgeführt werden sollten.

Hemmung von TNFα. Die Duchenne-Muskelzellmembranen, die nicht durch den Dystrophin-Protein-Komplex stabilisiert sind, werden durch die mechanische Belastung der Muskelkontraktion geschädigt. Der Tumor-Nekrosefaktor-Alpha (TNFα) ist ein Protein, das diese Schäden noch verschlimmert, indem es Entzündungen begünstigt, die zur Nekrose (zur Zerstörung) der Muskelfasern im bisher nicht betroffenen Muskelgewebe führen. Die Blockade von TNFα könnte daher diesen Degenerationsprozeß verzögern.

Prof. *Miranda Grounds* und ihre Mitarbeiter an der Universität von Westaustralien in Perth verwendeten einen Antikörper, cV1q, zum Blockieren von TNFα in einer Langzeitstudie mit mdx-Mäusen. Ältere mdx-Mäuse haben nur etwa 5% nekrotische Muskelfasern, und dieser Prozentsatz konnte nicht mit dem Antikörper gegen TNFα reduziert werden. Deshalb ließen die Forscher die Mäuse

freiwillig in Laufrädern laufen, dies verdoppelte die Menge der nekrotischen Muskelfasern. Eine Langzeitbehandlung bis zu drei Monaten, während der die Mäuse laufen durften wie sie wollten, vermied die zusätzliche Schädigung, die durch diese körperliche Belastung verursacht wurde. Deshalb vermindert die Blockade von TNFα die Muskelschädigung und auch die hohen CK-Werte, die normalerweise in körperlich gestreßten mdx-Mäusen auftreten. Die mit cV1q behandelten Mäuse liefen deutlich mehr als die nicht-behandelten mdx-Mäuse, dies zeigte, daß sie sich wohlfühlten und daß ihre Muskelfunktion verbessert war. Klinische Studien mit diesem Antikörper oder mit anderen Medikamenten, die TNFα hemmen, sollten deshalb in Betracht gezogen werden.

Hochregulieren von IGF-1. Der insulinähnliche Wachstumsfaktor IGF-1 ist ein Protein aus etwa 70 Aminosäuren in einer Kette mit drei stabilisierenden Brücken, dessen Struktur dem Insulin sehr ähnlich ist. Es existiert in mehreren wenig verschiedenen Formen. Eine dieser *Isoformen*, IGF-1A, wird von den Muskeln gebraucht, weil sie ihr Wachstum und ihre Stärke begünstigt und deswegen für eine Therapie der Duchenne-Dystrophie in Frage käme.

Das Forschungsteam von Prof. *Elisabeth Barton* an der Universität von Pennsylvania in Philadelphia arbeitet mit mdx-Mäusen, die genetisch verändert wurden, damit sie große Mengen IGF-1 während ihrer ganzen Lebenszeit in ihren Muskeln produzieren. Diese *mdx-IGF-plus-Mäuse* zeigen ein erhöhtes Muskelwachstum mit ziemlich gesund aussehenden Muskeln und mit viel weniger Fibrose als "normale" mdx-Mäuse.

Aber weil dieser Wachstumsfaktor nicht nur die Muskelzellen, sondern auch viele andere Prozesse beeinflusst, können mögliche ernste Nebenwirkungen nicht ausgeschlossen werden, wenn höhere Dosierungen verwendet werden, um die Wirkung auf die Muskeln zu optimieren. Deswegen wurde das bereits zugelassene Medikament IPLEX™ getestet, in dem IGF-1 mit einem seiner Bindungspartner, mit dem Protein IGFBP3, kombiniert ist, so daß das IGF-1 im Blut stabilisiert ist und nur dort freigesetzt wird, wo es gebraucht wird.

Eine erste klinische Studie mit IPLEX wurde an der Universität von Rochester an 15 erwachsenen Patienten mit myotoner Dystrophie durchgeführt. Mit dieser Methode könnte IGF-1 zu den Muskeln gebracht werden, ohne daß Nebenwirkungen in anderen Geweben des Körpers verursacht werden.

Ein anderer Weg, ein höheres Niveau von IGF-1 im Muskelgewebe zu erzeugen, wäre es, sein Gen mit AAV-Vektoren in die Muskeln zu transferieren, das sie veranlassen würde, mehr IGF-1 zu produzieren. Mit dieser Technik konnte bereits in Dr. Bartons Laboratorium nach intramuskulärer Injektion der Vektoren die Menge der aktivsten Isoform IGF-1A um das 30- bis 40-fache erhöht werden. Das neusynthetisierte IGF-1 blieb im Muskelgewebe, veranlaßte eine Hypertrophie (eine Vergrößerung der Muskelfasern), aber vermied Nebeneffekte in nicht-muskulären Geweben. Es wird noch mehrere Jahre dauern, bis eine solche virale Therapie in Duchenne-Jungen getestet werden kann.

Betablocker. Betablocker sind hormonähnliche Substanzen, die sich an spezifische Rezeptorproteine an der Außenseite von Zellmembranen binden und dadurch eine Reihe von Reaktionen auslösen, eine *beta-adrenergische Signalkette*, oder Kaskade, die innerhalb der Zelle chemische Signale weitergeben, mit denen, neben anderen biologischen Wirkungen, vor allem die Proteinsynthese und der Proteinabbau kontrolliert werden.

Einige der Betablocker sind zugelassene Medikamente, z.B. *Bronchodilatoren*, die die Atemwege von Asthma-Patienten entspannen können, oder die auch anabolische Wirkungen haben zum Vergrößern der Muskeln und Verbessern ihrer Kraft. Sie werden manchmal illegal von Sportlern als Doping benutzt.

Im Laboratorium von Prof. **Gordon Lynch** an der Universität von Melbourne, wurde mit ausgezeichneten Ergebnissen der Betablocker *Formoterol* getestet auf seine Fähigkeit, den Muskelabbau in alten Ratten zu vermeiden. Dies hätte Bedeutung für eine spätere Behandlung von älteren Menschen. Die Ergebnisse bedeuten aber auch, daß dieses oder andere „Altersmedikamente“ potentiell gegen Duchenne-Muskeldystrophie eingesetzt werden könnten.

Um gerade dies zu testen, wurde eine kleine klinische Studie bereits mit Duchenne- und Becker-Patienten durchgeführt. Die Teilnehmer wurden 28 Wochen lang mit *Albuterol* (8 mg/Tag), einem anderen Betablocker, behandelt, der für die Behandlung von Asthma zugelassen ist. Diese niedrige Dosis wurde gewählt, weil in einer anderen Studie mit FSH-Dystrophie-Patienten (mit einer anderen Muskelkrankheit), die mit 16 und 32 mg/Tag Albuterol ein Jahr lang behandelt wurden, nicht-akzeptable Nebenwirkungen wie Herzklopfen auftraten. Die reduzierte Dosis in der Studie mit den Duchenne- und Becker-Patienten zeigte keine Nebenwirkungen, führte aber nur zu einer geringen Erhöhung der Muskelkraft, die für eine wirksame Therapie gegen Muskelabbau und -schwäche ungenügend war.

Zur Vorbereitung einer weiteren klinischen Studie mit einem wirksameren Betablocker behandelten Prof. Lynch und seine Kollegen mdx-Mäuse mit einer sehr niedrigen aber klinisch ausreichenden Dosis von Formoterol (25 Mikrogramm/kg). Diese sehr niedrige Dosis vergrößerte die schnellen und die langsamen Muskeln der mdx-Mäuse und erhöhte auch ihre Kraft, ohne sie dadurch leichter ermüdbar zu machen. Und das Herz wurde nur wenig vergrößert.

Da Duchenne-Patienten keine Vergrößerung ihres Herzens brauchen, muß der Effekt dieser Medikamente auf die Herzmuskeln vermieden werden, ohne dabei den positiven Effekt auf die Skelettmuskeln zu beeinträchtigen. Diese beiden Effekte zu trennen, ist noch eine wichtige Aufgabe und darauf konzentriert Dr. Lynch seine Forschung an diesen Substanzen. Eine andere Nebenwirkung ist das Herunterregulieren der Rezeptoren für die Betablocker in den Muskelzellmembranen, wodurch ihre Wirkung auf die Skelettmuskeln reduziert wird. Dieser Effekt muß auch zu vermeiden sein, bevor klinische Langzeitstudien mit Duchenne-Patienten begonnen werden können.

Lynch GS, Ryall JG. Role of β -adrenergic signaling in skeletal muscle structure and function: implications for muscle wasting and disease (Die Rolle der beta-adrenergischen Signalkette auf die Struktur und Funktion der Skelettmuskeln: Bedeutung für Muskelabbau und Muskelkrankheit). *Physiological Reviews* 2008; 88: 729-767.

Harcourt LJ, Schertzer JD, Ryall JG, Lynch GS. Low dose formoterol administration improves muscle function in dystrophic *mdx* mice without increasing fatigue (Niedrig dosierte Behandlung mit Formoterol verbessert die Muskelfunktion in dystrophischen mdx-Mäusen ohne die Müdigkeit zu verstärken). *Neuromuscular Disorders* 2007; 17: 47-55.

BBIC hemmt Proteasen. Der Muskelabbau bei der Duchenne-Muskeldystrophie wird von mehreren verschiedenen Proteasen (proteinzerstörenden Enzymen) verursacht. Dazu gehört das Enzym *Kalpain* und ein großer Proteinkomplex, das *Proteasom*. Bei der Duchenne-Dystrophie werden die Muskelzellmembranen durchlässig, so daß Kalzium-Ionen (geladene Atome) in die Zellen eindringen und Kalpain und auch die Proteasomen aktivieren können. Die Forscher versuchen, die Aktivierung von Kalpain und anderen Proteasen zu hemmen, um damit die Muskelabbau zu verzögern.

Prof. **Lee Sweeney** und sein Team an der Universität von Pennsylvania in Philadelphia experimentieren mit einem Protease-Hemmstoff, dem *Bowman-Birk inhibitor concentrate*, BBIC, einem natürlichen Protein aus 71 Aminosäuren, das aus Sojabohnen isoliert werden kann. Es ist eine wasserlösliche Substanz, die durch den Mund eingenommen werden kann. Da sein Molekül zu groß ist, um in die Muskelzellen zu gelangen, blockiert es mehrere Proteasen, wie die Verdauungsenzyme Trypsin und Chymotrypsin, außerhalb der Zellen und unterbricht deren Signalkette, die zu Entzündungsprozessen bei Duchenne-Muskeldystrophie führt. Eine Langzeitbehandlung mit BBIC erhöht die Muskelmasse und Muskelkraft in mdx-Mäusen. Dabei werden die CK-Aktivitäten stark reduziert und auch die Fibrose. Von anderen Anwendungen in Krebspatienten weiß man, daß BBIC ein sehr sicheres Medikament ist.

Eine klinische Phase-I-Studie wird zur Zeit zusammen mit Dr. **Kenneth Fishbeck** in den National Institutes of Health (NIH) in Bethesda bei Washington vorbereitet. Falls die Studie an Duchenne-Jungen ähnliche Ergebnisse liefert wie die, die mit mdx-Mäusen erhalten wurden, könnte dieses gutartige Medikament wahrscheinlich ihren Muskelabbau verlangsamen. Sojabohnen enthalten aber auch noch andere Proteasen, deswegen muß BBIC aus ihnen isoliert und gereinigt werden. Die Bohnen direkt zu essen, hat keine Wirkung.

GAMT und AGAT. Obgleich die mdx-Maus kein Dystrophin in ihren Muskeln hat, zeigt sie nicht die schweren klinischen Symptome wie die menschliche Duchenne-Muskeldystrophie. Prof. **Brian Tseng**, der früher an der Universität von Colorado in Denver arbeitete und jetzt im Massachusetts General Hospital der Harvard-Universität in Boston ist, versucht mit seinem Team, weiterhin Wege zu finden, mit denen die Muskeldystrophie verlangsamt werden kann.

Die Wissenschaftler benutzten Suchtechniken, um sog. „modifizierende“ Enzyme zu finden, die in mdx-Mäusen hochreguliert, in Duchenne-Jungen aber herunterreguliert sind. Sie identifizierten zwei solcher Gene für die beiden Enzyme *Arginin:Glycin-Amidotransferase*, AGAT, und *Guanidinoacetat-Methyltransferase*, GAMT. Beide sind wichtig für die Produktion von Kreatin, das für die biolo-

gische Energiespeicherung in Skelettmuskeln notwendig ist. Im Gegensatz zu Duchenne-Jungen, können die mdx-Mäuse beide Enzyme hochregulieren, so daß sie kein Problem haben, ihr eigenes Kreatin in ihren Muskelzellen zu produzieren. Es ist bekannt, daß Duchenne-Jungen nur 20% der normalen Menge Kreatin haben. Die mdx-Maus aber hat 80 bis 90% Kreatin in ihren Muskeln verglichen mit gesunden Kontrollmäusen.

Die Forscher züchteten dann eine mdx-Maus, deren GAMT-Gen genetisch inaktiviert war. Diese Maus kann nicht gut laufen, sie stirbt früh, und ihre Muskeln sehen viel stärker betroffen aus, ähnlich wie Duchenne-Muskeln.

In Prof. Tsengs Laboratorium wird jetzt daran gearbeitet, eine mdx-Maus ohne das andere Enzym, das AGAT, zu erzeugen, die auch schwer behindert sein müßte. Und sie wollen herausfinden, wie das Fehlen des Dystrophins den Transport des Kreatins vom Blutstrom in die Muskeln beeinflußt, ein Effekt, der wahrscheinlich den Muskelabbau beschleunigt. Ein Problem mit dem Kreatintransport kann nicht durch Essen von Kreatin allein wirksam behandelt werden. Prof. Tsengs Team untersucht auch die beiden Gene für GAMT und AGAT in Jungen und Männern mit einer ungewöhnlichen Muskeldystrophie, die kein Dystrophin, aber Becker-ähnliche Symptome und eine fast normale Muskelkraft haben.

Mit schnellen automatischen Suchmethoden wird es vielleicht möglich sein, Substanzen zu finden, zugelassene Medikamente oder auch „Nutriceutika“ (Nahrungszusatzstoffe), welche die beiden modifizierenden Gene GAMT und AGAT in Duchenne-Jungen hochregulieren können. Dies könnte ihre schweren Symptome in die milden Sym-

ptome der kaum behinderten mdx-Mäuse abändern, und sie würden auf diese Weise Zeit gewinnen bis eine wirkliche Heilung zur Verfügung steht.

McClure WC, Rabon R, Ogawa H, Tseng BS. Upregulation of the creatine synthetic pathway in skeletal muscles of mature mdx mice (Hochregulierung der Biosynthese von Kreatin in Skelettmuskeln erwachsener mdx-Mäuse). *Neuromuscular Disorders* 2007; 17; 639-650.

L-Arginin und nNOS. Eine weitere Konsequenz des fehlenden Dystrophins ist die reduzierte Menge einer Komponente des Dystrophin-Glykoprotein-Komplexes, des Enzyms *neuronale Stickoxid-Synthase* (nNOS). Dieses Enzym produziert Stickoxid (NO) ausgehend von der Aminosäure L-Arginin. Obgleich NO ein Gas ist, wirkt es wie ein Hormon und reguliert, unter anderem, die Entspannung von Blutgefäßen. Dies ist wichtig für die normale Versorgung der Muskeln mit Blut und damit Energie. Wenn nNOS fehlt, entwickelt sich Fibrose des Herzens in mdx-Mäusen und auch in Duchenne-Patienten.

Prof. **Andrew Hoey** und seine Kollegen an der Universität von Southern Queensland in Australien gaben mdx-Mäusen L-Arginin täglich sechs Monate lang, die zu Beginn sechs Monate alt waren. Wegen der reduzierten Herz-Fibrose erhöhte sich der Blutdurchfluß und verbesserte damit die Herzfunktion. Mit weiteren Experimenten wird der Mechanismus dieser Wirkung von L-Arginin untersucht, um zu sehen, ob diese natürliche Aminosäure als Medikament für Duchenne-Jungen in Betracht gezogen werden kann.

Einige abschließende Gedanken: Wo sind wir und was sollten wir tun?

Wie ich am Anfang sagte, habe ich diesen Forschungsbericht und alle früheren für Euch geschrieben, die Jungen und jungen Männer mit Duchenne-Muskeldystrophie und ihre Familien, so daß Ihr besser versteht was getan wird, um diese Krankheit zu stoppen., um sie ein für alle Mal *zu beenden*. Ich habe 33 Forschungsprojekte für meine Zusammenfassung hier ausgewählt, weil sie, meiner Meinung nach, die wichtigsten sind, mit denen Wissenschaftler in vielen Ländern versuchen, eine wirksame und sichere Therapie zu finden, um wenigstens das Verschwinden Eurer Muskeln deutlich zu verlangsamen.

Gute und schlechte Mutationen. Duchenne-Muskeldystrophie ist nicht neu, wie AIDS, weil sie auch in Mäusen, Ratten, Katzen und Hunden gefunden wurde und wahrscheinlich in allen Tieren mit Muskeln existiert. Sie war also schon lange da, bevor wir uns von unseren tierischen Vorfahren zu unterscheiden begannen. Sie ist also nichts anderes als ein schlimmer „Unfall“, ein Nebenprodukt, der Evolution.

Ohne Mutationen, die zufälligen Änderungen der genetischen Information, wären wir nicht hier und der Rest des Lebens auch nicht. Einige der Mutationen sind „gut“, weil sie das Leben verbessern, aber die meisten sind „schlecht“ und gefährlich, weil sie tödlich und für Krankheiten verantwortlich sind vor der Geburt und danach.

Die Mutationen, die Duchenne-Muskeldystrophie verursachen, bestrafen Euch nicht und auch niemand anderen,

sie passieren einfach. Hier möchte ich keine religiösen Fragen diskutieren, die einem gleich einfallen, sondern nur einen Gedanken erwähnen: Die Natur scheint blind zu handeln ohne Rücksicht darauf, wem sie dabei wehtut. Andererseits haben ihre guten Mutationen uns auch unsere Gehirne gegeben, um diese schlimme Nebenwirkung der Evolution zu reparieren.

Wissenschaftliche Forschung. Wenn Ihr den ganzen Bericht gelesen habt, werdet Ihr feststellen, daß die vielen genannten Wissenschaftler und ihre Teams alles tun, was sie können, und so schnell wie möglich, um eine Therapie zu finden. Als 1986/87 das Dystrophin-Gen gefunden wurde und sein Protein, dachten wir alle, daß jetzt endlich der Weg frei sei für eine Heilung, die sehr bald die molekulargenetischen Ursachen der Krankheit korrigieren würde. Doch jetzt, mehr als 20 Jahre später, warten wir immer noch auf diese Heilung oder wenigstens auf eine Therapie, die die Zerstörung der Muskeln verlangsamen könnte.

Aber es zeigte sich, daß nicht nur der Kampf gegen diese Krankheit viel schwieriger war als wir es uns vorgestellt hatten, auch der Fortschritt bei andern genetischen Krankheiten, wie Mukoviszidose oder die vielen Formen des Krebses ist auch sehr langsam.

„Unsere“ Krankheit, Duchenne-Muskeldystrophie könnte sogar die erste seltene Erbkrankheit sein, die eine genetische Therapie in der nicht zu ferneren Zukunft haben wird.

Ein Schritt nach dem anderen. Die Forschungsarbeiten, die in diesem Bericht erklärt sind, wären ohne die Resultate, die nach wissenschaftlichen Methoden erhalten wurden, nicht möglich gewesen. Deshalb werden sie es einmal ermöglichen, wirksame Medikamente zu entwickeln, die man einmal kaufen können wird. Aber das braucht Zeit, weil diese Entwicklung nur Schritt für Schritt vorankommen kann, und jeder Schritt muß sorgfältig geplant, dann mit Tieren ausprobiert, und schließlich in klinischen Studien bewiesen werden, daß er auch in Patienten funktioniert.

Abkürzungen, selbst wenn sie theoretisch möglich erscheinen, sind nicht erlaubt. Schließlich werden unsere Kinder die meisten der Duchenne-Medikamente für den Rest ihres hoffentlich langen Lebens nehmen müssen. Deswegen dürfen sie keine Nebenwirkungen haben, die sich mit der Zeit vervielfachen und gefährlich werden können. *Sie müssen absolut sicher sein.* Die Forscher wissen das, und sie wissen auch, daß die Genehmigungsbehörden, wie FDA und EMEA, obgleich sie manchmal ihre Arbeit schwierig machen und sie zu verzögern scheinen, da sind, um Euch zu schützen. Einen Schritt nach dem anderen zu machen ist langsam, aber Fehler mit Zwischenfällen, die Euch und andere mit anderen Krankheiten schaden, würden nur die Entwicklung unserer und ihrer Medikamente verzögern.

Exon-Skipping. Eine der genetischen Techniken, die in diesem Bericht diskutiert sind, ist besonders erfolgversprechend: *Exon-Skipping*. In einer klinischen Studie in Holland wurde gezeigt, daß eine Sorte der Antisense-Medikamente, 2'O-Methyl-AONs, in einem Muskel von vier Duchenne-Jungen wirklich funktioniert. Eine ähnliche Studie mit einer anderen Sorte dieser Medikamente, mit Morpholinos, wird jetzt in England durchgeführt. Es ist ziemlich sicher, daß es auch dabei ebenso positive Ergebnisse geben wird. Systemische Studien werden jetzt geplant oder sind schon im Gange, bei denen die AONs in die Blutbahn injiziert werden, damit sie alle Muskeln erreichen. Das funktioniert in Tieren, und wir alle erwarten, daß mit Kindern das gleiche herauskommen wird.

Den Jungen, die an diesen systemischen Studien teilnehmen und bei denen auch Exon 51 geskippt werden muß, wird dieses Exon aus einem großen Teil ihrer geschädigten Dystrophin-mRNA entfernt werden. Am Ende der Studie werden ihre Muskeln möglicherweise schon besser arbeiten. Deshalb dürfen wir hoffen, daß wir auf diesem Weg, eine wirksame Therapie bekommen werden, wenn auch nicht eine vollständige Heilung. Es wird nicht noch einmal 20 Jahre dauern bis sie da ist, es wird viel früher sein.

Eine Exon-Skipping-Behandlung wird nach einigen Wochen oder Monaten wiederholt werden müssen. Das aber hat den Vorteil, daß sie auch beendet oder ersetzt werden kann, wenn es doch Probleme gibt oder später eine wirksamere oder permanentere Methode zur Verfügung steht. Exon-Skipping wird eine große Hilfe für viele Duchenne-Jungen sein, aber es wird nur den Muskelabbau bei der Krankheit verlangsamen, es wird nur *eine wirksame Therapie, aber keine vollständige Heilung* sein.

Pharmakologische Wege. Deshalb wird für viele von Euch, die Ihr noch jung seid und noch viele Eurer Muskeln einigermaßen habt, Exon-Skipping nicht zu spät fertig sein. Aber vollständig verlorene Muskeln können nicht

durch Exon-Skipping ersetzt werden. Deswegen werden die älteren unter Euch wahrscheinlich mehr von den pharmakologischen Forschungswegen profitieren als von den genetischen. Einige dieser zukünftigen Medikamente können zum Dopen von Sportlern mißbraucht werden, doch wegen der möglichen Vorteile für Euch mit Muskeldystrophie sollte man es Euch erlauben, sie zu benutzen.

Die Liste dieser potentiellen Medikamente ist lang, vieler werden in diesem Bericht besprochen, und es werden noch mehr werden in zukünftigen Aktualisierungen. Einige davon werden schon klinisch mit guten Ergebnissen getestet wie Idebenone. Sie können wahrscheinlich schneller entwickelt werden, als die genetischen Methoden. Und entweder allein oder zusammen mit anderen, in einem *Cocktail*, könnten sie die Muskeln erhalten und stärken, wie die Steroide, aber mit weniger Nebenwirkungen, und so Euch Zeit lassen, während Ihr auf eine wirksamere genetische Therapie wartet.

Klinische Studien sind notwendige Schritte zur vollständigen Entwicklung einer Therapie. Es sind aber Experimente an Menschen, die auch fehlschlagen können. Und einige haben auch schon negative Ergebnisse gebracht: Myodur hat Proteasen nicht hemmen können und der Antikörper Myo 029, der Myostatin hemmen sollte, führte zu keiner klinischen Verbesserung. Und von den ersten einer Serie von klinischen Versuchen, die der Phase-I, werden keine klinischen Vorteile erwartet. Bei den meisten wird nur ein unwichtiger Muskel behandelt, das aber kann nicht die Funktion aller Muskeln verbessern. Sind die potentiellen neuen Medikamente sicher? Das ist die wichtige Frage, die diese ersten Studien vor allem beantworten wollen. Eure Teilnahme ist wichtig, es lohnt sich aber nicht, deswegen mit großen Kosten von weither zu den Studienzentren zu kommen.

Mutationsdiagnose. Einige potentielle Therapien sind *mutationsspezifisch*, das heißt, die genaue Mutation des Patienten muß bekannt sein, bevor er eine solche Therapie bekommen kann. Beispiele dafür sind Exon-Skipping und PTC124. Andere, wie der Ersatz des Dystrophin-Gens mit Virusvektoren oder das Hochregulieren von Utrophin sind unabhängig von der Mutation.

Die MLPA-Methode ist jetzt eine oft angewendete Methode zur Bestimmung von Deletionen und Duplikationen in Jungen und auch in Überträgerinnen. Es wird allerdings erwartet, daß die neuen Mikroarray-Methoden alle anderen genetischen Testmethoden bald ersetzen werden.

Überträgerdiagnosen für die Mütter eines Duchenne-Jungen und ihre weiblichen Verwandten sind wichtig für eine rechtzeitige genetische Beratung, die die Geburt von weiteren Duchenne-Jungen in der Großfamilie vermeiden können. Aber wenn einer Frau mit einem Risiko versichert werden kann, daß sie *keine* Überträgerin ist, kann sie ermutigt werden, Kinder zu haben, ohne eine Wiederholung zu fürchten über das allgemeine Risiko hinaus.

Neugeborenen-Screening auf erhöhte CK-Aktivitäten in trockenen Blutflecken, wie es in Deutschland (Freiburg), Wales (Cardiff), and Belgien (Antwerpen), angeboten wird, entdeckt Duchenne-Jungen sehr früh und kann durch genetische Beratung Zweiterkrankungen in der gleichen Familie vermeiden. In den USA werden zur Zeit zwei Pilotprogramme zum CK-Screening in Columbus, Ohio, und Atlanta, Georgia, durchgeführt.

Registration. Alle Jungen und jungen Männer mit Duchenne sollten ihre persönlichen Daten in einer Duchenne-Datenbank ihres Landes registrieren lassen, die zu den internationalen Register-Netzen gehört, die von TRAT-NMD (www.treat-nmd.eu/registry) und DuchenneConnect (www.duchenneconnect.org) angeboten werden. Dies würde es erlauben, Teilnehmer an klinischen Studien zu finden für Therapien von Patienten mit ungewöhnlichen Mutationen. Und es würde auch sicherstellen, daß die Patienten und ihre Familien Zugang zu den neuesten Informationen über Forschungsergebnisse und die medizinische Betreuung haben. Das Duchenne-Register in Deutschland kann unter www.dmd-register.de im Internet erreicht werden.

Zusammenarbeiten. Ihr, die Familien mit Duchenne-Jungen und jungen Männer mit Duchenne selbst sollten Teil der weltweiten Duchenne-Gemeinschaft werden und dort aktiv mitarbeiten. Ihr solltet mit anderen Familien und Patienten zusammenarbeiten in den Muskeldystrophie-Gesellschaften Eures eigenen Landes und auch auf internationalem Niveau. Die EAMDA, European Alliance of Muscular Dystrophy Associations, ist ein Beispiel. Miteinander könnt Ihr vieles tun, um die Entwicklung von Therapien zu beschleunigen. Hier sind einige Vorschläge:

Schnellere Genehmigungen. Die FDA und andere Zulassungsbehörden brauchen viele Monate zur Genehmigung von klinischen Studien und neuen Techniken. Sie haben schließlich die lokalen Exon-51-Skipping-Studien erlaubt, aber es dauerte etwa ein Jahr, bis die britische Studie genehmigt war. Dies ist der Grund, warum die Holländer ihre Studie beenden konnten, bevor die Engländer überhaupt anfangen durften.

Es sieht jetzt so aus, als ob diese Behörden darauf bestehen werden, jedes einzelne AON für die vielen Deletionen und Duplikationen zu genehmigen. Die Forscher werden versuchen, sie davon zu überzeugen, daß nur die Sequenzen der AONs verschieden sein werden, daß aber alles andere einschließlich der chemischen Natur so bleibt wie für das Skippen von Exon 51. Ihr, die Familien, solltet mit PPMD und anderen Organisationen zusammenarbeiten und offene Diskussionen mit den Genehmigungsbehörden beginnen. Solche Diskussionen haben schon mit der FDA begonnen und scheinen gut zu verlaufen. Wenn sie Erfolg haben, werden die vielen notwendigen Skipping-Medikamente für andere Exons als 51 innerhalb von Monaten und nicht nach Jahren zur Verfügung stehen nachdem das erste AON für das Skippen von Exon 51 für Euch fertig ist.

Informiert Eure Ärzte. Informationsmaterial über Duchenne-Muskeldystrophie gibt es von DuchenneConnect, TREAT-NMD, PPMD, ActionDuchenne, UPPMD, und vielen anderen Organisationen. Vieles steht im Internet und wird auch oft aktualisiert. Weist Eure Ärzte darauf

hin. Viele Hausärzte wissen wenig über Duchenne, manche gar nichts. Es ist wichtig, daß Ihr ihnen sagt, was Ihr wißt. Damit helft Ihr ihnen, Euer Kind richtig und verständnisvoll zu betreuen.

Vorsicht mit Wundermittel und -behandlungen.

Wenn Ihr diesen Bericht gelesen und vielleicht auch Vorträge „unserer“ Wissenschaftler auf einem der vielen Duchenne-Treffen gehört habt, dann werdet Ihr verstehen, daß therapeutische Medikamente und Behandlungen, die für lange Zeit sicher und wirksam sind, nur nach einer sorgfältigen Forschungen mit wissenschaftlichen Methoden entwickelt werden können. Wenn Ihr Wunder-Medikamente im Internet seht, oder Wunder-Behandlungen angeboten bekommt, und Ihr meint, darauf eingehen zu müssen, dann fragt bitte zuerst die Wunder-Verkäufer, wieviele Duchenne-Jungen sie schon geheilt haben, wie diese Jungen diagnostiziert wurden, wieviel neues Dystrophin sie in ihren Muskeln gefunden haben, und inwieweit ihre Muskelfunktionen verbessert wurden. Wenn das, was angeboten wird, wirklich einen Wert haben sollte, dann fragt Euch, warum nicht Tausende von Familien mit ihren kranken Kindern zu diesen Wunderheilern gehen. Seid vorsichtig, sonst werdet Ihr sehr viel Geld verlieren und möglicherweise Eurem Kind schweren Schaden zufügen.

Macht Reklame. Ihr solltet Euch aktiv in den Muskeldystrophie-Gesellschaften Eurer Länder engagieren, und auch mit den internationalen Organisationen zusammenarbeiten, mit TREAT-NMD in Europa und PPMD in den Vereinigten Staaten und mit anderen. Wir alle zusammen sollten unsere täglichen Probleme und unsere Hoffnungen für eine Behandlung Euren Regierungen und der breiten Öffentlichkeit mitteilen, denn die meisten Leute haben keine Ahnung, was Duchenne wirklich bedeutet. Dabei können Eure Abgeordneten auf allen Ebenen helfen und auch die Medien, Zeitungen, Radio und Fernsehen. Dies würde die Behörden, die Forschungsgelder zu vergeben haben, auf uns aufmerksam machen, ihnen zeigen, wo ihr Geld gebraucht wird, und es würde auch private steuerbegünstigte Spenden bringen.

Spenden für die Forschung, selbst kleine Spenden sind wichtig, Sie können nur einen Bruchteil der wirklichen Entwicklungskosten unserer Medikamente decken, die in die Millionen Dollar, Pfund und Euro gehen. Diese Pennys und Cents sind aber ein Hinweis der Nicht-so-Reichen an die wirklich Reichen, damit sie sich auch um uns kümmern und dazu beitragen, daß Ihr einmal ein langes und glückliches Leben haben werdet.

(Dieses Kapitel habe ich zusammen mit Ms. *Patricia Furlong* vom PPMD and Prof. *Kate Bushby* von TREAT-NMD geschrieben.)

Hinweis auf andere wichtige Artikel in früheren Berichten.

In meinen früheren Berichten nach den drei Parent-Project-Treffen 2006 und 2007 stehen weitere Zusammenfassungen über andere Themen, die in diesem Bericht, in dem es nur um die verschiedenen Forschungswege ging, nicht erwähnt wurden. Sie sind hier mit einem Hinweis aufgeführt, wo sie gefunden werden können. Ihr könnt diese drei letzten Berichte unter www.duchenne-information.eu auf meinen Internetseiten auf Deutsch sehen, wenn Ihr “Berichte

über die Forschung nach einer Therapie der Duchenne-Muskeldystrophie“ anklickt. Die kurzen Namen der deutschen Berichte “2006 Cincinnati deutsch” (C06), “2006 London deutsch” (L06), and “2007 Philadelphia deutsch” (P07) sind in der folgenden Liste weiter abgekürzt wie in den Klammern gezeigt, auf die dann die Seitenzahl (z.B. P07-20) für den genannten Artikel folgt.

Nick Catlin: Wir stehen auf den Schultern von Riesen (L06-1). **Louis Kunkel:** Vor 20 Jahren wurde das Dystrophin-Gen und sein Protein gefunden (L06-2). **Robert Weiss:** Warum müssen wir die Mutation genau kennen? (P07-23). **Stephen Abbs:** Warum sollte man die Mutationen, die Veränderungen des Dystrophin-Gens, bestimmen lassen? (L06-19). **Kevin Flanigan:** Wenn es noch keine Heilung gibt, warum müssen wir dann die Mutation genau kennen? (C06-15).

Jennifer Morgan: Virus-Vektoren und Muskel-Stammzellen (L06-8). **Terence Partridge:** Die Hoffnung auf Stammzellen (C06-7).

Kate Bushby: Warum brauchen wir klinische Studien? (P07-4, L06-3). **Diana Escolar:** Internationale klinische Studien mit pharmazeutischen Substanzen (P07-20). **Kate Bushby:** Steroid-Therapie, internationale klinische Studie (L06-14).

Tan Nguyen: Wie genehmigt die FDA ein Duchenne-Medikament? (P07-21) **Robin Sharp:** Duchenne Register (L06-21).

Serge Braun, Kate Bushby: TREAT-NMD, ein Exzellenz-Netzwerk der Europäischen Union (P07-23). **Madhuri Hedge:** CETT-Programm für Zusammenarbeit, Fortbildung und Anwendung von genetischen Tests (P07-25).

Kyle Brown: DuchenneConnect wird die Zusammenarbeit und genetische Tests für Duchenne-Muskeldystrophie fördern (P07-27). **Patricia Furlong:** Was bedeutet "Connect..."? (P07-27). **Francesco Muntoni:** Nicht den Wald vor Lauter Bäumen übersehen (L06-22).

Steve Wilton: Wie Exon-Skipping funktioniert (L06-4). **Steve Wilton:** Ein Interview über Exon-Skipping (C06-16). **Gertjan van Ommen, Francesco Muntoni:** Wann wird Exon-Skipping für die Duchenne-Jungen fertig sein? (P07-11).

Ich danke TREAT-NMD, PPMD, und ActionDuchenne für finanzielle Unterstützung.
Hier sind ihre vollständigen Adressen und wie sie kontaktiert werden können:

TREAT-NMD

Prof. Kate Bushby
Institute of Human Genetics
University of Newcastle upon Tyne, NE1 3BZ, UK
Tel.: 0044-191-241-8621, Internet: www.treat-nmd.eu

Parent Project Muscular Dystrophy

Patricia Furlong
1012 North University Blvd. Middletown, Ohio 45042, USA
Tel.: 001-513-424-0696, Internet: www.parentprojectmd.org

ActionDuchenne

Nick Catlin
Epicentre, 41 West Street
London E11 4LJ, UK
Tel.: 0044-208-556-9955, Internet: www.actionduchenne.org

Diesen Bericht werde ich von Zeit zur Zeit aktualisieren, das nächste Mal nach der Jahrestagung des PPMD in Philadelphia, 17. bis 20. Juli 2008. Ab Juni 2008 könnt Ihr diesen Bericht und seine englische und spanische Version auf meinen Internet-Seiten www.duchenne-information.eu sehen und herunterladen und ebenso die deutschen, englischen und spanischen Versionen meiner Berichte über die PPMD-Treffen in Cincinnati 2006 und Philadelphia 2007, sowie über das ActionDuchenne-Treffen in London 2006. Wer alle meine zukünftigen Berichte per e-Mail zugesandt haben möchte, sobald sie fertig sind, schicke mir bitte seine e-Mail-Adresse, die dann auch in meine deutsche, englische oder spanische Adreßliste aufgenommen wird, die schon mehr als 1.000 Adressen enthalten.

Dr. rer. nat. Günter Scheuerbrandt
Im Talgrund 2
79874 Breitnau im Schwarzwald
Tel.: 07652-1777, Fax: 07652-982730.
E-Mail: gscheuerbrandt@t-online.de
Internet: www.duchenne-information.eu

Molekulare Einzelheiten des Skippens von Exon 51.

Bei den klinischen Versuchen in Holland wurde Exon 51 in einem Muskel von vier Patienten geskippt, die verschiedene Deletionen im Dystrophin-Gen hatten. Hier erkläre ich die molekularen Einzelheiten dieses Skippings bei einem dieser Patienten mit der Deletion von Exon 50. Das Ziel dieses Skippens war es, das Leseraster in der mRNA wiederherzustellen, das durch die Deletion von Exon 50 im Dystrophin-Gen verschoben worden war.

Zunächst zeige ich Teile der Basensequenzen vom Anfang und Ende der Exons 50 und 51 der mRNA des *normalen* Dystrophin-Gens und auch vom Ende von Exon 49 und dem Anfang von Exon 52. Im Exon 50 sind 29 Codons nicht aufgeführt und auch nicht 52 Codons im Exon 51. Unter jedem Codon steht der abgekürzte Name der Aminosäure im Dystrophin-Protein, die von dem Codon determiniert wird. (Die Aminosäuren werden in den Ribosomen aneinandergereiht, wobei das Protein Dystrophin entsteht. Sie sind nicht mit den Codons verbunden.) Die Codons folgen aufeinander ohne Zwischenräume, die Bindestriche zeigen nur das Leseraster an und die senkrechten Striche die Grenzen der Exons. Die drei Basen des *versteckten* Stoppsignals UGA sind rot markiert. Exon 50 hört nach der ersten Base des letzten Codons auf, das dann zu UCU mit den ersten beiden Basen von Exon 51 komplettiert wird (blau markiert).

```

Ende Exon 49 | Start Exon 50           Ende Exon 50 | Start Exon 51
---CAG-CCA-GUG-AAG | AGG-AAG-UUA-GAA---AUU-GGA-GCC-U | CU-CCU-ACU-CAG-ACU-
  gln pro val lys | arg lys leu glu   ile gly ala ser|   pro thr gln thr

verstecktes Stoppcodon
---GUU-ACU-CUG-GUG-ACA-CAA---AAA-CUA-GAA-AUG-CCA-UCU-UCC-UUG-AUG-UUG-GAG---
  val thr leu val thr gln   lys leu glu met pro ser ser leu met leu glu

Ende Exon 51 | Start Exon 52
---AUG-AUC-AUC-AAG-CAG-AAG | GCA-ACA-AUG-CAG-GAU-UUG---
  met ile ile lys gln lys | ala thr met gln asp leu

```

Wenn Exon 50 im Gen und also auch in der mRNA deletiert ist, folgt auf Exon 49 direkt das Exon 51. Dies verschiebt das Leseraster im Exon 51 um eine Base nach rechts mit der Konsequenz, daß in den Ribosomen acht falsche Aminosäuren in die wachsende Dystrophinkette eingebaut werden, bis schließlich das zuvor versteckte, aber jetzt aktivierte, *vorzeitige Stoppsignal* UGA erreicht wird. Die verschobenen Basensequenzen und die falschen Aminosäuren sind rot markiert. Die Synthese des Proteins Dystrophin wird vorzeitig abgebrochen, es bleibt unfertig und wird zerstört. Dadurch entwickelt sich Duchenne-Muskeldystrophie.

```

Ende Exon 49 | Start Exon 51
---CAG-CCA-GUG-AAG | CUC-CUA-CUC-AGA-CUG-UUA-
  gln pro val lys | leu leu leu arg leu leu

aktives Stoppcodon           Antisense-Oligoribonukleotid
                               UC-UUU-ACG-GUA-GAA-GGA-ACU
-CUC-UGG-UGA-CAC AAG---AAC-UAG-AAA-UGC-CAU-CUU-CCU-UGA-UGU-UGG--
  leu trp STOPP!

Ende Exon 51 | Start Exon 52
---AU-GAU-CAU-CAA-GCA-GAA-G | GC-AAC-AAU-GCA-GGA-UUU---

```

Das von den holländischen Forschern verwendete exon-skippende Antisense-Oligoribonukleotid AON PRO051, hier blau markiert, bindet sich durch Watson-Crick-Paarung an 20 Basen im Exon 51. Es blockiert dort die ESE-Sequenz, die zum Spleißen notwendig ist, und verursacht das Skippen von Exon 51 in der mRNA des *mutierten* Gens, die in diesem Beispiel die Sequenz des Exons 50 nicht enthält.

Wenn zusätzlich zum deletierten Exon 50 das Exon 51 durch Skippen entfernt wurde, dann folgt auf Exon 49 direkt Exon 52. Das Leseraster ist nicht mehr gestört, weil Exon 49 mit einem vollständigen Codon aufhört und Exon 52 mit einem vollständigen Codon von drei Basen anfängt.

```

Ende Exon 49 | Start Exon 52
---CAG-CCA-GUG-AAG | GCA-ACA-AUG-CAG-GAU-UUG---
  gln pro val lys | ala thr met gln asp leu

```

Jetzt gibt es kein vorzeitiges Stoppsignal mehr im Exon 52 oder später, aber 77 Aminosäuren fehlen von den 3.685 des normalen Proteins, diejenigen, deren Information in den Sequenzen der Exons 50 und 51 enthalten war. Sie fehlen im mittleren Teil des verkürzten Dystrophins, dessen Funktion aber wahrscheinlich wenig beeinträchtigt ist, so daß die schweren Symptome der Duchenne- in die weniger schweren der Becker-Muskeldystrophie abgeschwächt werden.