Wege der Forschung zur Heilung der Duchenne-Muskeldystrophie

Ein Bericht über den Stand der internationalen Forschung zur Entwicklung einer kausalen Therapie der Duchenne-Muskeldystrophie.

Aktualisiert im August 2003

Geschrieben in Zusammenarbeit mit Ärzten und Wissenschaftlern für die Mitglieder des deutschen „Duchenne Parent Project“

Aktion Benni & Co

und den Duchenne-Jungen und ihren Familien gewidmet überall auf der Welt von

Dr. rer. nat. Günter Scheuerbrandt

Dieser Bericht wurde für Familien geschrieben, die einen oder mehrere Jungen mit Duchenne-Muskeldystrophie haben. Er erklärt ihnen einige wissenschaftliche Grundlagen und dann die inzwischen zahlreichen Wege, auf denen viele Forscher versuchen, eine *wissenschaftlich begründete* und damit wirksame Therapie der Krankheit zu finden. Weil inzwischen in mehr als hundert Laboratorien in vielen Ländern daran gearbeitet wird, eine Heilung der Duchenne-Muskeldystrophie zu finden, werden hier nur die wichtigsten der zahlreichen Ergebnisse ausführlicher beschrieben. Eine Reihe von weiteren Ergebnissen sind stark abgekürzt zusammengefaßt.

Die erste Ausgabe dieses Berichtes im Jahre 2001 faßte die wichtigsten Vorträge der internationalen Arbeitstagung der *National Institutes of Health* im Mai 2000 in Bethesda bei Washington zusammen. **Diese dritte Version des Berichtes wurde im Juli und August 2003 geschrieben** vor allem mit Informationen aus Veröffentlichungen und durch direkten Kontakt mit vielen Wissenschaftlern.

Einführung

Einige wissenschaftliche Grundlagen werden erklärt, was Gene sind, wie sie arbeiten, warum Dystrophin wichtig ist, wie Mutationen Duchenne-Muskeldystrophie verursachen, und wie die Krankheit vererbt wird.

Gene und ihre Funktion: Gene sind funktionelle Einheiten oder Abschnitte des genetischen Materials der Chromosomen in den Kernen jeder Zelle. Dieses Material ist *Desoxyribonukleinsäure*, deren englische Abkürzung *DNA* ist, die hier auch im Deutschen verwendet wird. Ihre Struktur sieht wie eine umeinandergeschlungene Leiter aus, die *Doppelhelix*. Sie wurde vor 50 Jahren, 1953, von *James Watson* und *Francis Crick* entdeckt. Die beiden Holme der Leiter, die Stränge, sind lange Ketten aus Phosphorsäure und Desoxyribose, einer Art Zucker. Die Sprossen bestehen aus vier verschiedenen chemischen Substanzen, den *Basen* oder *genetischen Buchstaben*: *Adenin*, *Guanin*, *Thymin* und *Cytosin,* abgekürzt A, G, T und C. Sie stehen sich paarweise in jeweils einer der Sprossen der Doppelhelix gegenüber. Aus räumlichen Gründen können die Sprossen aber immer nur aus den Basenpaaren A-T oder G-C bestehen. Wenn die Reihenfolge, die *Sequenz* der *Basen* auf einem der Stränge zum Beispiel

---AGGCTTAATCGT---

ist, dann muß sie auf dem anderen Strang

---TCCGAATTAGCA---

sein. Die Sequenzen der beiden Stränge sind also *komplementär* zueinander.

Jede der ungefähr 100 Billionen Körperzellen des Menschen enthält in ihrem Kern 46 Chromosomen mit zusammen mehr als 6 Milliarden genetischen Buchstaben, die in 25.000 bis 30.000 Genen gruppiert sind. Fast alle Einzelheiten der Sequenz dieser Buchstaben sind jetzt bekannt. Sie ist die *genetische Information*, die von Generation zu Generation mit sehr wenigen Änderungen oder Mutationen weitergegeben wird. Die Mutationen, die für die Entwicklung aller Lebewesen notwendig waren, können aber negative Konsequenzen wie Erbkrankheiten mit sich bringen.

Die meisten Gene tragen die Information für die Herstellung von einem oder mehreren Proteinen, Eiweißkörpern, die aus Aminosäuren bestehen. Die Reihenfolge der Aminosäuren, von denen es 20 verschiedene gibt, ist wichtig für die Funktion der Proteine als *Enzyme*, die die biochemischen Vorgänge des Körpers steuern, als Regulatoren für andere Gene oder als Strukturmaterial. In den Zellkernen, in denen sich die Chromosomen befinden, wird die genetische Information abgelesen, *transkribiert*, und auf eine andere genetische Substanz übertragen, die ähnlich wie die DNA aufgebaut ist, die Prä-Boten-*Ribonukleinsäure* (englische Abkürzung: pre-mRNA). Die Gene der Vielzeller bestehen aus aktiven Abschnitten, den *Exons*, und inaktiven, den *Introns*. Nach der Transkription werden die Introns, die oft sehr viel länger als die Exons sind, aus der pre-mRNA herausgeschnitten und die Exons zur Boten-RNA, (englisch: messenger-RNA, *mRNA*), zusammengefügt, *gespleißt*. Diese wandert dann aus den Kernen zu den Ribosomen, den Protein-synthetisierenden Strukturen im Zytoplasma der Zelle. In den Ribosomen bauen katalytisch arbeitende RNAs, *Ribozyme*, aufgrund der genetischen Information der mRNA spezifische Proteine aus den einzelnen Aminosäuren zusammen, die den Ribosomen von einer weiteren Art RNA, den Transfer-RNAs, tRNA, angeliefert werden.

Die RNAs benutzen die Base U, Uracil, anstelle der sehr ähnlichen Base T der DNA. In der mRNA bedeuten immer drei aufeinanderfolgende Basen eine der 20 verschiedenen Aminosäuren gemäß einem „Wörterbuch“, dem *genetischen Code*, der für alles irdische Leben gleich ist. Die genetische Schrift benutzt also nur vier Buchstaben und ihre Wörter, die *Codons*, sind immer drei Buchstaben lang, sog. *Triplets*. Ein Wort folgt auf das andere ohne Zwischenraum, und es gibt drei verschiedene *Stoppcodons,* UAA, UAG und UGA, an denen die Proteinsynthese beendet wird.

Dystrophin-Gen: Duchenne-Muskeldystrophie ist eine der häufigsten Erbkrankheiten. Sie trifft einen von etwa 3.500 neugeborenen Jungen. Verursacht wird sie von *Mutationen,* Schädigungen, des *Dystrophin-Gens* mit der Konsequenz, daß das Protein *Dystrophin* gar nicht oder nur in Spuren in ihren Muskelzellen vorhanden ist.

Das Dystrophin-Gen wurde 1986 auf dem X-Chromosom identifiziert (*Kunkel*, Boston), und wenig später wurde auch seine Struktur aufgeklärt (*Hoffman*, Washington). Mit 2,6 Millionen Basenpaaren ist es das längste Gen des Menschen. Doch nur 13.993 Basenpaare = 0,5 %, gehören zu den 79 Exons des Gens, die zusammen die aktive kodierende Sequenz enthalten, die Information für die Synthese der verschiedenen Formen des Proteins *Dystrophin*. Die Transkription der Information des Dystrophin-Gens in die pre-mRNA wird von fünf DNA-Regionen, den *Promotern*, kontrolliert, die den Spleißprozeß so steuern, daß eine Reihe verschiedener Proteine entstehen. Das häufigste ist das Dystrophin der Muskeln, ein sehr langes stabförmiges Protein, das aus 3.685 Aminosäuren besteht.

Das Dystrophin befindet sich in den *Kostameren*, die die Z-Region der *Sarkomere*, den kontraktilen Strukturen, mit dem *Sarkolemm*, der Zellmembran, verbinden und für die Kraftübertragung notwendig sind. Es spielt also eine wichtige Rolle für die mechanische Stabilität der Muskelzellen während der Muskelkontraktion.

Dystrophin-Netzwerk: Dystrophin ist in ein Netzwerk aus vielen verschiedenen Proteinen eingebaut, von denen inzwischen mehr als 50 bekannt sind. Zu ihnen gehören Dystro- und Sarkoglykane, Syntrophine und Integrine, Dystrobrevin, NO-Synthase und weitere Komponenten wie Dysferlin, Sarkospan, Laminin, Kaveolin, Telethonin, Myotilin, Agrin, Neurexin, Desmuslin, Syncoilin, Fukutin, Aquaporin, Spektrin, Kollagen, Kalpain und andere. Es wird erwartet, daß noch weitere Komponenten entdeckt werden (*Campbell*, Iowa City).

Wenn Dystrophin fehlt, wird das Gleichgewicht zwischen den verschiedenen Teilen dieses Dystrophin-Komplexes gestört. Besonders die Dystro- und Sarkoglykane, sowie Sarkospan werden weniger oder verschwinden vollständig. Jedes der Proteine des Komplexes hat sein eigenes Gen, das ebenfalls durch Mutationen gestört sein kann. Dadurch können die bisher bekannten 13 ver-

schiednen Gliedergürtel- und 5 kongenitalen Muskeldystrophien, sowie mindestens 8 weitere neuromuskuläre Krankheiten entstehen.

Wie groß sind Moleküle, die DNA, das Dystrophin? Über die Größe von molekularen Strukturen, mit denen die Wissenschaftler arbeiten, macht man sich als Laie kaum eine richtige Vorstellung.

Folgendes Gedankenexperiment demonstriert die Kleinheit eines einfachen Moleküls. Man gieße einen Viertelliter Wein an der Straße von Gibraltar ins Mittelmeer. Dann rühre man das Mittelmeer gut durch und entnehme in Alexandria am anderen Ende mit dem gleichen Weinglas ein Viertelliter Wasser. Wie viele Alkoholmoleküle hat man jetzt im Weinglas? Zweiundzwanzig Millionen!

Die DNA-Doppelhelix hat einen Durchmesser von zwei Nanometern, Millionstel Millimeter. Wenn man die Helix so vergrößert, daß sie einen Durchmesser von ein Zentimeter hat, wie groß wäre ein Mensch von 1,80 Meter Größe, wenn man ihn gleichermaßen vergrößern würde? Neuntausend Kilometer, das ist ungefähr die Entfernung von Deutschland bis Florida.

Jeder Zellkern der 100 Billionen Zellen eines Erwachsenen enthält das gesamte genetische Material des Menschen mit 6 Milliarden Basenpaaren. Die Länge dieser DNA in allen Chromosomen jedes einzelnen Zellkerns beträgt zwei Meter!

Jedes Dystrophin-Protein ist 125 Nanometer lang, d.h., wenn 80.000 Moleküle hintereinander aufgereiht würden, wären sie zusammen gerade ein Zentimeter lang.

In einem Gramm Muskel befinden sich 114 Milliarden Dystrophin-Moleküle und damit auch die gleiche Zahl Dystrophin-Proteinkomplexe.

Mutationen und Krankheitsentstehung: Duchenne-Muskeldystrophie wird von drei verschiedenen Mutationsarten des Dystrophin-Gens verursacht: *Deletionen*, wenn ein oder mehrere Exons des Gens fehlen, *Duplikationen*, wenn Teile verdoppelt sind, und *Punktmutationen*, wenn einzelne Basen ausgetauscht, ausgefallen oder zusätzlich eingefügt sind. Da der Ablesemechanismus der Information in den Ribosomen immer Codewörter aus drei Buchstaben hintereinander ohne Zwischenräume liest, wird durch eine Mutation der Leserhythmus, das *Leseraster*, *nicht* gestört, wenn eine Anzahl von Basen ausgefallen oder eingefügt ist, die ohne Rest durch drei teilbar ist. Dadurch entsteht verkürztes oder verlängertes Dystrophin. Wenn diese Änderung nur nicht notwendige Strukturen im Dystrophin betrifft, z.B. den mittleren Teil, kann es noch teilweise funktionsfähig sein. Dann tritt die gutartigere Dystrophieform *Becker-Muskeldystrophie* auf.

Wenn das Leseraster durch die Mutation aber um eine oder zwei Basen verschoben ist, werden ab der Mutationsstelle falsche Aminosäuren in das Protein eingebaut bis schließlich ein neues und vorzeitiges Stoppcodon erreicht wird, an dem die Synthese abbricht. Dann kann das unvollständige Dystrophin seine normale Funktion nicht mehr erfüllen, es wird abgebaut und es entsteht die *Duchenne-Muskeldystrophie*.

Ohne Dystrophin degenerieren die Muskelzellen, sie werden zwar immer wieder regeneriert, doch dieser Reparaturmechanismus versagt schließlich. Die zerstörten Muskelfasern werden durch Fett und Bindegewebe ersetzt, dies führt zur Fibrose und mit zwei bis drei Jahren zu den ersten sichtbaren Zeichen der Krankheit.

An den Membranregionen, an denen die motorischen Nerven die Muskeln berühren, befindet sich ein anderes Protein, *Utrophin*, das ähnlich wie Dystrophin aufgebaut ist und etwas zur Stabilität der Muskelmembran beiträgt (*Davies*, Oxford). Ohne das Utrophin würde die Krankheit noch wesentlich schneller fortschreiten als sie es ohnehin schon tut.

Genetik der Duchenne-Muskeldystrophie: Außer den 44 normalen Chromosomen, den *Autosomesn*, haben Jungen zwei verschiedene Geschlechtschromosomen in jeder ihrer Körperzellen, ein Y-Chromosom und ein X-Chromosom. Wenn ihr Dystrophin-Gen auf ihrem einzigen X-Chromosom durch eine Mutation geschädigt ist, kann nicht, wie bei den Autosomen, die immer paarweise vorhanden sind, dieser Fehler durch ein intaktes Gen auf dem anderen Chromosom kompensiert werden. Daher bricht bei Jungen die Duchenne- bzw. die Becker-Muskeldystrophie aus.

Frauen haben jedoch zwei X-Chromosomen in ihren Körperzellen. Wenn sie ein mutiertes Dystrophin-Gen auf einem ihrer X-Chromosomen haben, können sie die Krankheit vererben, sie sind *genetische Überträgerinnen.* Da eines der X-Chromosomen aber inaktiviert ist und dies nach dem Zufallsgang geschehen ist, hat ungefähr nur die Hälfte ihrer Muskelzellkerne ein intaktes Dystrophin-Gen. Dies genügt aber, um keine oder nur geringe klinische Symptome der Muskeldystrophie zu verursachen.

Etwa zwei Drittel der Duchenne-Jungen erben die Krankheit, weil ihre Mutter eine solche *genetische Überträgerin* ist. Bei der *Meiose*, der Zellteilung, die zu den Eizellen führt, bekommt jede Eizelle nur ein X-Chromosom. Die Wahrscheinlichkeit, daß es das X-Chromosom mit der Genmutation ist, beträgt 50 %. Deshalb werden im Durchschnitt 50 % ihrer Söhne Duchenne-Muskeldystrophie haben, und im Durchschnitt werden 50 % ihrer Töchter wieder Überträgerinnen sein. Dieses Risiko bleibt für *alle* Kinder in einer Familie gleich, es wird nicht niedriger, wenn sie schon einen Sohn mit Duchenne-Dystrophie hat.

Wenn die Mutter eine Überträgerin ist, ist ihre Mutation entweder in den Keimzellen ihrer Eltern oder deren Vorfahren entstanden. Da alle Körperzellen der genetischen Überträgerin das mutierte Gen haben, kann ihre Überträgereigenschaft durch eine Genanalyse, z.B. in den Leukozyten, den weißen Blutkörperchen, nachgewiesen werden, weil sie Zellkerne mit Chromosomen haben.

Etwa ein Viertel der Krankheitsfälle wird von einer *Neumutation* verursacht. Bei ihnen fand die Mutation *spontan* in derjenigen Eizelle der Mutter statt, aus der der kranke Sohn entstand. Da nur eine Eizelle betroffen ist, haben alle anderen Kinder dieser Mütter *kein* größeres als das allgemeine Risiko, die Krankheit ebenfalls zu bekommen.

Bei ungefähr einem Zehntel der Duchenne-Jungen aber hat die Mutter ein *Keimzellmosaik*, weil die neue Mutation schon früh bei der Keimzellentwicklung entstand und sich aus der mutierten Zelle eine Gruppe von Zellen entwickelte, die alle die Mutation tragen. Da mehr als eine Eizelle betroffen ist, kann ein weiterer Sohn die Krankheit ebenfalls erben oder eine Tochter eine genetische Überträgerin sein.

Da ein Keimzellmosaik noch nicht nachgewiesen werden kann, sollte allen Frauen, die bereits einen Sohn mit Duchenne-Muskeldystrophie haben, bei einer weiteren Schwangerschaft eine vorgeburtliche Diagnose angeboten werden und nicht nur solchen, die nachgewiesen genetische Überträgerinnen sind (*Müller-Reible*, Würzburg).

Verlauf der Duchenne-Muskeldystrophie: Die ersten klinischen Zeichen treten mit zwei bis drei Jahren auf, wenn das Kind Schwierigkeiten beim Gehen und vor allem beim Treppensteigen bekommt. Ohne Früherkennung wird auch heute noch die Krankheit erst mit ca. 3 bis 5 Jahren diagnostiziert. Wegen zunehmender Kontrakturen, vor allem an den Fuß-, Knie- und Hüftgelenken, verlieren die Patienten mit 10 bis 12 Jahren ihre Gehfähigkeit. Fortschreitende Rückgratverkrümmungen, Skoliosen, und Bewegungseinschränkungen machen sie bald ganz von intensiver Pflege abhängig. Die Beeinträchtigung der Atem- und Herzfunktionen führen zum Tod durch Herz- und Kreislaufversagen im frühen Erwachsenenalter. Frühe orthopädische Operationen zur Vermeidung von Kontrakturen und Rückgratverkrümmungen, sowie Atemhilfen und andere Maßnahmen können die Lebensqualität verbessern und die Lebenserwartung deutlich erhöhen.

Gendiagnostik

Gentechnische Methoden für die Diagnose der Duchenne- und Becker-Muskeldystrophie bei einem Jungen, während einer Risikoschwangerschaft und für die Bestimmung von Überträgereigenschaften bei einer Frau. Früherkennung im Säuglingsalter.

Diagnose der Duchenne-Muskeldystrophie bei einem Jungen: Für die Genanalyse wird eine Blutprobe benötigt, die Leukozyten enthält. Diese weißen Blutkörperchen, aber nicht die roten, haben Zellkerne, in denen sich das Erbmaterial DNA befindet. Die weißen Zellen werden isoliert und aus ihnen die DNA gewonnen.

Da etwa 60 % der Duchenne-Patienten eine Deletion von einem oder mehreren Exons im Dystrophin-Gen haben, wird zunächst nach Deletionen gesucht, die zwar im ganzen Gen vorkommen, aber in manchen Regionen häufiger sind als in anderen. In einem ersten Arbeitsgang werden im allgemeinen 19 der 79 Exons des Dystrophin-Gens gezielt vermehrt, *amplifiziert*. Normalerweise werden die 19 Exons nicht alle auf einmal untersucht, sondern in *Multiplex-Reaktionen*, d.h., in Gruppen von 4 bis 6 Exons gleichzeitig.

Damit werden bereits 98 % aller Deletionen erfaßt. Bei etwa zwei Drittel dieser Fälle kann man dann schon feststellen, ob das Leseraster gestört ist oder nicht, und damit voraussagen, ob der Patient eine Duchenne- oder eine Becker-Dystrophie hat. Für das restliche Drittel müssen weitere Exons amplifiziert werden.

Die Amplifikation geschieht mit der *Poly-*

merase-Kettenreaktion, PCR, die für jedes Exon *Primers* braucht. Das sind kurze synthetisch hergestellte DNA-Sequenzen, die sich ganz spezifisch an den Anfang und das Ende einer Exon-Sequenz anlagern. Die dabei erhaltenen kleinen Genbruchstücke werden durch Elektrophorese aufgetrennt, bei der sie in einer Gelschicht in einem elektrischen Feld unterschiedlich weit wandern und dann sichtbar gemacht werden. Es entstehen Bänder wie Sprossen einer Leiter, die unterschiedliche Abstände haben, und von denen jedes Band ein bestimmtes der 79 Exons repräsentiert. Eine Deletion erkennt man daran, daß ein oder mehrere dieser Bänder fehlen.

Wenn keine Deletion gefunden wird, ist eine *Punktmutation* anzunehmen. Um sie eindeutig zu charakterisieren, müßte die Basen-Sequenz in den meisten Exons bestimmt werden. Solche Sequenzierungen sind aber sehr aufwendig und werden noch nicht als Routinetests angeboten. Eine endgültige Diagnose kann in diesen Fällen in der Regel nur durch die Untersuchung von Muskelgewebe gestellt werden, das durch eine Biopsie gewonnen wurde. Darin wird nicht das Dystrophin-Gen, sondern das Dystrophin-Protein im *Western-Blot* analysiert.

Dabei wird nach der elektrophoretischen Trennung das Proteinmuster auf ein anderes Trägermaterial durch Abdruck, englisch „blot“, übertragen und dort mit Antikörpern sichtbar gemacht. Oder man heftet fluoreszierende Antikörper an das Dystrophin an und kann es dann unter dem Mikroskop als helle Linien um gesunde Muskelzellen herum sehen. Bei Duchenne-Dystrophie ist es dort kaum oder gar nicht zu sehen und bei Becker oft ausgefranst, unterbrochen und meistens viel schwächer als in einem normalen Präparat.

Wenn eine Genanalyse ein eindeutiges Ergebnis liefert, dann ist eine Muskelbiopsie in der Regel nicht notwendig. Dies würde vor allem kleinen Kindern diesen operativen Eingriff ersparen. Falls eine Muskelbiopsie doch notwendig ist, kann sie auch unter Lokalanästhesie als *Nadelbiopsie* durchgeführt werden.

Vorgeburtliche Diagnostik: Für eine pränatale Diagnose der Duchenne-Muskeldystrophie muß es einen konkreten Anlaß geben, meistens weil es bereits einen Duchenne-Patienten in der Familie gibt oder gegeben hat. Für eine Diagnose in der Frühschwangerschaft braucht man kindliches Gewebe, das man entweder durch eine *Chorionzottenbiopsie* um die 10. bis 12. Schwangerschaftswoche erhalten kann oder durch eine *Amniozentese* in der 13. bis 16. Woche.

Bei der Chorionzottenbiopsie wird ein Stückchen des späteren Mutterkuchens mit einer feinen Kanüle angesaugt. Wenn sichergestellt ist, daß man kindliche Zellen erhalten hat, kann das Gewebe direkt zur Untersuchung eingesetzt werden. Das Risiko, daß durch den Eingriff die Schwangerschaft ungewollt beendet wird, liegt aber in der Größenordnung von etwa 3 bis 5 %.

Der Vorteil der Amniozentese ist das geringere Risiko von unter 1 %. Der Nachteil ist, daß man die aus dem Fruchtwasser gewonnenen wenigen kindlichen Zellen erst im Laboratorium vermehren muß, was bis zu 3 Wochen dauern kann, so daß man erst in der 15. bis 18. Woche mit der Analyse beginnen kann.

Hat man genügend kindliche Zellen erhalten, werden zuerst die Chromosomen bestimmt, damit wird vor allem das Geschlecht des Kindes festgestellt. Wenn das Kind ein Mädchen ist, werden in der Regel keine weiteren Untersuchungen gemacht, weil die Konsequenzen einer Überträgereigenschaft mit dem Mädchen selbst diskutiert werden sollte, sobald es alt genug ist, sie zu verstehen, um ihre sehr persönlichen Entscheidungen zu treffen.

Wenn das ungeborene Kind ein Junge ist, wird meistens eine Genanalyse durchgeführt mit den gleichen Untersuchungstechniken, die auch für die Diagnostik nach der Geburt beschrieben wurden.

Diagnose von Überträgerinnen: Wenn die Mutation bei einem Duchenne-Jungen in der Familie genau bekannt ist, kann man gezielt auch bei der Mutter und anderen über die Mutter verwandten Frauen danach suchen. Das ist technisch schwieriger als bei Duchenne-Jungen, weil nur eines der beiden X-Chromosomen einer Frau die Mutation tragen könnte. Bei einer Überträgerin sieht man daher nur eine oder mehrere halb so intensiven Banden in der Elektrophorese wenn ein oder mehrere Exons fehlen. Die Amplifikation der Exons ist aber nicht einfach zu steuern. Dadurch ist es oft schwer, die Unterschiede der Intensität zuverlässig zu erkennen.

Deswegen benutzt man oft *polymorphe Marker* zur Analyse. Dies sind DNA-Sequenzen in den Introns zwischen den Exons, die auf den beiden X-Chromosomen fast immer verschieden angeordnet und auch verschieden lang sind, so daß man die Chromosomen voneinander unterscheiden kann. Diese Marker-Sequenzen, die mit der Krankheit

nichts zu tun haben und deren genaue Struktur und Anordnung für jeden Menschen charakteristisch sind, lassen sich auch mit der PCR-Methode verstärken und nach einer Elektrophorese eindeutig identifizieren.

Bei einer Deletion im Dystrophin-Gen eines Jungen fehlen nicht nur ein oder mehrerer Exons, sondern auch die Marker in den Introns zwischen ihnen. Bei einer Frau kann man dann überprüfen, ob auf einem ihrer X-Chromosomen diese Marker ebenfalls fehlen oder nicht. Fehlen die Marker, die ihr Sohn auch nicht hat, dann hat sie höchstwahrscheinlich die gleiche Deletion wie er auf einem ihrer X-Chromosomen und ist damit eine Überträgerin. Wenn sie keine Überträgerin ist, müßte sie zusätzliche Marker in diesem Bereich haben.

Die DNA-Marker kann man auch verwenden, wenn beim Patienten in der Familie keine Deletion gefunden wurde. Man weiß dann zwar nicht, wie die Mutation aussieht, aber man kann aufgrund der Anordnung der Marker sagen, auf welchem Chromosom der Mutter das defekte Gen liegt, das auch der kranke Sohn von ihr geerbt hat. Und jede Frau in der Familie, die das gleiche X-Chromosom hat, hat ein hohes Risiko, Überträgerin zu sein.

Diese indirekte Methode wird seit ca. 20 Jahren angewendet, man kennt jetzt aber viel mehr Marker als früher, deshalb kann man die beiden X-Chromosomen einer Frau fast immer voneinander unterscheiden, und es kommt kaum mehr vor, daß eine Familie *nicht informativ* ist.

Falls jedoch diese Methoden nicht zum Erfolg führen, kann man in manchen Fällen mit fluoreszierenden Gen-Sonden bestimmte Gen-Abschnitte auf dem X-Chromosom markieren und dann unter dem Mikroskop an leuchtenden Punkten erkennen, ob diese Gen-Abschnitte vorhanden sind oder nicht. Dies *FISH* (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung) genannte Methode ist aber nur anzuwenden, wenn in der Familie ganz bestimmte Deletionen aufgetreten sind.

Sequenzanalyse des Dystrophin-Gens als Routinemethode: Mit der neuen Analysenmethode SCAIP werden sich in Zukunft auch die Punktmutationen und kleine Deletionen – sowie auch alle anderen Mutationen – zuverlässig innerhalb von drei Tagen bestimmen lassen. Dabei werden alle Exons des Dystrophin-Gens, alle Intron-Exon-Grenzregionen mit den Spleißsignalen, und alle Promoter vollständig sequenziert. Dazu werden diese Genabschnitte, die zusammen ca. 110.000 Basenpaare lang sind, individuell mit ihren spezifischen Primern parallel in einer einzigen PCR-Kettenreaktion amplifiziert und dann gemeinsam mit einer Mikro-Elektrophorese überprüft. Dadurch lassen sich alle Exon- und Promoter-Deletionen – auch die mit den anderen Methoden nicht erkannten – nachweisen. Mit Sequenzierungs-Primern wird dann für jedes Genbruchstück die Reihenfolge der Basen automatisch bestimmt, um die Punktmutationen zu finden.

Da diese Methode auch alle Mutationen bei Überträgerinnen findet, wird sie zu einer wesentlichen Verbesserung der genetischen Beratung führen. Es wird jetzt eine Datensammlung eingerichtet, die dazu dienen wird, aus einer bestimmten Deletion, Duplikation oder Punktmutation den klinischen Verlauf einer Duchenne- oder Becker-Dystrophie vorauszusagen. Dazu müssen sehr viele Patienten klinisch und genetisch untersucht werden (*Flanigan,* Salt Lake City).

Früherkennung im Säuglingsalter (ohne Gentechnik)**:** In Deutschland werden 4 Wochen bis 1 Jahr alte Säuglinge mit Duchenne- und Bekker-Muskeldystrophie, die noch keine Krankheitssymptome haben, in einem freiwilligen *CK-Screening-Programm* aufgefunden, bei dem das Enzym Creatinkinase (CK) in einem trockenen Blutstropfen bestimmt wird. Seit 1974 bis Juli 2003 sind mehr als 500.000 Jungen getestet worden. Unter ihnen fanden sich 178 Jungen mit stark erhöhten CK-Aktivitäten, bei 136 wurde eine Duchenne-Muskeldystrophie (1:3.700) diagnostiziert oder sehr wahrscheinlich gemacht und bei 28 eine Becker-Muskeldystrophie (1:17.800).

Die Früherkennung erlaubt es den Eltern, *die für sie richtigen Entscheidungen rechtzeitig zu treffen*, damit in der gleichen und über die Mutter verwandten Familien kein weiteres Kind mit der Krankheit geboren wird. Außerdem wird die oft jahrelange *diagnostische Odyssee* vermieden, bis ein Experte für Muskelkrankheiten gefunden wird, der die richtige Diagnose stellt. Solche Programme werden in Zukunft allgemein notwendig sein, weil wegen der Fortschritte der Therapieforschung immer öfter klinische Studien mit ganz jungen Patienten ohne klinische Symptome durchgeführt werden müssen (*Scheuerbrandt*, Breitnau).

Therapiemöglichkeiten

Forschungsstrategien nach einer kausalen Therapie. Es gibt bisher noch keine Therapie der Duchenne-Muskeldystrophie.

Um die Duchenne-Muskeldystrophie zu heilen, müssen die Konsequenzen der Mutation im Dystrophin-Gen, also die Muskeldegeneration, beseitigt oder zumindest abgeschwächt werden. Das kann entweder durch eine *Gentherapie* oder durch eine *medikamentöse Therapie* geschehen. Eine Gentherapie bedeutet, daß entweder alle aneinandergehängten Exons des normalen Dystrophin-Gens - seine sog. *cDNA* – oder Teile davon in jede Muskelzelle eingebracht werden, oder daß das geschädigte Gen durch gentechnische Maßnahmen repariert wird. Eine medikamentöse Therapie würde bedeuten, daß ein neues oder ein bereits bekanntes Medikament gegeben werden kann, das den Muskelabbau verhindert oder verlangsamt, ohne das Gen selbst zu beeinflussen. Auf beiden Wegen sind in den letzten Jahren Fortschritte erzielt worden.

Es gibt noch keine Therapie: Trotz dieser Fortschritte ist bisher weder eine Gen- noch eine medikamentöse Therapie entwickelt worden, die die Krankheit der Duchenne-Jungen heilen könnte. Es gibt zur Zeit nur drei miteinander verwandte Medikamente, *Prednison, Prednisolon* und *Deflazacort*, die während einer begrenzten Zeit die Degeneration der Muskeln verlangsamen können.

Wegen der Schwere der Krankheit wollen die Patienten, ihre Familien, ihre Ärzte und die Öffentlichkeit selbst die kleinsten positiven Forschungsergebnisse erfahren, und die Medien, hauptsächlich Zeitungen und Fernsehen, auch die verantwortlichen unter ihnen, haben die Tendenz, bescheidene Fortschritte als wichtige Durchbrüche darzustellen. Aber auch die Wissenschaftler sind manchmal überoptimistisch, wenn sie die Ergebnisse ihrer Experimente an Tieren zu therapeutischen Siegen deklarieren, womit sie dann falsche Hoffnungen erzeugen. *Doch bisher ist noch kein einziger Duchenne-Junge geheilt worden!*

Transfer eines neuen Dystrophin-Gens.

Die Exons des ganzen oder eines verkürzten Dystrophin-Gens können durch Viren, Plasmide oder Myoblasten neu in die Muskelzellen transferiert werden. Immunreaktionen müssen vermieden werden.

Man kann annehmen, daß der Transfer, die Übertragung, einer genügenden Menge des intakten Dystrophin-Gens in die Zellkerne der dystrophischen Muskelzellen die Krankheit heilen wird unter der Voraussetzung, daß die genetische Information der neuen Gene von den Protein-syntheisierenden Ribosomen der Zelle benutzt wird, um genügend große Mengen von funktionierendem Dystrophin zu produzieren, das dann an seinen normalen Platz unter der Zellmembran wandert und dort auch in das komplizierte Protein-Netzwerk der Kostameren auf normale Weise eingebaut wird.

Die dystrophische Maus: Die meisten Experimente mit diesem Ziel sind an einem Versuchstier, der dystrophischen *mdx-Maus,* ausgeführt worden, die eine Punktmutation am Nukleotid 3.185 im Exon 23 ihres Dystrophin-Gens hat. Diese Mutation hat ein CAA-Codon, das die Aminosäure Glutamin bedeutet, in ein TAA-Codon verändert, das ein Stoppcodon ist, so daß die Synthese des Dystrophins vorzeitig beendet wird und die Maus deswegen kein funktionierendes Dystrophin in ihren Muskeln hat. Diese Mäuse verlieren jedoch ihre Muskeln nicht, weil sich bei ihnen keine *Fibrose* entwickelt, die Proliferation des Bindegewebes, wie bei den Duchenne-Jungen, so daß ihre von der Krankheit verursachten Degenerationsprozesse nicht die Regeneration überholen.

Obgleich der Gentransfer an ihnen studiert werden kann, darf man nicht vergessen, daß alle Ergebnisse, die mit diesen Mäusen erhalten werden, nicht unmittelbar auf Kinder übertragen werden können, solange sie nicht in klinischen Studien an Duchenne-Patienten bestätigt wurden. *Ein Kind ist keine große Maus!*

Der dystrophische Hund: Einige Experimente werden auch an dystrophischen Apportier-Hunden, (*golden retriever muscular dystrophy dogs*, GRMD) durchgeführt, die im Gegensatz zu den Mäusen eine Muskeldystrophie ähnlich der Duchenne-Dystrophie haben. Sie sind wirklich behindert und deshalb schwierig zu züchten und

zu betreuen. Ihr Dystrophin-Gen hat eine Punktmutation in der Spleißrezeptor-Region des Introns 6, die zu einer Deletion des Exons 7 in der mRNA führt und damit zu einer Leserasterverschiebung und einem vorzeitigen Stoppcodon.

Gentransfer mit Adenoviren: Um ein Gen zu transferieren, braucht man einen Transporter, einen *Gen-Vektor*. Eine Möglichkeit, das genetische Material in lebende Zellen einzubringen, ist, es in Viren zu verpacken. Viren bestehen aus einer Reihe von eigenen Genen, die von einer Proteinhülle umgeben sind. Sie binden sich an spezielle Rezeptor-Proteine an der Oberfläche einer Zelle, injizieren ihre Gene durch die Zellmembran hindurch und benutzen dann die Synthesemechanismen der befallenen Zelle, um sich selbst zu reproduzieren.

Hauptsächlich zwei Virenarten werden als Gen-Vektoren von der Duchenne-Forschung verwendet: die *Adenoviren*, und die zehnmal kleineren *adeno-assoziierten Viren*. Die aus ihnen abgeleiteten Vektoren können sich nicht mehr in den Zielzellen vermehren, weil man ihnen die meisten der eigenen Gene fortgenommen hat. Am aussichtsreichsten scheint das ausgeweidete, praktisch leere Adenovirus (*gutted virus*) zu sein, das keine eigenen Gene mehr hat, dafür aber Platz für bis zu 36.000 genetischen Buchstaben, genug für die ganze cDNA, also für alle Exons mit der Information für das vollständige Dystrophin-Protein und für zusätzliche Kontrollsequenzen. Mit diesen ausgeweideten Viren wurden in bis zu 30 % der Muskelfasern der dystrophischen Maus neues Dystrophin erzeugt und sowohl in jungen wie auch in älteren Mäusen eine Verbesserung der Funktion erreicht (*Lochmüller*, München; *Chamberlain*, Seattle).

Zwei Gene in einem Virus: In neuen Experimenten wurden jeweils *zwei* Mäuse-Dystrophin-cDNAs in die ausgeweideten Viren eingebaut, also zweimal alle 79 Exons ohne die Introns, und zusätzlich zwei weitere Gensequenzen, den sehr starken „Enhancer“ (Verstärker) des Cytomegalovirus und den Beta-Actin-Promoter. Diese Genfähren wurden in den Tibialis-anterior-Muskel neugeborener mdx-Mäuse injiziert und in 4-6 Wochen alte „jugendliche“ Mäuse. Im behandelten Muskel der neugeborenen Mäuse hatten nach 10 Tagen 42 % der Zellen neues Mäuse-Dystrophin, das nach einem halben Jahr immer noch nachzuweisen war. Bei den jugendlichen Mäusen hatten nach 30 Tagen 24 % der Zellen neues Dystrophin, das aber nach 6 Monaten auf die Hälfte zurückging. Geringe Immunprobleme gab es nur bei den jugendlichen Mäusen. Diese neue Vektorkonstruktion ist zur Zeit die wirksamste für die Behandlung von Duchenne-Dystrophie durch Gentherapie (*Karpati*, Montreal).

Gentransfer mit adeno-assoziierten Viren: Diese kleinen Viren können nur Genmaterial transportieren, das nicht länger als ungefähr 5.000 Basenpaare ist, etwa ein Drittel der ganzen Dystrophin cDNA. Ihr Vorteil ist, daß sie das Gen effektiver als das normale Adenovirus übertragen, der Nachteil, daß die zu übertragende Dystrophin-cDNA stark verkürzt werden muß, damit sie in diesen kleinen Vektor hineinpaßt. Patienten mit Becker-Muskeldystrophie, deren Krankheit viel langsamer als Duchenne-Dystrophie verläuft, haben meistens solches verkürztes Dystrophin in ihren Muskeln. Deshalb würde der Transfer solcher Becker-*Minigene* die Duchenne-Muskeldystrophie nicht vollständig heilen, sondern nur in die gutartigere Becker-Form abändern.

Um festzustellen, welche der vier Regionen des normalen Dystrophin-Proteins, die beiden Endregionen, die Cystein-reiche, oder die stabförmige mittlere Region, wichtig sind oder nicht, wurden umfangreiche Experimente an dystrophischen Mäusen durchgeführt, die genetisch modifiziert waren, so daß sie eine von neun verschiedenen verkürzten Dystrophin-Proteinen in ihren Muskeln bildeten.

Es war bereits bekannt, daß nur ein Teil der mittleren stabförmigen Region ohne Funktionsverlust herausgenommen werden kann. Die detaillierte Analyse der dreidimensionalen Struktur zeigte, auf welche spezifischen Teile dieser Stabstruktur verzichtet werden kann, ohne daß die muskelschützende Funktion verlorengeht. Eines der kürzeren Dystrophine, das nur etwa halb so lang war wie das normale, hatte praktisch die gleichen Eigenschaften wie das unveränderte Protein. Der Transfer seines Gens und einiger anderer verkürzter Dystrophin-Gene in die Muskeln von mdx-Mäusen vermied die dystrophischen Symptome und machte sie teilweise rückgängig. Diese Ergebnisse zeigen, daß spezifische Veränderungen am Dystrophin-Gen neue Proteine hervorbringen können, die deutlich kleiner aber funktionsfähiger sind als das natürlich verkürzte Dystrophin von Patienten mit Becker-Muskeldystrophie (*Chamberlain*, Seattle).

Wenn etwa 30 % der normalen Menge des un-

veränderten Dystrophins erreicht wird, deuten Messungen am Zwerchfell der Mäuse darauf hin, daß auch die Muskelfunktion verbessert wird. Auch durch die Übertragung des Minigens wird eine deutliche Verbesserung der Muskelfunktion erreicht. Diese Versuche haben außerdem gezeigt, daß die Genübertragung um so bessere Ergebnisse zeigt, je jünger die Versuchstiere sind, weil es bei ihnen weniger Immunprobleme gibt und daher das neugebildete Dystrophin auch nach einer einzigen Behandlung länger in den Muskeln bleibt als bei erwachsenen Tieren. In neugeborenen Mäusen ist nach einmaliger Behandlung noch nach einem Jahr das neugebildete Dystrophin vorhanden.

Für eine spätere Anwendung beim Menschen bedeutet das, daß kranke Kinder möglichst bald nach der Geburt behandelt werden müßten, solange ihre Muskeln noch weitgehend intakt sind (*Clemens*, Pittsburgh).

Gentransfer über die Blutbahn: Bei den bisher beschriebenen Versuchen wurden Lösungen mit Viren, die das Dystrophin-Gen enthielten, direkt in die Muskeln gespritzt. Um aber alle Muskeln zu erreichen, auch die Herz- und Atemmuskeln, versucht man, eine *systemische* Behandlung zu entwickeln, d.h., um die Vektoren in die Blutbahn spritzen zu können. Um sicherzustellen, daß bei einer solchen Behandlung das neue Dystrophin nur in den Muskelzellen entsteht, muß man dem Dystrophin-Gen im Virus noch zusätzlich einen weiteren Genabschnitt anfügen, einen *CK-Promoter*, der normalerweise das Gen des Muskelproteins Creatinkinase aktiviert. Dieser Promoter würde sicherstellen, daß das neue Dystrophin-Gen nur in Muskelzellen aktiviert wird und nicht auch anderswo.

Um zu prüfen, ob eine solche Strategie in einem lebenden Tier funktioniert, wurden *transgene* mdx-Mäuse gezüchtet, die in ihren Chromosomen eine zusätzliche Genkonstruktion dauerhaft eingebaut hatten. Sie bestand aus einem oft verwendeten Becker-Gen, das mit 6.300 Basenpaaren nur halb so lang war als das normale Gen, und dem zusätzlich noch ein CK-Promoter mit 1.354 Basenpaaren vorgeschaltet war. Verkürztes Dystrophin war in den Mäusen während ihrer ganzen Lebenszeit bis zu 24 Monaten in genügender Menge vorhanden, um alle meßbaren Krankheitszeichen wesentlich zu verbessern.

Das neue Protein entstand nur in den Muskeln der transgenen Mäuse und zwar deutlich mehr in den schnellen Muskeln als in den langsamen. Die schnellen Muskeln, die sofort, aber nicht ausdauernd arbeiten können, beziehen ihre Energie durch Glykolyse, also durch den schnellen Abbau von Glukose ohne Verbrauch von Sauerstoff. Die langsamen, ausdauernd arbeitenden Muskeln werden von den Enzymen der Atmungskette mit Energie versorgt, der langsamen „Verbrennung“ von organischen Substanzen mit Sauerstoff. Da die schnellen Muskeln von der Muskeldystrophie zuerst zerstört werden, kann die bevorzugte Entstehung des neuen Dystrophins in diesen schnellen Muskeln gerade diese frühe Auswirkung der Krankheit mildern. Die Versuche haben auch gezeigt, daß bereits 20 % bis 30 % der normalen Menge an Dystrophin eine deutliche therapeutische Wirkung haben.

Bei den Versuchen mit diesen transgenen Mäusen wurde das Becker-Dystrophin-Gen zusammen mit dem CK-Promoter durch Reagenzglas-Befruchtung und genetischer Manipulation in die Keimbahn eingebracht, so daß es sich auch an die Nachkommen der Mäuse vererbte. Das ist eine Technik, die man beim Menschen nicht anwenden wird. Bei den kranken Kindern müßte das Gen mit seinem Promoter nach der Geburt per Gentransfer mit einem Vektor in möglichst alle Muskeln transportiert werden (*Lochmüller*, München).

Verstärkung des gezielten Gentransfers: Die Viren binden sich an spezifische Strukturen auf der Zellmembran, an die Coxsackie- und Adenovirus-Rezeptoren, von denen aus sie dann durch die Membran hindurch in die Muskelzelle eindringen. Diese Rezeptoren sind jedoch zahlreicher auf sich entwickelnden und regenerierenden Muskelzellen. Sie sind herunterreguliert, weniger zahlreich, auf ausgereiften Muskelzellen, die sich nicht mehr teilen. Deshalb ist der Gentransfer mit Adenovirus-Vektoren effektiver in regenerierenden, sich teilenden Muskelzellen.

Um diesen Nachteil zu vermeiden, wurden *transgene* Mäuse gezüchtet, welche diese Rezeptoren in großen Mengen auf der Oberfläche reifer Muskelzellen ausbilden. Dadurch konnte die Wirksamkeit des Dystrophin-Gentransfers bis zum 10fachen verstärkt werden (*Holland*, Montreal; *Lochmüller*, München).

Da eine Vermehrung der Virus-Rezeptoren auf den Muskelzellen eines Patienten nur mit zusätzlichen gentechnischen Maßnahmen mit allen ihren Risiken zu erreichen wäre, wurden Hilfsproteine hergestellt. In diesem Fall waren es monoklonale Antikörper, die nur aus einer Sorte bestanden und

die sich mit einem Ende ganz spezifisch an andere, häufigere Rezeptoren banden. Mit ihrem anderen Ende konnten diese Immunproteine von gentechnisch veränderten Hüllproteinen der Adenoviren festgehalten werden. Für dieses Festhalten hatte man mit einer Genmanipulation den Viren die zusätzliche Gen-Information für eine Kette von 33 Aminosäuren aus einem Bakterium eingesetzt.

Diese Adenoviren konnten jetzt über die Antikörper-Brücke an andere, gegenüber den Adenoviren-Rezeptoren viel zahlreicheren Integrin- und Nerven-Rezeptoren (NCAM) andocken und die Muskelzellmembran durchqueren. Dadurch konnten bis zu 77mal mehr Adenoviren mit ihrem mitgebrachten Gen in die Muskelzellen eindringen. Bisher wurde mit dieser auch bei anderen Krankheiten anwendbaren neuen Technik nur das Gen transportiert, das das leicht nachweisbare Protein β-Galaktosidase herstellt. Versuche zum Transport des Dystrophin-Gens sind geplant (*Kochanek*, Köln).

Transfer nackter Gene: Bei dieser Technik wird das genetische Material, DNA, nicht in ein Virus eingebaut, sondern in Plasmide. Dies sind kleine ringförmigen DNA-Strukturen ohne Protein, die normalerweise in Bakterien vorkommen und dort vor allem Resistenz gegen Antibiotika auslösen. Der Vorteil dieser Art Gentransfer ist, daß die Plasmide überhaupt kein Protein enthalten, nur genetisches Material, *nackte DNA*, so daß sich keine Immunreaktion gegen das Vektormaterial entwickeln kann.

Versuche mit Plasmiden wurden durchgeführt, die Markierungsgene, auch Reportergene genannt, enthalten, also Gene, deren Proteine sich durch Färbung oder Lichterzeugung nachweisen lassen, so daß der Erfolg eines Transfers einfach überprüft werden kann.

In Rhesusaffen konnte mit dieser Technik, bei der die Plasmide in relativ großen Mengen Flüssigkeit in die Arterien der Gliedmaßen unter Druck eingespritzt wurden, das Reportergen β-Galaktosidase in bis zu 20 % der Muskelfasern nach einer einzigen Injektion übertragen werden und bis zu 40 % nach wiederholten Injektionen. Der Druck wurde durch eine kurzzeitige Blockade des venösen Blutausflusses aus einer Gliedmaße des Versuchstiers erzeugt. Versuche zur Übertragung des Dystrophin-Gens werden jetzt mit mdx-Mäusen, Affen und GRMD-Hunden durchgeführt (*Wolff*, Madison; *Braun*, Straßburg). In Frankreich haben klinische Versuche an Duchenne-Jungen mit dieser Technik begonnen, die im Abschnitt „Klinische Studien“ beschrieben sind.

Experimente zur Lösung der Immunprobleme: Da die Plasmide nur DNA, aber keine Proteine enthalten, kann man mit dem Transfer solcher *nackter* DNA die möglichen Probleme untersuchen, die durch die Immunantwort nur auf das neugebildete Dystrophin entstehen könnten, denn es gibt keine Komplikationen mit anderen Proteinen, die beim Gentransfer durch Viren- oder Zellvektoren mitübertragen werden.

Wenn man menschliche Dystrophin-Gene in die Muskeln von mdx-Mäusen einbringt, gibt es eine Immunantwort gegen das fremde Dystrophin-Protein. Dies geschieht nicht nach dem Transfer des Dystrophin-Gens der Mäuse, obgleich normales Dystrophin in den Muskeln dieser dystrophischen Mäuse *nicht* vorhanden ist. Wahrscheinlich bleibt die Immunantwort auf das Dystrophin der Mäuse aus, weil noch die anderen Arten von Dystrophin vorhanden sind. Dies deutet darauf hin, daß die Immunantwort auf einen Dystrophin-Gentransfer bei Duchenne-Patienten kein besonderes Problem sein würde, besonders bei solchen, die eine Punktmutation haben, die nicht die Synthese der anderen Dystrophinarten beeinträchtigt. Mit jetzt laufenden Experimenten soll festgestellt werden, welche anderen Dystrophine vorhanden sein müssen, damit das Immunsystem neues Muskel-Dystrophin nach einem Gentransfer toleriert (*Wells*, London).

Experimente mit Stammzellen.

Unter den Satellitenzellen und Myoblasten der Muskeln, den Zellen der Haut und der Blutgefäße gibt es Stammzellen, die Muskeln neu bilden oder regenerieren können.

Stammzellen kommen in vielen Körpergeweben vor, auch in Skelettmuskeln und im Knochenmark. Sie sind nicht-spezialisierte Zellen, die sich zu einigen Arten von spezialisierten Zellen entwickeln können, z.B. Knochenmarkstammzellen zu verschiedenen Arten von Blutzellen und Muskelstammzellen zu neuen Muskelzellen. Diese *pluripotenten* Zellen sind somatische oder *adulte*

Stammzellen im Gegensatz zu frühen embryonalen Stammzellen, die *totipotent* sind und sich deshalb zu *allen* Arten von Zellen entwickeln können. Die Forschung an Stammzellen zur Entwicklung einer Therapie für Duchenne-Muskeldystrophie verwendet mit einer Ausnahme bisher nur adulte Stammzellen von Versuchstieren. Die ethischen Probleme, die bei der Verwendung von menschlichen embryonalen Stammzellen auftreten könnten, sollten sich vermeiden lassen.

Stammzellen aus Skelettmuskeln: An der Oberfläche der Muskelzellen gibt es Satellitenzellen, auch myogene Zellen oder Myoblasten genannt, die nach einer Aktivierung über mehrere Zwischenstufen neue Muskeln bilden und verletzte Muskeln reparieren können. Um festzustellen, ob solche Reservezellen selbst Stammzellen sind oder enthalten, wurden Satellitenzellen aus den Skelettmuskeln normaler neugeborener Mäuse isoliert. Dabei stellte es sich heraus, daß sie aus drei verschiedenen Sorten bestehen. Hauptsächlich sind es sog. EP und LP myogene Zellen, die bereits weitgehend spezialisiert sind. Die dritte Sorte sind MDS-Zellen (*muscle derived stem cells,*, aus Muskeln isolierte Stammzellen). Sie sind sehr selten, nur eine unter 100.000 Satellitenzellen ist eine solche MDS-Zelle. Diese Zellen sind aber *pluripotent*, d.h., sie können sich sowohl zu Muskelzellen als auch zu Zellen der Nerven und Blutgefäße entwickeln, die für neue Muskeln notwendig sind. Und sie können über lange Zeit immer weiter vermehrt werden.

Diese MDS-Zellen wurden im Laboratorium stark vermehrt, geklont, und dann etwa 400.000 von ihnen in 25 Mikroliter (einem Vierzigstel Kubikzentimeter) Flüssigkeit in einer einzigen Injektion in einen Muskel lebender mdx-Mäuse injiziert. Um zu sehen, inwieweit sich diese Zellen von den normalen myogenen Zellen unterscheiden, wurden auch die mehr spezialisierten EP-Zellen in mdx-Mäuse unter gleichen Bedingungen injiziert.

In den mit EP-Zellen behandelten Mäusen konnte nach 30 Tagen in ca. 130 Muskelzellen an der Injektionsstelle neues Dystrophin gefunden werden, das nach 90 Tagen aber weitgehend wieder verschwunden war. Bei diesen Mäusen wurden Abstoßungsreaktionen durch Lymphozyten beobachtet, die wahrscheinlich auch für das langsame Verschwinden des neuen Dystrophins verantwortlich waren.

Im Gegensatz dazu bildeten ca. 1.500 Muskelzellen der mit MDS-Zellen behandelten Mäuse neues Dystrophin an der Injektionsstelle, also mehr als 10mal soviel als nach der Injektion von EP-Zellen. Auch nach 90 Tagen war in praktisch allen diesen Zellen das neue Dystrophin noch unverändert vorhanden. Hier gab es also *keine* Abstoßungsreaktionen, obgleich die Empfängermäuse keine immununterdrückenden Medikamente erhalten hatten.

Da die hier verwendeten Muskelstammzellen aus *neugeborenen* normalen Mäusen isoliert wurden, ist diese Technik wahrscheinlich nicht ohne Modifikation bei Duchenne-Kindern anwendbar. Sie könnte aber die wiederaufgenommenen Versuche mit Myoblasten beeinflussen (*Huard*, Pittsburgh, *Wernig*, Bonn)..

Stammzellen aus Knochenmark, Muskeln und Haut: Ende der 90er Jahre wurden die ersten Versuche mit Stammzellen aus Knochenmark und Muskel-Satellitenzellen durchgeführt. Bei allen Versuchen wurden die isolierten Stammzellen aus normalen männlichen Mäusen mit normalen Dystrophin-Genen erhalten und in die Schwanzvene weiblicher mdx-Mäusen gespritzt. Die weiblichen Mäuse waren homozygot, d.h., die Dystrophin-Gene ihrer *beiden* X-Chromosomen waren mutiert, so daß sie kein eigenes Dystrophin erzeugen konnten. Der Verbleib der injizierten Zellen in den weiblichen Mäusen konnte durch den Nachweis der „männlichen“ Y-Chromosomen verfolgt werden. Die weiblichen Mäuse waren zuvor mit Röntgenstrahlen bestrahlt worden, um eine Immunreaktion zu vermeiden. Durch die Übertragung der Stammzellen wurde das Knochenmark wiederhergestellt.

Zunächst wurden 10 bis 50 Millionen Zellen des unbehandelten Knochenmarks injiziert. Nach drei Monaten konnte in den Mäusen in bis zu 10 % der Muskelzellen Dystrophin nachgewiesen werden. Zum Teil enthielten diese Dystrophin-positiven Zellen auch Y-Chromosomen, d.h., die Knochenmarkzellen, die über die Blutbahn kamen, stammten von den normalen männlichen Mäusen, die mit den Muskelzellen der mdx-Mäuse verschmolzen waren. Sie hatten die Information für das normale Dystrophin mitgebracht, die zur Produktion von funktionsfähigem Dystrophin genutzt wurde. Es war wichtig zu beweisen, daß das neue Dystrophin nicht durch Reversion entstanden war, also durch spontanes Exon-Skipping, das in geringem Maße bei mdx-Mäusen und

auch bei Duchenne-Kindern vorkommt.

Um herauszufinden, welcher Anteil der Knochenmarkzellen die Stammzelleigenschaften besitzt, wurden von dem Zellgemisch mit der FACS-Methode (*Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung*) eine kleine Seitenpopulation (SP) abgetrennt, die Stammzelleigenschaften hatte und für die weiteren Versuche verwendet wurde. Nach der Injektion von nur 2.000 bis 5.000 dieser SP-Knochenmarkzellen hatten nach 3 Monaten bis zu 4 % der Muskelzellen der mdx-Mäuse funktionsfähiges Dystrophin. Auf ähnliche Weise wurden auch aus den Muskel-Satellitenzellen SP-Muskelstammzellen gewonnen und 7.000 bis 20.000 von ihnen in die Blutzirkulation der weiblichen mdx-Mäuse gespritzt. Nach einem Monat enthielten zwischen 5 % und 9 % der Muskelzellen normales Dystrophin und auch Y-Chromosomen.

Jetzt, 2002/2003, wurden diese Versuche wiederholt und auf Stammzellen ausgedehnt, die aus Haut gewonnen wurden. Die Vorteile einer Gewinnung aus Haut sind: dieses Gewebe ist leichter zugänglich als Muskelgewebe und die Empfängertiere müssen nicht mehr bestrahlt werden.

Auch aus den Hautzellen wurde mit der FACS-Technik eine kleine Seitenpopulation (SP) mit den gleichen Oberflächeneigenschaften, Markern, isoliert, die auch die SP-Muskelstammzellen aufweisen. Die SP-Anteile betrugen jetzt bei den Knochenmarkzellen 0,1 %, bei den Muskelzellen 0,7 % und bei den Hautzellen 1,2 %. Nach drei Monaten enthielten bis zu 2,3 % der Muskelzellen der weiblichen Mäuse neues Dystrophin und auch Y-Chromosomen nach Injektion von 6.000 bis 50.000 der SP-Hautzellen.

Dieses Experiment hat bewiesen, daß aus Haut Stammzellen isoliert werden können, die systemisch gegeben, also über die Blutbahn, in alle Muskeln wandern und dort neue Muskelzellen mit normalem Dystrophin bilden können. Die Technik ist noch nicht genügend effektiv, um von klinischer Bedeutung zu sein. Es ist aber denkbar, daß nach einer Optimierung eine Duchenne-Therapie darauf aufgebaut werden kann (*Kunkel*, Boston).

Aktivierung von Muskelstammzellen: Stammzellen mit bestimmten Oberflächenstrukturen, die sich in *intakten* Muskeln befinden, entwickeln sich nicht zu neuen Muskelzellen, sie sind *nicht myogen*. Wenn die Muskeln aber verletzt wurden und die Muskelzellen sich regenerierten, dann erhöhte sich die Zahl der Muskelstammzellen bis auf das Zehnfache. Diese Zellen waren jetzt *myogen*, sie entwickelten sich zu Myoblasten und neuen Muskelzellen, wie Versuche mit Zellkulturen und Mäusen zeigten. Ausgelöst wurde diese Aktivierung durch Wnt-Proteine, einer Familie von Signalproteinen, die offenbar von den verletzten Muskelzellen produziert werden und die auch bei der Embryonalentwicklung eine Rolle spielen (*Rudnicki*, Ottawa).

Einige der Wnt-Proteine wurden inzwischen isoliert und charakterisiert, sie sind etwa 400 Aminosäuren lang und enthalten Palmitinsäure, eine Fettsäure, die für die Weiterleitung der molekularen Signale wichtig zu sein scheint (*Nusse*, Stanford),

Mesoangioblasten, Stammzellen aus Blutgefäßen: Eine halbe Million dieser neu entdeckten Stammzellen aus den Blutgefäßen fötaler normaler Mäuse wurden in einer einzigen Injektion in die Arterie eines Hinterbeins von Mäusen gespritzt, denen ein Protein des Dystrophin-Komplexes, das alpha-Sarkoglykan fehlte, was beim Menschen zu einer der vielen Gliedergürtelmuskeldystrophien führt. Die injizierten Zellen wanderten in die Blutkapillaren, durch die Zellwände der Kapillaren hindurch und von dort in alle Muskeln des injizierten Beines und zwar besonders deutlich in sich regenerierende Fasern.

Neues Sarkoglykan konnte mindestens drei Monate lang in fast normalen Mengen nachgewiesen werden und auch viele der vorher fehlenden anderen Proteine der Dystrophin-Komplexe waren wieder vorhanden, und es gab *keine* Immun-Abstoßungsreaktionen. Nach dreimaliger Injektion im Abstand von jeweils 40 Tagen war nicht nur der Gendefekt fast vollständig korrigiert, sondern auch die Muskelkraft im behandelten Bein hatte sich praktisch normalisiert, und es gab auch hier keine Immunprobleme.

Um zu prüfen, ob sich diese Technik für eine Gentherapie eignen würde, wurden die Mesoangioblasten aus den „kranken“ Mäusen isoliert und diesen defekten Stammzellen mit Retroviren das fehlende alpha-Sarkoglykan-Gen eingefügt. Die Versuche mit diesen ex-vivo-therapierten Zellen führten zu den gleichen positiven Ergebnissen wie mit den normalen Zellen. Retroviren, die sich mit den mitgebrachten therapeutischen Genen permanent in die Chromosomen einbauen, sollten jedoch wegen des Krebsrisikos beim Menschen nicht verwendet werden.

Bisher sind diese Blutgefäß-Stammzellen aus ungeborenen Mäusen isoliert worden. Falls es

aber möglich sein sollte, diese Zellen auch aus Kindern mit Duchenne-Muskeldystrophie zu isolieren, könnten diese unerwartet positiven Ergebnisse bedeuten, daß eine Reihe von Problemen der bisher versuchten Gen-Übertragungen vermieden werden könnte: z.B. geringe Wirksamkeit, Immunabstoßung und die Notwendigkeit vieler Injektionen in alle erreichbare Muskeln.

In diese körpereigenen Zellen müßte man ex-vivo, also außerhalb des Körpers, intakte Dystrophin-Gene mit den bekannten Vektoren übertragen, sie im Labor vermehren und dann wieder in die wichtigsten Arterien des Kindes injizieren. Unter Umständen müßte die Behandlung in Abständen von mehreren Monaten wiederholt werden, deswegen ist es wichtig, daß die injizierten Zellen nicht vom Immunsystem abgestoßen werden. Und einer der größten Vorteile ist, daß mit dieser Technik alle Muskeln erreicht würden, auch die Herz- und Atemmuskeln. Es wäre eine *systemische Behandlung* mit gegenüber den anderen Gentherapieansätzen relativ wenigen Injektionen (*Cossu*, Mailand).

Ein „Stammzell-Experiment der Natur“: Im Alter von einem Jahr hatte ein Duchenne-Patient wegen einer anderen Krankheit eine Knochenmarktransplantation von seinem Vater bekommen. Da er trotz einer Leseraster-verschiebenden Deletion des Exons 45 mit 14 Jahren noch gehen konnte, wurde vermutet, daß Stammzellen die Information für neues Dystrophin mitgebracht hatten. Untersuchungen nach einer erneuten Biopsie haben jetzt aber gezeigt, daß die milderen Symptome der Krankheit nur zu einem geringen Ausmaß auf die Transplantation zurückzuführen sind, hauptsächlich aber auf eine spontane zusätzliche Deletion des Exons 44, so daß in der mRNA auf Exon 43 direkt Exon 46 folgt. Dieses Exon-Skipping normalisiert das Leseraster, Dystrophin kann wieder gebildet werden, ist aber kürzer und verursacht Symptome einer Becker-Dystrophie (siehe Abschnitt über Exon Skipping.) Offenbar kann aber eine Knochenmarktransplantation zu einer Duchenne-Therapie auch nach 13 Jahren beitragen, allerdings nicht genügend, um den Verlauf der Krankheit signifikant zu ändern (*Kunkel*, Boston).

Zelltherapie mit Myoblasten: Die Muskeln haben ihre eigenen Stammzellen, die Satellitenzellen oder Myoblasten, die sich bei der Entwicklung oder der Reparatur von Muskeln durch Zusammenlagern zuerst in Myotuben und dann in lange Muskelfasern verwandeln können. Anstelle von Myoblasten wird jetzt oft *myogene Zellen*, d.h. muskelbildende Zellen, gesagt. Dies geschieht auch, um die neuen Versuche mit dieser Technik von den alten und z.T. mißbrauchten Versuchen abzugrenzen.

In den Jahren 1990 und 1991 wurden umfangreiche klinische Versuche an Duchenne-Kindern mit Myoblasten durchgeführt. Dieser Myoblastentransfer hatte positive Ergebnisse bei mdx-Mäusen gezeigt. Die dabei verwendeten Zellen enthielten das normale Dystrophin-Gen, weil sie von einem muskelgesunden Spender stammten, meistens vom Vater des Patienten. Sie wurden in einige Muskeln von Duchenne-Jungen an vielen Stellen in 0,5-cm-Abständen injiziert in der Erwartung, daß Muskelzellen mit normalem Dystrophin entstehen würden. Diese Versuche waren aber *nicht* erfolgreich, weil die übertragenen Zellen kaum innerhalb des Muskels wanderten, weil es Immunprobleme gab und weil fast alle der eingespritzten myogenen Zellen nach kurzer Zeit abgestorben waren (*Karpati*, Montreal, und andere).

Neue Versuche zur Transplantation von Myoblasten: Über diese Technik wird aber weiter gearbeitet, um herauszufinden, warum weniger als 1 % der transplantierten Myoblasten in den dystrophischen Muskelzellen überleben. Man versucht jetzt, diese seltenen aktiven Zellen genau zu charakterisieren und herauszufinden, wie man sie von den inaktiven Zellen abtrennen kann. Deswegen sucht man nach molekularen Signalen, speziellen Substanzen in den Muskelzellen, die die Myoblasten aktivieren können (*Partridge*, London).

Da in den früheren Versuchen nur zwei bekannte Medikamente, Cyclosporin A und Cyclophosphamid, zur Unterdrückung der Immunreaktionen bei Duchenne-Patienten verwendet wurden, sind inzwischen andere Substanzen in Versuchen an Affen untersucht worden. Dabei stellte sich heraus, daß der Immunhemmstoff FK506 allein oder in Kombination mit dem Hemmstoff MMF wesentlich besser die Abstoßungsprobleme über mehrere Monate vermeidet. Eine größere Injektionsdichte, jetzt in 1-mm-Abständen, und eine höhere Zahl der transplantierten Zellen trugen auch dazu bei, daß in den Versuchen mit Affen bis zu 67 % der Muskelzellen die Myoblasten aufgenommen hatten, sie wurden dann zu *hybriden* Muskelzellen.

Eine klinische Studie der modifizierten Technik mit Duchenne-Patienten ist in Kanada begonnen worden (siehe Abschnitt „Klinische Studien“) (*Tremblay*, Québec City). Auch in anderen Laboratorien wird an der Verbesserung dieser Zelltherapie-Technik gearbeitet. Z.B. wurde gefunden, daß m144, ein Protein des Immunsystems, das sofortige Absterben der Myoblasten nach der Injektion in die Mausmuskeln vermeidet (*Hodgetts*, Crawley, Australien).

Versuche zur ex-vivo-Gentherapie: Um Immunprobleme möglicherweise vollständig zu vermeiden, wird auch daran gearbeitet, Myoblasten des Patienten selbst zu isolieren und in Zellkultur mit einem intakten Dystrophin-Gen zu versehen, bevor sie wieder zurückinjiziert werden. In vorbereitenden Experimenten wurde eine *Elektroperforationstechnik* angewendet, um in die Myoblasten in Zellkultur ein Gen für ein fluoreszierendes Markierungsprotein einzuschleusen. Dabei wurde die Zellmembran durch einen einzigen Stromstoß unter z.B. 400 V über eine Distanz von 4 mm kurzzeitig durchlässig gemacht. Unter optimalen Bedingungen konnten in bis zu 70 % der Zellen das Markierungsgen eingeschleust werden, das dann auch das fluoreszierende Protein produzierte. Die Zellen behielten ihre Fähigkeit, zu Myotuben zu verschmelzen, dem nächsten Entwicklungsstadium der Muskelzellen (*Bernheim*, Genf).

Änderung der genetischen Information (Gen-Reparatur)

Mutationen des Dystrophin-Gens auf dem X-Chromosom werden mit Oligonukleotiden repariert. Ganze Exons werden übersprungen – Exon-Skipping – , um das Leseraster wiederherzustellen. Vorzeitige Stoppcodons können möglicherweise ignoriert werden.

Es werden auch Experimente durchgeführt mit dem Ziel, nicht eine neue funktionsfähige Dystrophin-Gensequenz auf Muskelzellen zu übertragen, sondern den Fehler in der genetischen Information zu *reparieren*. Eine solche Technik hätte vier wichtige Vorteile: (1) Die Risiken eines Gentransfers durch Viren würden vermieden, (2) nicht nur das Dystrophin der Skelettmuskeln, sondern alle anderen Formen des Dystrophins würden ebenfalls repariert, (3) die gewebespezifische Regulation der Dystrophin-Synthese würde beibehalten, und (4) die Herstellung der therapeutischen Medikamente, *Oligonukleotide*, wäre viel einfacher und billiger als die Produktion von Virus- oder Plasmid-Vektoren mit dem zu transportierenden genetischen Material.

Oligonukleotide sind kurze spezifische DNA- oder RNA-Sequenzen, die aus wenigen Basen bestehen, die über die Ribose- oder Desoxyribose-Phospat-Brücken der Nukleinsäurestränge miteinander verbunden sind. Sie können automatisch hergestellt werden.

Drei Arten von Reparaturstrategien werden bereits angewendet: (1) Reparatur der Mutation am Gen selbst, (2) Änderung der genetischen Information während des Spleißens der pre-mRNA zur RNA durch Überspringen von Exons, und (3) Nichtbeachtung eines vorzeitigen Stoppcodons.

Reparatur des Gens beim GRMD-Hund: Es wird bereits versucht, eine Punktmutation auf dem Gen selbst zu reparieren, indem kurze *chimäre* doppelsträngige *Oligonukleotide* verwendet werden, die RNA auf einem Strang und DNA auf dem anderen enthalten. Der DNA-Strang des Oligonukleotids ist zu der richtigen Gensequenz an der Stelle der Punktmutation vollständig komplementär, während der RNA-Strang komplementär zur mutierten Sequenz ist. Dies führt zu gepaarten Quadruplexstrukturen, Vierfachsträngen, die in der Lage sind, solche kleinen Mutationen zu korrigieren, indem sie den biologischen DNA-Reparaturmechanismus der Zelle aktivieren.

Mit dieser Technik wurde ein DNA-RNA-Oligonukleotid, das komplementär zur mutierten Spleißstelle im Dystrophin-Gen der dystrophen GRMD-Hunde war, in einen 6 Wochen alten betroffenen Hund gespritzt. Der behandelte Muskel zeigte, (1) daß das Exon, das wegen der Mutation fehlte, wiederhergestellt war, (2) daß die Proteinregion, die vom fehlenden Exon kodiert wurde, innerhalb des ganzen Dystrophins wieder vorhanden und dieses korrekt unter der Muskelzellmembran angebracht war, und am wichtigsten (3), daß das Gen auf dem X-Chromosom tatsächlich korrigiert war. Die Reparatur der Mutation blieb in dem Hund fast ein ganzes Jahr lang erhalten (*Bartlett*, Bethesda).

Genreparatur bei der mdx-Maus: In einem ähnlichen Experiment wurde die Punktmutation

im Exon 23 der Myoblasten von mdx-Mäusen in-vitro repariert, und diese Myoblasten verschmolzen dann zu Myotuben, die Dystrophin von normaler Länge produzierten. Zwei Wochen nach einer einzigen Injektion der Oligonukleotide in die Muskeln von mdx-Mäusen, enthielten bis zu 2 % der Fasern an der Injektionsstelle neues Dystrophin, das kein rückmutiertes Dystrophin war. Diese Menge Dystrophin blieb mindestens 10 Wochen lang stabil (*Rando*, Stanford).

Überspringen von Exons (Exon-Skipping): Mit dieser Technik versucht man, eine Duchenne-Mutation in eine Becker-Mutation zu verwandeln. Dies erreicht man, indem man den Spleißmechanismus, der die Introns aus der pre-mRNA herausschneidet, veranlaßt, auch ein zusätzliches Exon vor oder hinter der Mutationsstelle zu eliminieren, nachdem eine Punktmutation oder eine Deletion das Leseraster verschoben und ein vorzeitiges Stoppcodon verursacht hatte. Das Ziel ist, das durch die Mutation gestörte Leseraster wiederherzustellen.

Das Gen selbst mit seiner Mutation wird dabei nicht verändert, aber die Boten-RNA, mRNA, enthält nicht mehr die Information des übersprungenen Exons. Da die mRNA kürzer als normal ist, ist das Dystrophin-Protein auch kürzer, es enthält weniger Aminosäuren. Wenn die fehlenden Aminosäuren zur zentralen stabförmigen Region des Dystrophins gehörten, sind sie oft entbehrlich, und das kürzere Protein kann immer noch seine Aufgabe zur Stabilisierung der Muskelzellmembran erfüllen. Das Ergebnis wäre eine Änderung der schweren Duchenne-Symptome in die milderen Symptome der Becker-Muskeldystrophie.

Eliminierung der Mutation der mdx-Maus: Diese Strategie wurde angewendet, um den Austausch eines einzelnen Nukleotids, die Punktmutation im Exon 23 der mdx-Maus zu umgehen. Ein *Antisense*-Oligoribonukleotid, bestehend aus 20 Ribonukleotid-Einheiten, die komplementär, *"gegensinnig",* zur RNA-Sequenz der pre-mRNA an einer der Grenze des Exons 23 zum Intron 23 war, verursachte die Nichtbeachtung des Exons mit der Mutation durch den Spleißprozeß. Die genetische Information des Exons 23, die für 71 Aminosäuren in der Stabregion kodiert, wurde daher vom Leseprozeß übersprungen.

Dieses und ähnliche Antisense-Oligoribonukleotide wurden noch chemisch modifiziert, z.B. durch den Schutz der normalerweise freien und empfindlichen OH-Gruppen der Ribose-Zuckereinheiten der RNA durch Methylgruppen ($-CH_3$).

Etwa 5 Mikrogramm (Millionstel Gramm) dieser stabilisierten potentiellen „Gen-Medikamente" wurden dann zusammen mit dem Detergenz F127 in die Beinmuskeln von lebenden mdx-Mäusen gespritzt. Nach 2 bis 4 Wochen hatten bis zu 20 % der Muskelfasern fast die normale Menge an etwas verkürztem Dystrophin. Zusammen mit anderen Komponenten des Dystrophin-Komplexes hatte es sich korrekt an der Muskelzellmembran angeordnet. Die Muskelkraft hatte sich zwar nicht normalisiert, aber deutlich verbessert. Eine wiederholte Behandlung erhöhte die Zahl der Dystrophin-positiven Muskelfasern ohne Entwicklung von Immunabstoßungsreaktionen. (*Wilton*, Perth; *Partridge*, London).

Exon-Skipping in der mRNA des menschlichen Dystrophins: Exon 45 des Dystrophin-Gens ist das am häufigsten deletierte einzelne Exon in Jungen mit Duchenne-Dystrophie. Dies verursacht eine Verschiebung des Leserasters in der mRNA und ein vorzeitiges Stoppcodon, das zu einem abgebrochenen und nicht funktionsfähigem Dystrophin führt und deshalb in der Muskelzelle abgebaut wird. Wenn jedoch die beiden Exons 45 und 46 *gleichzeitig* fehlen, wird das Leseraster nicht gestört, nicht verschoben, es entsteht ein kürzer als normales Dystrophin, dem 108 nicht notwendige Aminosäuren des mittleren Teils des Proteins fehlen. Patienten mit dieser spezifischen Deletion haben die milderen Symptome der Becker-Muskeldystrophie.

Zunächst wurden in-vitro-Experimente zur gezielten Entfernung von Exon 46 aus der Dystrophin-pre-mRNA in Myotuben von *normalen* Mäusen mit Erfolg durchgeführt, indem vier verschiedene Antisense-Oligoribonukleotide verwendet wurden, die komplementär zu einer Spleißregulatorsequenz *innerhalb* von Exon 46 waren. Mit diesen Oligonukleotiden wurde eine ERS- (exon recognition sequence) oder ESE- (exonic splice enhancer) -Sequenzen blockiert, die für das Zusammensetzen der Exons in der mRNA, das Spleißen, notwendig sind.

Danach wurden ähnliche in-vitro-Experimente mit mehreren Antisense-Oligonukleotiden unternommen, die komplementär zur entsprechenden Spleißstellen im *menschlichen* Exon 46 waren. Mit einem von ihnen, das aus 19 Basen bestand, war es möglich, das Exon 46 aus mindestens 15 % der Dystrophin-pre-mRNAs in Myotuben zu entfernen, die von zwei Duchenne-Patienten stammten, welche eine Deletion des Exons 45 hatten. (Auf der letzten Seite diese Berichtes sind die molekularen Einzelheiten dieses Experimentes beschrieben).

Dieser Prozentsatz verkürzter mRNA ohne Exons 45 und 46 führte zu praktisch normalen Mengen verkürzten Dystrophins in mindestens 75 % der Myotuben. Nach 16 Stunden war das neue Dystrophin in den Zellen nachzuweisen, war nach 48 Stunden zur Zellmembran gewandert und blieb dort mindestens eine Woche lang erhalten. Das Wiedererscheinen des Dystrophins führte auch zur Wiederherstellung des Dystrophin-Komplexes in und unter den Muskelzellmembranen. Inzwischen konnten an in-vitro-Präparaten von sechs weiteren Duchenne-Patienten das Leseraster nach anderen Deletionen und auch nach einer Punktmutation korrigiert werden.

Diese Technik ist sehr spezifisch, denn sie verursacht nur die Entfernung des einen Exons. Mit der gleichen Technik konnten inzwischen weitere 18 andere Exons in Muskelzellkulturen übersprungen werden. *Diese sehr aussichtsreiche Strategie, die bereits in Zellkulturen funktioniert, könnte möglicherweise später die Duchenne-Mutationen von bis zu 65 % der Patienten mit Deletionen in Becker-Mutationen abändern.*

Zur Zeit werden verschiedene Methoden für die Übertragung der *Antisense*-Oligoribonukleotide in den lebenden Organismus untersucht. Dazu dienen Experimente mit lebenden Mäusen, die anstelle ihres eigenen Dystrophin-Gens das Gen des Menschen in ihren Muskeln haben und bei denen dieses Gen noch durch „menschliche“ Deletionen verändert wurde. Erst wenn solche in-vivo-Tierexperimente erfolgreich verlaufen, kann an eine klinische Prüfung dieser Methoden in Duchenne-Jungen gedacht werden.

Es ist jetzt schon möglich, aus der in allen Einzelheiten bekannten Dystrophin-Genstruktur vorauszusagen, welche Exons übersprungen werden müssen, um das Leseraster nach einer definierten Deletion oder Punktmutation wiederherzustellen. Solche Überlegungen sind aber zur Zeit noch rein theoretisch. Es ist nicht sicher, ob die in Zellkultur oder in Mäusen erhaltenen Ergebnisse sich auf Duchenne-Jungen übertragen lassen, und es ist auch nicht sicher, ob das wiederhergestellte verkürzte Dystrophin im Einzelfall tatsächlich zu den Symptomen einer Becker-Muskeldystrophie führen wird (*van Ommen*, *van Deutekom*, Leiden).

Spleißstellen sind spezifische RNA-Sequenzen an den Grenzen von Exons und Introns, die für die korrekte Entfernung der nichtkodierenden Intronsequenzen aus der pre-mRNA verantwortlich sind. Diese *pre-messenger-RNA*, ist das erste Produkt eines aktiven Gens. Nach der Entfernung der Intronsequenzen durch Spleißen wird daraus die Boten-RNA, messenger-RNA oder mRNA, die zu den Ribosomen wandert, um dort als Informationsträger für die Proteinsynthese zu wirken. Myogene Zellen

Exon Skipping mit intern erzeugten Oligonukleotiden: Bei einer neuen Methode zum Überspringen von Exons müssen die Antisense-Oligoribonukleotide nicht injiziert werden, sondern sie werden direkt in den Zellkernen, wo sie gebraucht werden, nach Übertragung ihres Gens synthetisiert. Das Herausschneiden der Intron-Sequenzen aus der pre-mRNA geschieht im Zellkern durch *Spliceosomen*, das sind komplexe Strukturen, die aus mehreren Proteinen und kleinen RNAs der Zellkerne (*small nuclear* = snRNAs), bestehen, welche die Exon-Intron-Grenzen erkennen und die Exons nach dem Spleißen präzise und ohne Leserasterverschiebung zusammensetzen.

Zu diesen sehr kurzen RNAs gehören die U7-snRNAs. Sie binden über spezielle Erkennungssequenzen an Spleißstellen in der pre-mRNA, blockieren so das Spleißen bestimmter Exons und sorgen dafür, daß von einem Gen mehrere Proteine verschiedener Länge erzeugt werden. U7-snRNAs regulieren normalerweise das Spleißen der mRNA der Histone. Histone sind Proteine, die für die Verpackung der DNA in die Chromosomen notwendig sind.

Bei dieser Methode wurden U7-snRNAs gentechnisch so verändert, daß sie nicht mehr an Histon-mRNAs banden, sondern gezielt an Spleißstellen in der Umgebung des Exons 23 der

Dystrophin-pre-mRNA der Maus. Dazu wurde ein für die veränderte U7-snRNA kodierendes Gen zusammen mit einem Creatinkinase-Enhancer (Aktivator) in Plasmide als Vektoren verpackt und in einem Laborexperiment in isolierte Myoblasten der Maus transferiert. Diese Zellen entwickelten sich dann in der Kulturschale zu Muskelzellen weiter.

In den Kernen der transgenen Myoblasten produzierten die übertragenen Gene die modifizierten U7-snRNAs. Sie hatten neuen Erkennungssequenzen und banden sich, wie geplant, jetzt vor und hinter dem Exon 23 der Dystrophin-pre-mRNA an Stellen, die für das Spleißen wichtig sind. Dadurch wurden diese Spleißstellen blockiert, und Exon 23 wurde während des Spleißens zusammen mit den Introns der pre-mRNA herausgeschnitten („Exon-Skipping"). Da die Punktmutation der mdx-Mäuse in Exon 23 lokalisiert ist, wurde durch die Entfernung dieses Exons erreicht, daß die mdx-Muskelzellen, die vorher kein normales Dystrophin bilden konnten, jetzt ein leicht verkürztes Dystrophin-Protein produzierten, das den Muskelzellen an der richtigen Stelle unter der Zellmembran lokalisiert war.

Der Zweck dieses grundlegenden gentechnischen in-vitro-Experimentes, also außerhalb der lebenden Maus, war es zu beweisen, daß die Muskelzellen die therapeutisch wirkenden Antisense-Oligoribonukleotide auch selbst herstellen können.

Für eine Anwendung am Menschen müßten jeweils auf die spezielle Mutation des Patienten angepaßte U7-snRNAs verwendet werden, deren Gene mit einem geeigneten gentherapeutischen Vektor in die Zellkerne der Muskelfasern zu transportieren wären. Eine Alternative wäre ein ex-vivo-Transfer, bei dem die U7-snRNA-Gene in Satellitenzellen oder andere Muskel-Stammzellen außerhalb des Körpers transferiert und dann über die Blutbahn appliziert oder direkt in den Muskel injiziert werden. Da die U7-snRNA-Gene sehr kurz sind, wäre dies wahrscheinlich einfacher als ein Transfer der vollständigen oder verkürzten Dystrophin-cDNA der mit den anderen gentechnischen Methoden angestrebt wird (*Weis*, Bern; *Lochmüller*, München).

Homologe Rekombination: Die Punktmutation im Dystrophin-Gen von mdx-Mäusen konnte in 15 bis 20% von isolierten Myoblasten korrigiert werden, indem ein DNA-Stück aus 603 Basen zugegeben wurde, dessen Sequenz der normalen Sequenz vor und hinter der Mutationsstelle im Exon 23 der Mäuse entsprach, deren C-nach-T-Mutation aber nicht enthielt. Dabei wurde ein Teil des neuen Gensegmentes gegen das entsprechende, das homologe, Segment im Exon 23 ausgetauscht. Diese Technik der Rekombination mit kurzen homologen Fragmenten (englisch SFHR) konnte auch auf isolierte Myoblasten, angewendet werden, die von einem Duchenne-Patienten mit Deletion 13 stammten (*Kapsa*, Melbourne).

Nichtbeachtung eines vorzeitigen Stoppcodons durch Antibiotika: Etwa 5 % der Duchenne-Jungen haben eine Punktmutation ihres Dystrophin-Gens, die ein Aminosäure-Codewort in eines der drei Stoppcodons, TGA, TAG und TAA, geändert hat, wodurch die Synthese des Dystrophins vorzeitig beendet wird.

Gentamycin ist ein Antibiotikum, das den RNA-Übersetzungsmechanismus in den Ribosomen veranlaßt, solch ein vorzeitiges Stopcodon zu ignorieren, d.h., durch es *hindurchzulesen*. Die normalen Stoppcodons, die durch eine spezielle dreidimensionale Struktur geschützt sind, werden aber weiterhin beachtet. In mdx-Mäusen ist neues funktionsfähiges Dystrophin in bis zu 20 % der normalen Menge auf diese Weise erhalten worden. Der Vorteil von Gentamycin ist, daß es ein gut bekanntes und zugelassenes Medikament ist, dessen Anwendung zur Therapie der Muskeldystrophie keine langen Genehmigungsverfahren benötigen würde (*Sweeney*, Philadelphia).

Zwei weitere Studien an mdx-Mäusen, mit denen diese positiven Ergebnisse bestätigt werden sollten, ergaben allerdings, daß unter ähnlichen Bedingungen nach Behandlung mit Gentamycin kein neues Dystrophin nachgewiesen werden konnte (*Karpati*, Montreal, *Lochmüller*, München).

Zwei klinische Studien mit Gentamycin sind mit Duchenne-Jungen durchgeführt worden, haben aber ebenfalls nicht zu neuem Dystrophin geführt. Möglicherweise war die Versuchsdauer von 14 Tagen zu kurz, deswegen wird jetzt eine länger dauernde klinische Studie mit 36 Patienten durchgeführt (*Mendell*; Columbus).

Ersatz von Dystrophin.

Utrophin ist ein Muskelprotein, das in kleinen Mengen auch in Duchenne Patienten vorkommt. In größeren Mengen könnte es die Funktion von Dystrophin übernehmen.

Aktivierung des Utrophin-Gens: Utrophin ist ein Protein mit einer Struktur und Funktion, die dem Dystrophin sehr ähnlich sind. Beim Menschen liegt sein Gen auf Chromosom 6, es hat 75 Exons und ist etwa eine Million Basenpaare lang. Das Protein ist um 7 % kürzer als Dystrophin und kommt in vielen Körpergeweben vor, auch in Muskeln, aber es ist dort an den Stellen der Muskelzellen konzentriert, an denen die motorischen Nerven die Zellmembranen berühren. Vor der Geburt ist die Utrophin-Konzentration im Muskel deutlich höher als danach. Selbst wenn Utrophin nur in kleinen Mengen vorhanden ist, macht es die Duchenne-Symptome weniger schwer als sie es wären, wenn es ebenfalls fehlte. Mdx-Mäuse, deren Utrophin-Gen experimentell inaktiviert, *knokked out*, wurde, die weder Dystrophin noch Utrophin haben, zeigen Duchenne-ähnliche Symptome und sterben früh im Gegensatz zu „normalen“ mdx-Mäusen, deren Muskeln kaum degenerieren.

Experimente mit mdx-Mäusen haben gezeigt, daß Utrophin, wenn es in genügender Menge vorhanden ist, Dystrophin ersetzen kann. Die verwendeten Mäuse waren *transgene* Mäuse, denen Utrophin-mini-Gene in die Chromosomen der Keimbahn eingeführt wurden, eine Technik, die beim Menschen nicht angewendet werden kann. Andere transgene mdx-Mäuse wurden gezüchtet, die Utrophin nur dann produzierten, wenn sie das Antibiotikum Tetracyclin in ihrem Trinkwasser bekamen. Die erhöhte Menge von Utrophin in mdx-Mäusen verhinderte die Ausbildung der Krankheitssymptome, und dieser Effekt war größer in neugeborenen als in 10 oder 30 Tage alten Mäusen.

Für eine mögliche Duchenne-Therapie wird eine andere Strategie verfolgt, nämlich die normal vorhandene geringe Menge des Utrophins durch *Hochregulieren* der Aktivität seines Gens zu vergrößern. Dazu braucht man eine aktivierende Substanz, die durchaus ein bereits bekanntes Medikament, eine andere chemische Substanz oder auch ein Naturstoff sein kann.

Die synthetische Chemie hat inzwischen Methoden entwickelt, mit denen Tausende von zum Teil bisher unbekannte Substanzen automatisch hergestellt werden können. Viele dieser Substanzen werden an Zellkulturen aus mdx-Mäusen ebenfalls automatisch im Laboratorium auf ihre Fähigkeit getestet, das Gen der Luziferase zu aktivieren, dem die beiden Promotoren des Utrophin-Gens vorgeschaltet sind. Das lichterzeugende Enzym Luziferase der Glühwürmchen ist einfacher zu messen als Utrophin. Jeder *Hit*, d.h., jede Substanz, die in diesen vorläufigen Tests eine zumindest geringe Aktivität zeigt, wird weiter chemisch modifiziert und dann alle diese ähnlichen Substanzen zuerst an Muskelzellkulturen und, wenn sie dort positiv reagieren, anschließend in lebenden mdx-Mäusen überprüft, ob sie das Utrophin-Gen tatsächlich hochregulieren können. Erst wenn eine oder mehrere überzeugend aktive Substanzen gefunden sind, würden in einigen Jahren klinische Studien mit Duchenne-Patienten beginnen können (*Davies*, Oxford).

Ein solcher Aktivator des Utrophin-Gens könnte, wenn es sich um ein kleines Molekül handelt, auch systemisch, durch die Blutbahn, anwendbar sein, von wo aus er alle Muskeln erreichen würde. Außerdem würde das Immunsystem zusätzliches Utrophin als eine körpereigene Substanz erkennen, weil es bereits in geringen Mengen auch bei Duchenne-Jungen vorkommt. Deswegen sollte es zu keiner Immunabstoßung kommen.

Eine Substanz, die das Utrophin-Gen hochreguliert, könnte das gleiche aber auch mit anderen Genen tun. Bevor ein solcher Aktivator in Kindern getestet wird, muß gewährleistet sein, daß die therapeutische Anwendung später nicht gefährliche Nebenwirkungen mit sich bringt.

Weitere Experimente zur Utrophin-Vermehrung: Die Übertragung eines verkürzten Utrophin-Gens mit Adenoviren in *dystrophische Hunde* führte zu Utrophin, das die Funktion des fehlenden Dystrophins übernehmen konnte. --- *Glukokortikoide*, unter ihnen Prednison, können Utrophin hochregulieren. --- Solche Kortikoide sind auch aus *chinesischen Pflanzenmedizinen* isoliert worden, die traditionell gegen Muskeldystrophie verwendet werden. --- Leichte *Entzündungen* in den Muskeln von mdx-Mäusen führen zu einer deutlichen Hochregulierung des Utrophins auch außerhalb der Kontaktstellen mit den motorischen Nerven. --- Die Aminosäure *L-Arginin* kann die Menge des Utrophins in mdx-

Mäusen erhöhen und damit die dystrophischen Symptome deutlich vermindern. Arginin wird vom Enzym Stickoxid-Synthase zur Produktion des biologisch aktiven Gases Stickoxid gebraucht. Stickoxid greift auch in eine Reihe von anderen biochemischen Prozessen ein, deswegen wird Arginin nicht ohne weiteres für eine Duchenne-Therapie eingesetzt werden können. --- Das gleiche gilt auch für das kleine Protein *Heregulin*, mit dem die motorischen Nerven die Muskelentwicklung stimulieren und das die Symptome von mdx-Mäusen ebenfalls deutlich abmildern kann. --- Das nicht in Protein übersetzte Ende der mRNA des Utrophins wird von speziellen Strukturen an den Kontaktstellen der Nerven festgehalten. Wenn diese Verbindung durch ein Medikament gelöst werden könnte, würde sich Utrophin gleichmäßig auf die Muskelzellen verteilen und damit Dystrophin besser ersetzen können. --- Inzwischen wurde neben dem normalen A-Utrophin auch ein sehr ähnliches
B-Utrophin in Blutgefäßen identifiziert. Nur das A-Utrophin kommt in den Muskeln vor und kann nach einer Erhöhung seiner Konzentration das Fehlen von Dystrophin zum Teil kompensieren.

Andere Proteine.

Die Mutationen des Dystrophin-Gens und das Fehlen von Dystrophin beeinflussen auch die Aktivitäten von vielen anderen Genen

Aktivitäten von Tausenden von Muskelgenen: Um die Aktivitäten von sehr vielen Genen in einer Gewebeprobe gleichzeitig in einem einzigen Experiment zu messen, werden sog. *gene arrays* (Gen-Anordnungen) benutzt. Da die Sequenzen praktisch aller menschlicher Gene bekannt sind, können kurze Abschnitte von Tausenden von Genen automatisch hergestellt und durch einen Roboter in einem bestimmten Muster auf einem Quarz-Chip von einigen Quadratzentimeter Größe aufgebracht werden. Wenn man dann z.B. alle mRNA-Moleküle einer Gewebeprobe, die von den dort aktiven Genen erzeugt werden, biochemisch in die entsprechenden DNA-Sequenzen kopiert und diese als Analysenprobe auf den Gen-Chip gibt, entstehen dort Lichtpunkte, wo sich komplementäre DNA-Sequenzen befinden, die zu aktiven Genen gehören. Die Lichtintensität dieser Punkte wird automatisch registriert, und mit einem Computerprogramm kann dann festgestellt werden, welche Gene wie stark aktiv sind und welche nicht aktiviert sind.

Mit dieser Technik, die auch *Expressions-Profilierung* heißt, wurden mehrere Tausend Gene in Muskelproben untersucht, die von normalen und mdx-Mäusen stammten, von gesunden und Duchenne-Jungen, und auch von transgenen Mäusen, die weder eigenes Dystrophin noch Utrophin hatten, und auch von solchen die dafür aber das menschliche Dystrophin in ihren Muskeln bildeten.

Die Ergebnisse zeigten, daß das Fehlen des Dystrophins zur Erhöhung oder zur Erniedrigung der Aktivität von vielen Muskelgenen führt. Eine ganze Reihe von Genen, die für die Energieerzeugung in den Muskelzellen verantwortlich sind, waren weniger aktiv in den Mäusen ohne Dystrophin und Utrophin, d.h., ihre Muskeln hatten eine *Energiekrise*, die zur Degeneration ihrer dystrophischen Muskeln beitrug. Andererseits waren viele Gene, die für die Entwicklung und Reparatur von Muskeln notwendig sind, in ihrer Aktivität zum Teil über das Hundertfache erhöht, d.h., sie waren durch den Krankheitsprozeß *hochreguliert* worden. Ähnliche Ergebnisse wurden an menschlichen Muskelproben erhalten.

Weitere Experimente zeigten, daß in Mäusen viele andere Gene hochreguliert waren, Gene, die beteiligt sind an der Ausbildung von Oberflächenstrukturen, für die Synthese von Signalfaktoren der Proteinsynthese, für die Intensivierung von Immunreaktionen und für andere Prozesse, die für die Symptome der Muskeldystrophie der mdx-Mäuse verantwortlich sind. In Duchenne-Patienten waren diese Veränderungen weniger ausgeprägt, und in transgenen Mäusen mit menschlichem Dystrophin waren diese Genaktivitäten normal, sie hatten ja auch keine Muskeldystrophie mehr.

Nach diesen ersten Ergebnissen von vor einigen Jahren sind viele weitere Experimente mit dieser neuen Technik über andere Fragestellungen der Duchenne-Forschung erfolgt. Ihre und zukünftige Ergebnisse werden dazu beitragen, daß die komplexen Beziehungen zwischen den vielen Teilen der Muskelarchitektur verstanden werden

und ihre Änderungen, wenn eine ihrer wichtigsten Komponenten, das Dystrophin, nicht mehr vorhanden ist. Dies wird neue Wege zur Entwicklung einer Duchenne-Therapie öffnen (*van Ommen*, Leiden; *Kunkel*, Boston; *Hoffman*, Washington, und andere).

Ein dystrophischer Wurm: *Caenorhabditis elegans* ist ein 0,9 mm langer durchsichtiger Fadenwurm, mit dem Genforscher intensiv experimentieren, weil alle seine 19.733 Gene bekannt sind und alle seine 959 Körperzellen, von denen 95 Muskelzellen sind. Seine Muskeln haben ein Dystrophin, das dem menschlichen Dystrophin ähnlich ist, und das auch durch Mutationen so verändert wird, daß dystrophische Symptome entstehen. Einzelne Gene von Muskelproteinen wurden inaktiviert und auch aktiviert, so daß man die dystrophischen Symptome erkennen konnte, die vom Ausfall oder Vermehrung der entsprechenden Proteine verursacht wurden. Z.B. konnte gezeigt werden, daß das Hochregulieren von *Dystrobrevin*, einer sehr kurzen Form von Dystrophin, die Muskeldegeneration deutlich verlangsamte. Weitere Untersuchungen werden zur Aufklärung noch unbekannter molekularer Zusammenhänge bei der Entstehung der Muskeldystrophie beitragen (*Ségalat*, Lyon).

Integrine und Syntrophine: *Integrine* sind eine Familie von Proteinen, die in der Muskelzellmembran sitzen und für das Verschmelzen der Myoblasten zu Myotuben und der Entwicklung der Myotuben zu fertigen Muskelzellen notwendig sind. Sie sind auch an der Weiterleitung von Signalen von Zelle zu Zelle beteiligt.

In Mäusen ohne Dystrophin und Utrophin wurde durch Genübertragung die Menge eines dieser Integrine auf etwa das Doppelte erhöht. Dadurch verdreifachte sich die Lebenserwartung der Mäuse, und ihre dystrophischen Symptome verbesserten sich deutlich (*Kaufman*, Urbana).

Die fünf bekannten *Syntrophine* sind Proteine, die für die Weiterleitung von Signalen zu den Dystrophin- und Utrophin-Komplexen an den Muskelzellmembranen notwendig sind. Ein Verständnis ihrer Wirkung könnte Konsequenzen für eine Therapie mit Utrophin haben (*Froehner*, Seattle).

Pharmakologische Strategien.

Steroide und andere Medikamente können die klinischen Symptome der Duchenne-Muskeldystrophie mildern, ohne die Krankheit selbst zu heilen.

Solange die Bemühungen, ein funktionsfähiges Dystrophin-Gen zu übertragen oder das geschädigte Gen zu reparieren, noch nicht zu einer Heilung geführt haben, wird auch versucht, die Symptome der Duchenne-Muskeldystrophie durch eine medikamentöse Behandlung wenigstens zeitweise zu mildern. Auf diesem Weg waren in letzter Zeit Erfolge zu verzeichnen.

Myostatin: Seit 200 Jahren etwa gibt es die „blau-weißen“ belgischen Rinder, die etwa 20 % mehr Muskelfleisch haben als normale Tiere. Vor 6 Jahren wurde gefunden, daß diese Kühe eine 11 Basenpaare lange Deletion im Gen für das Protein *Myostatin* haben. Transgene Mäuse ohne ein Myostatin-Gen sind doppelt bis dreimal so schwer wie normale Mäuse, nicht weil sie mehr Muskelzellen haben, sondern weil ihre Muskelzellen besonders groß sind. Myostatin ist ein Signalprotein, eine Art Hormon, besteht aus 375 Aminosäuren und ist für die Begrenzung der Muskelmasse notwendig.

Dieses Protein wird in den Muskeln und seinen Vorläuferzellen erzeugt, danach wird das Protein umgebaut: zwei Drittel der Aminosäurekette wird abgetrennt, und zwei der jetzt nur 109 Aminosäuren langen Ketten lagern sich zu einem Doppelring zusammen. Dieses aktive Myostatin greift in das Wachstum der Muskelzellen bremsend ein, indem es die genetische Regulation der myogenen Vorläuferzellen negativ beeinflußt. Dabei spielen noch weitere Faktoren eine Rolle, die zusammen mit Myostatin die optimale Größe der Muskeln bestimmen.

Diese Erkenntnisse ließen vermuten, daß durch eine Blockade der Myostatin-Wirkung die Muskeln von Duchenne-Jungen größer oder zumindest nicht so schnell zerstört werden würden. Deswegen wurden monoklonale Antikörper hergestellt, also Immunproteine, die sich ganz spezifisch nur an Myostatin anlagern und es dadurch inaktivieren können. Diese Antikörper wurden einmal pro Woche unter das Zwerchfell von mdx-Mäusen gespritzt. Nach drei Monaten waren die behandelten Tiere um 12 % schwerer als Kontrolltiere ohne

Behandlung, weil ihre Muskelmasse zugenommen hatte. Ferner hatten sie eine bessere Muskelfunktion, sie konnten sich an einem drehenden Glasstab länger festhalten. Die Muskeldegeneration war zurückgegangen und die CK-Werte hatten sich praktisch normalisiert.

Jetzt werden weitere Experimente mit Mäusen unternommen. Danach müssen sie mit dystrophischen Hunden wiederholt werden, deren Dystrophie der menschlichen ähnlicher ist als die der mdx-Mäuse. Erst danach könnten klinische Prüfungen an Duchenne-Patienten beginnen.

Diese Behandlungsmethode wäre *keine* Heilung der Duchenne-Dystrophie, denn die genetische Ursache der Krankheit würde nicht beseitigt. Sie hätte aber gegenüber anderen Methoden Vorteile: keine Immun- oder Toxizitätsprobleme, keine genetischen Risiken durch Viren, und einfache Herstellung des Medikamentes. An dieser Technik sind schon Pharmafirmen interessiert, denn die Vergrößerung der Muskelmasse könnte auch für ältere Menschen und Menschen mit anderen muskelabbauenden Krankheiten wichtig werden (*Khurana*, Philadelphia).

Glukokortikoide: Es ist noch nicht bekannt, warum die einander ähnlichen Kortikoide *Prednison*, *Prednisolon* und *Deflazacort* die Muskeldegeneration verlangsamen. Während ein Teil ihrer Wirkung wahrscheinlich auf ihre entzündungshemmende Eigenschaft zurückgeht, werden auch andere Wirkungsmechanismen für möglich gehalten. Bei der Analyse der Aktivität von mehr als eintausend Genen von mit Prednison behandelten mdx-Mäusen mit der Mikroarray-Technik wurde gefunden, daß etwa 5 % der Gene eine verringerte oder erhöhte Aktivität zeigten. Die weitere Analyse des Gen-Aktivitätsmusters nach der Gabe von Glukokortikoiden wird zu einem besseren Verständnis des molekularen Wirkungsmechanismus im Skelettmuskel beitragen. Dies könnte helfen, eine Behandlung mit solchen Medikamenten zu entwickeln, die weniger Nebenwirkungen haben (*Muntoni*, London).

Kreatin: Eine andere Substanz, die möglicherweise die Muskeldegeneration verlangsamen kann, ist *Kreatin*, das natürlich vorkommt und in großen Mengen von Sportlern zur Leistungssteigerung gegessen wird. Kreatin stellt, wenn es mit Phosphorsäure verbunden ist, biochemische Energie kurzfristig nicht nur für die Muskelarbeit, sondern auch zur Entfernung von überschüssigem Kalzium zur Verfügung, das an der Zerstörung der Muskelzellen beteiligt ist. Versuche mit mdx-Mäusen zeigten, daß Kreatin die Krankheitssymptome verbessern kann, und daß damit die wissenschaftliche Grundlage für eine Verwendung als Zusatztherapie bei Duchenne-Dystrophie vorhanden ist (*Wallimann*, Zürich; *Rüegg*, Lausanne).

Weitere pharmakologische Experimente: Extrakte von grünem Tee im Futter von mdx-Mäusen verlangsamte die Degeneration einiger ihrer Muskeln, wahrscheinlich weil dieser Tee antioxidierende Substanzen enthält. --- Es wurden transgene mdx-Mäuse gezüchtet, die in ihren Muskeln den *Wachstumsfaktor mIGF1* (muscle insulin-like growth factor 1) in relativ großen Mengen produzierten Dadurch vergrößerte sich die Muskelmasse um bis zu 40 %, und die Fibrose sowie die Muskeldegeneration hatten sich abgeschwächt und die Regeneration deutlich verbessert. --- *Leupeptin* besteht aus drei z.T. modifizierten Aminosäuren. Mit Karnitin verbunden ist es ein Hemmstoff des Enzyms Kalpain, das die Proteine in den Muskelzellen zerstört, wenn Kalzium bei Duchenne-Dystrophie unkontrolliert einströmt. Die Degeneration von Muskelgewebe von Affen und Mäusen konnte damit deutlich verlangsamt werden. --- Im Dystrophin-Komplex von mdx-Mäusen ist die Konzentration des Enzyms *Stickoxid-Synthase* stark erniedrigt, so daß sein Produkt, das biologisch aktive Gas Stickoxyd, seine Funktionen nicht mehr ausüben kann. Dies trägt auch zur Muskeldegeneration bei. Transgene mdx-Mäuse mit der normalen Menge Stickoxid-Synthase zeigten abgeschwächte Dystrophie-Symptome. --- In mdx-Mäusen ist das Signalprotein *JNK1* aktiviert, wodurch die Degeneration von Muskelzellen mitverursacht wird. Die Injektion des in Adenoviren verpackten Gens des natürlich vorkommenden Proteins JIP1 wirkt der Aktivität von JNK1 entgegen und verlangsamte dadurch die Muskeldegeneration. --- Das Protein *Galectin-1* beteiligt sich an den Prozessen, die zu neuem und regeneriertem Muskelgewebe führen. Fibroblasten aus der Haut von neugeborenen Mäusen verwandeln sich in Muskelzellen mit Dystrophin, wenn sie in einer Zellkultur wachsen, die Galectin-1 enthält. Solche Fibroblasten könnten leicht von einem Duchenne-Patienten erhalten werden, die man dann mit Galectin-1 in Muskelzellen verwandelt, danach genetisch modifiziert, damit sie normales Dystrophin produzieren, und schließlich wieder in den Patienten zurückinjiziert.

Klinische Studien mit Duchenne-Patienten

Der erste Gentransfer-Versuch und ein neuer Versuch mit Myoblasten haben begonnen.
Steroide, Kreatin und andere chemische Substanzen werden geprüft.
Eine große Studie mit Prednison zusammen mit Cyclosporin wird vorbereitet.

Wegen der zunehmend positiven Ergebnisse bei Experimenten mit Tieren werden klinische Studien mit Duchenne-Jungen mehr und mehr notwendig werden. Solche klinischen Studien am Menschen müssen in mehreren Stufen erfolgen, wobei die erste Stufe, *Phase I*, schon mehrere Jahre beanspruchen wird, um nachzuweisen, daß die neue Behandlung keine untragbaren Nebenwirkungen mit sich bringt. Erst danach kann man in weiteren Versuchen an kranken Kindern überprüfen, ob die Behandlung die Muskelkraft wirklich verbessert oder erhält, *Phase II*, und welches die optimale Dosis sein wird, *Phase III*.

Alle diese Studien müssen *doppelblind* durchgeführt werden, d.h., nur etwa die Hälfte der Patienten erhält die zu prüfende Substanz, während die andere Hälfte eine inaktive Substanz erhält, ein Plazebo. Und weder die Patienten noch die Untersucher dürfen wissen, welcher Patient zu welcher Gruppe gehört, bevor die Studie beendet, der Code gebrochen und die Ergebnisse analysiert sind. Diese Studien und die Genehmigungsverfahren sind zeitraubend, sie dauern mehrere Jahre und sind kostenintensiv.

Transfer des Dystrophin-Gens mit Plasmiden als Vektor: Die erste Phase des ersten Gentransfer-Experiments mit Duchenne-Patienten wurde Anfang 2003 abgeschlossen und dessen Ergebnisse im Juni 2003 veröffentlicht. Die Biotechnologie-Firma *Transgène* in Straßburg begann mit der Vorbereitung dieses Gentherapie-Versuchs 1995 zusammen mit der französischen Muskeldystrophie-Gesellschaft AFM. Die Erlaubnis für diesen ersten Versuch am Menschen wurde von den französischen Behörden im November 1999 gegeben, und die ersten Vektor-Injektionen wurden im September 2000 im Hôpital de la Pitié Salpêtière in Paris vorgenommen.

Die 9 teilnehmenden Jungen waren alle älter als 15 Jahre, so daß sie ihre „informierte Zustimmung“ geben konnten. Sie hatten keinen klinischen Vorteil von dieser Behandlung, es handelte sich noch um *keine Therapie*.

Nachdem man mehrere Gentransfer-Methoden an dystrophischen Mäusen und Hunden getestet hatte, wurde entschieden, die gesamte cDNA des Gens für das unverkürzte Dystrophin in einem Plasmid als Vektor zu verwenden zusammen mit einem starken Promoter aus einem Virus. Sie haben den Vorteil, daß sie überhaupt kein Protein enthalten und deswegen keine Immunreaktion verursachen sollten. Das zu transportierende therapeutische Gen hat ebenfalls kein Protein, es ist reine, *nackte* DNA.

In weiteren vorbereitenden Experimenten an Muskelzellkulturen und mit Mäusen konnte gezeigt werden, daß mit dieser Vektor-Konstruktion neues Dystrophin an seinem richtigen Ort unterhalb der Zellmembran erschien, daß sich der Dystrophin-Glykoprotein-Komplex wieder bildete, und daß die Lebensdauer der Zellen verlängert wurde.

Das Ziel dieser Studie mit Duchenne-Patienten war es, zu zeigen, daß die Methode sicher ist, d.h., daß sie keine Immunreaktion oder Entzündung hervorruft, und daß neues und normales Dystrophin an seinem korrekten Ort in denjenigen Muskelfasern entsteht, die den Plasmid-Vektor bekommen hatten.

Eine Lösung, die 0,2 mg Plasmide mit 10 Billionen Dystrophin-Genen enthielt, wurde in einen Unterarmmuskel der ersten drei Patienten injiziert. Dies ist eine sehr kleine Menge genetischen Materials verglichen mit Tierexperimenten. Die nächsten drei Patienten erhielten eine Dosis von 0,6 mg und die letzten drei zweimal je 0,6 mg im Abstand von zwei Wochen. Die Sicherheit der Patienten war dabei das wichtigste Anliegen, deshalb wurde jeder Patient erst dann behandelt, nachdem es sicher war, daß beim vorhergehenden keine Immunprobleme aufgetreten waren.

Drei Wochen nach den Injektionen wurde ein 0,5 Kubikzentimeter großes Muskelgewebestück durch eine Biopsie entnommen und auf Dystrophin untersucht. In drei der sechs Jungen der ersten beiden Gruppen und in allen drei Jungen der dritten Gruppe wurde neues Dystrophin in weniger als 1 % bis mehr als 25 % der Muskelfasern um die Injektionsstelle herum nachgewiesen. Es gab keinen Hinweis auf eine Immunreaktion, weder gegen das Plasmid noch gegen das neu produzierte Dystrophin. Damit war die Frage der Phase-

I-Studie beantwortet: *Ein Gentransfer mit nackter DNA ist eine sichere Methode.* Sie könnte in einem größeren Maßstab zu einer therapeutischen Methode werden, da aus Tierexperimenten bekannt ist, daß ein Dystrophingehalt in etwa 20 % der Muskelfasern die Muskelfunktion deutlich verbessert.

Die französischen Wissenschaftler arbeiten jetzt mit der Arbeitsgruppe von *Jon Wolff* in Madison in den USA zusammen, die ähnliche Plasmid-Konstruktionen mit Genen eines Marker-Proteins in den Blutkreislauf der Gliedmaßen von Ratten, Hunden und Affen *unter Druck* injizierten und danach fanden, daß bis zu 40 % der Muskelfasern das transferierte Marker-Protein enthielten.

Der nächste Schritt wird sein, diese intra-arterielle Injektion bei Duchenne-Jungen anzuwenden, wahrscheinlich in einer klinischen Studie, die 2004 beginnt. Dafür ist geplant, aus Gründen der Sicherheit nur einen kleinen Fußmuskel zu behandeln. Sollte dies positiv verlaufen, wird diese Methode auf ganze Arm- oder Beinmuskeln ausgedehnt, das könnte für 2006 geplant werden.

Danach könnte diese Methode auch an Lungen- und Herzmuskeln angewendet werden. Aus Sicherheitsgründen kann man nicht schneller arbeiten, denn es wäre eine Katastrophe, wenn schwere Nebenwirkungen oder irgendetwas anderes Unvorhergesehenes vorkommen sollte, was zur Unterbrechung dieses oder anderer Gentherapie-Experimente führen würde (*Braun*, Straßburg)

Klinische Studien mit Myoblasten (Myoblastentransfer): In Québec City in Kanada wird seit Anfang 2003 ein klinischer Phase-I-Versuch an zehn 5 bis 15 Jahren alten Duchenne-Jungen mit Deletionen unternommen, der die Frage beantworten soll, ob unter den gegenüber früher veränderten Bedingungen ein Transfer von normalen Myoblasten sicher ist, d.h. zu keiner Immunabwehr oder Entzündung führt und ob nach der Behandlung normales Dystrophin entsteht.

Der Unterschied zu den 1990 erfolglos durchgeführten Versuchen ist, daß mit dem wesentlich wirksameren Immunhemmstoff FK506 (Tacrolimus) anstelle von Cyclosporin A gearbeitet wird, daß nicht wie früher 60 bis 90 Millionen Zellen in den ganzen Bizeps-Muskel gespritzt werden, sondern 30 Millionen Zellen in den Fußhebermuskel *Tibialis anterior* und zwar mit Mehrfachinjektionen in nur 1 mm Abstand in ein Muskelvolumen von nur 1 ccm. Eine Verbesserung der Muskelfunktion wird nicht erwartet, die Teilnehmer haben also, wie bei der französischen Studie, *keinen therapeutischen Nutzen* von diesen Injektionen.

Einen Monat nach der Behandlung wird nach einer Biopsie untersucht, ob normale Dystrophin-DNA, -mRNA und -Protein entstanden sind und ob es Immunreaktionen gegeben hat. Drei Patienten sind bis Juli 2003 bereits behandelt worden, die ganze Studie soll Ende 2003 beendet sein.

Falls die Ergebnisse positiv sind, wird sich eine Phase-II-Studie anschließen, bei der Myoblasten in den ganzen Bizepsmuskel transferiert werden und danach zwei Jahre lang die Muskelkraft gemessen, die sich, wie man hofft, eventuell verstärkt hat oder zumindest unverändert geblieben ist (*Tremblay*, Québec City).

Prednison und Deflazacort: Weltweit wurde in 16 klinische Studien nachgewiesen, daß Glukokortikoide (Kortison-Verbindungen), vor allem *Prednison*, die Muskelkraft von Duchenne-Jungen erhalten können. Vor einigen Jahren gab es Hinweise, daß das mit Prednison verwandte neue Kortikoid *Deflazacort* ähnlich wirkt aber weniger Nebenwirkungen zeigt.

Zwischen 1992 und 1997 wurde in einer Studie an 14 deutschen Muskelzentren die muskelerhaltende Wirkung dieser Medikamente mit dem gut dokumentierten natürlichen Verlauf der Krankheit verglichen. Die dabei verwendeten Dosen waren 0,75 mg pro kg Körpergewicht und Tag Prednison oder 0,9 mg pro kg und Tag Deflazacort. Das Ergebnis war, daß beide Medikamente die Muskelkraft über zumindest zwei bis drei Jahre erhalten und in Einzelfällen auch die Gehfähigkeit bis etwa zum 14. Lebensjahr verlängern können. Die hauptsächlichste Nebenwirkung bei Prednison war Gewichtszunahme bei etwa 20 % der Patienten. Bei Deflazacort kamen leichte Katarakte, Trübungen der Augenlinse, häufiger vor als bei Prednison. Beide Medikamente verlangsamten das Wachstum, andere Nebenwirkungen waren unbedeutend. Beim Absetzen der Behandlung setzte der Muskelabbau wieder ein und das Größenwachstum nahm wieder zu.

Die Ergebnisse der Studie erlauben noch nicht eine Entscheidung über den günstigsten Beginn für die Behandlung, z.B. vor dem 5. Lebensjahr. Kinder, die neu mit der Behandlung beginnen wollen, sollten dies im Rahmen einer gut dokumentierten Studie tun, damit weitere Informationen erhalten werden und um die erforderlichen umfangreichen Kontrollen wegen der Nebenwirkungen zu gewährleisten. Die Studie in Deutsch-

land wird mit einer Langzeitdokumentation fortgesetzt, die auch Daten einiger Patienten enthält, die mehr als sieben Jahre lang behandelt wurden (*Reitter*, Mainz).

Prednisolon: In Großbritannien war eine große Langzeitstudie vorbereitet worden, mit der festgestellt werden sollte, ob *Prednisolon* die Gehfähigkeit verlängern und die Lebensqualität verbessern kann. Eine periodenweise Behandlung, 10 Tage mit und 10 Tage ohne Medikament, war vorgesehen. Wegen fehlender Finanzierung ist es jetzt aber nur möglich, eine offene, also nicht doppelblinde Studie durchzuführen mit dem Ziel, Wirksamkeit und Nebeneffekte zu dokumentieren (*Muntoni*, London).

Prednison kombiniert mit Cyclosporin A: In Deutschland wird eine klinische Studie vorbereitet, die Ende 2003 beginnen wird und zwei Fragen beantworten soll: Kann *Cyclosporin A* allein die Muskelkraft kurzfristig erhöhen? Und kann eine Kombination von Cyclosporin A und *Prednison* den Kraftverlust langfristig besser abbremsen als Prednison alleine, wobei das Prednison periodenweise gegeben wird, d.h. in einem Zyklus von 10 Tagen mit und 10 Tagen ohne Therapie? Da immunologische Prozesse bei der Duchenne-Muskeldystrophie eine Rolle spielen, haben frühere Versuche gezeigt, daß immununterdrückende Medikamente wie das Cyclosporin A die Muskeldegeneration verzögern können.

Um statistisch zuverlässige Ergebnisse zu erhalten, sollen mindestens 150 eindeutig diagnostizierte Duchenne-Patienten teilnehmen, die älter als sechs Jahre sind und noch mindestens 50 m allein gehen können. Alle Kinder werden während der ersten Phase drei Monate lang doppelblind nur 3,5 – 4 mg/kg/Tag Cyclosporin A oder Milchzucker als Plazebo erhalten. In der 12 Monate langen zweiten Phase werden *alle Kinder zusätzlich* 0,75 mg/kg/Tag Prednison jeweils 10 Tage hintereinander bekommen, gefolgt von jeweils 10 Tagen ohne Prednison. Acht deutsche Muskelzentren werden diese Studie durchführen (*Korinthenberg*, Freiburg).

Kreatin: Eine Doppelblindstudie mit 8 Duchenne-, 10 Becker- und 18 Patienten mit anderen Muskelkrankheiten zeigte nach 8 Wochen, bei der eine tägliche Dosis von 5 Gramm Kreatin-Monohydrat für Kinder und 10 Gramm für Erwachsene verabfolgt wurde, eine geringe aber signifikantpositive und kurzfristige Verbesserung der Muskelkraft und der Leistung ohne Nebenwirkungen. Es müssen aber noch weitere klinische Studien durchgeführt werden, bevor Kreatin als über längere Zeit anzuwendendes muskelerhaltendes Medikament für Duchenne-Jungen empfohlen werden kann (*Walter*, München).

In Kanada hat eine Studie zur Wirkung von *Kreatin* mit 40 Duchenne-Jungen begonnen. ---- In Belgien wurde drei Monate lang *Kreatin* an 12 Duchenne- und 3 Becker-Patienten geprüft mit dem Ergebnis einer wenig erhöhten Muskelkraft.

Oxandrolon, ein anabolisches Steroid, das manche Sportler verwenden, wurde in einer Studie mit 51 Duchenne-Jungen geprüft. Die geringe nachgewiesene Verbesserung der Muskelkraft kann jedoch eine Verwendung dieses Medikamentes anstelle von Prednison oder Deflazacort *nicht* rechtfertigen (*Fenichel*, Nashville).

Internationale klinische Tests: Die *Cooperative International Neuromuscular Research Group* (CINRG) in Washington, an der Laboratorien in den USA, Kanada, Belgien, Argentinien, Australien und Indien beteiligt sind, führt an Duchenne-Kindern eine Reihe von klinischen Studien mit Substanzen durch, von denen einige aus den 45 Substanzen ausgewählt wurden, die in einem großen Versuch mit vielen chemischen Verbindungen an Mäusen positive Ergebnisse gezeigt hatten.

Albuterol ist ein Medikament gegen Asthma, in einem Vorversuch an 10 Duchenne-Jungen wurde eine durchschnittlich 8 %ige Verstärkung der Muskelkraft gefunden. Im August 2002 begann eine Doppelblindstudie mit 25 bis 30 Jungen, die etwa 9 Monate dauern wird.

Im September 2001 begann ein Versuch mit ***Coenzym Q10*** an 15 Patienten, die außerdem auch Prednison oder Deflazacort erhalten. Eine weitere Studie mit Patienten im Rollstuhl ist geplant.

Oxatomid ist ein Antihistamin, das 9 Monate lang an 15 Duchenne-Jungen getestet wird.

Pentoxifyllin ist entzündungshemmend und unterdrückt die Fibrose. Eine klinische Studie hat im Februar 2003 begonnen, die 15 Monate dauern wird.

Ein möglicher Unterschied der Wirkung von ***Prednison*** wird in einer Studie geprüft, bei der das Medikament entweder täglich gegeben wird, oder die ganze Wochendosis an zwei Tagen des Wochenendes. Die Studie hat im Januar 2003 begonnen und wird 15 Monate dauern.

Eine Studie mit ***Kreatin*** und ***Glutamin*** wurde mit 54 Patienten 6 Monate lang durchgeführt. Sie wurde im März 2003 beendet, die Ergebnisse

werden ausgewertet.

Weitere Studien sind mit ***Taurin***, ***Carnitin*** und ***Nikotinsäure*** geplant.

Für die Überwachung und die Dokumentation dieser Studien sind einheitliche Kontrollmethoden ausgearbeitet worden. Dabei werden nicht nur die Muskelfunktionen gemessen, sondern auch andere Parameter, wie z.B. die Lebensqualität. Einige dieser Methoden werden modifiziert, so daß sie sowohl bei sehr jungen als auch bei älteren Patienten angewendet werden können (*Escolar*, Washington).

Wann wird es eine Therapie geben?

Duchenne-Muskeldystrophie hat es immer bei Menschen und allen Tieren mit Skelettmuskeln gegeben. Sie wurde zum erstenmal von dem englischen Arzt *Edward Meryon* 1851 korrekt beschrieben. Benannt wurde sie aber nach dem französischen Arzt *Duchenne de Boulogne* in Paris, der 1861 nicht nur ihre Symptome, sondern auch ihre Muskelveränderungen, die Histologie, beschrieb.

Aufgrund der Art der Vererbung wußte man zu Beginn des 20. Jahrhunderts bereits, daß ein Defekt auf dem X-Chromosom für die Krankheit verantwortlich ist. Aber erst 1986 wurde das Gen selbst, das *Dystrophin-Gen*, identifiziert (*Kunkel*, Boston) und kurz danach auch das Protein *Dystrophin* charakterisiert (*Hoffman*, Washington), das in Duchenne-Jungen fehlt. Danach war man optimistisch, daß die schnell voranschreitende Genforschung in wenigen Jahren einen gentherapeutischen Weg finden würde, das geschädigte Gen zu ersetzen oder zu reparieren und damit die Krankheit zu heilen.

Doch dieser Optimismus war verfrüht, denn die ersten klinischen Versuche mit dem *Myoblastentransfer* zeigten 1991, daß die Methode zwar bei Mäusen Erfolg hatte, in Duchenne-Jungen jedoch *unwirksam* war. Jetzt, 17 Jahre nach der Entdeckung des Gens, gibt es immer noch keine Therapie für Duchenne-Muskeldystrophie. Wie dieser Forschungsbericht zeigt, wird inzwischen an vielen verschiedenen Methoden gearbeitet, die an dystrophischen Mäusen und Hunden und zum Teil auch schon an kranken Kindern überprüft werden. Diese Studien sind jedoch zeitaufwendig, und die Genehmigung einer Behandlung wird zusätzliche Jahre beanspruchen.

Es gibt jedoch Beispiele von Medikamenten, die sehr schnell zugelassen wurden, wie *Gleevec*, das 2001 innerhalb weniger Monate ohne Rücksicht auf Nebenwirkungen genehmigt wurde, weil es etwa 90 % der Patienten mit dem Blutkrebs chronisch-myeloische Leukämie heilen konnte.

All Forschungsergebnisse müssen berücksichtigt und viele zusätzliche Ergebnisse erarbeitet werden, bevor man voraussagen kann, wie lange es dauern wird, bis es eine sichere und wirksame Therapie für Kinder mit Duchenne-Muskeldystrophie überall in der Welt geben wird. Die Antwort auf diese Frage ist die wichtigste für die Eltern und ihre kranken Söhne. Es wird wahrscheinlich noch viele Jahre dauern, bis die Duchenne-Muskeldystrophie besiegt ist. Das ist nicht, was man erwartet hatte, das ist die negative Seite dieses schwierigen Problems, die positive ist, daß Hunderte von fähigen und engagierten Wissenschaftlern in bald 100 Laboratorien in vielen Ländern an einer Heilung arbeiten, ***deswegen wird es eine Heilung geben, früher oder später.***

Wissenschaftler, die in diesem Bericht genannt sind

Nur die Leiter der Forschungsgruppen, über deren Ergebnisse ausführlich berichtet wurde, sind mit ihren abgekürzten Adressen und ohne Titel aufgelistet, die meisten sind Professoren und alle haben einen Doktortitel. Weitere Informationen über die Forschungsarbeiten einschließlich von Originalveröffentlichungen, in denen die Namen aller Mitarbeiter einer Arbeitsgruppe genannt werden, können vom Autor dieses Berichtes angefordert werden.

Richard J. **Bartlett**, National Institutes of Health, Bethesda, MD
Laurent **Bernheim**, Hôpital Cantonal Universitaire, Genf
Serge **Braun**, Synthetic Vector Products, Transgène S.A., Straßburg

Kevin P. **Campbell**, University of Iowa College of Medicine, Iowa City, IA
Jeffrey **Chamberlain**, Dept. of Neurology, University of Washington, Seattle, WA
Paula **Clemens**, Dept. of Neurology, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA
Judith C. T. **van Deutekom**, Dept. of Human Genetics, Leiden University Med. Center, Leiden
Kay **Davies**, Dept. of Genetics, University of Oxford, Oxford
Diana **Escolar**, Children's National Medical Center, Washington, DC
Gerald M. **Fenichel**, Vanderbilt University Medical Center, Nashville, TN
Kevin M. **Flanigan**, Dept. of Neurology and Pathology, University of Utah, Salt Lake City, UT
Stanley **Froehner**, Dept. of Physiology and Biophysics, University of Washington, Seattle WA
Stuart **Hodgetts**, University of Western Australia, Crawley
Eric **Hoffman**, Children's National Medical Center, Washington, DC
Paul C. **Holland**, Montreal Neurological Institute, McGill University, Montreal
Johnny **Huard**, Children's Hospital, University of Pittsburgh Medical Center, Pittsburgh, PA
Robert **Kapsa**, Melbourne Neuromuscular Research Institute, Melbourne
George **Karpati**, Montreal Neurological Institute, McGill University, Montreal
Stephen **Kaufman**, Dept. of Cell and Structural Biology, University of Illinois, Urbana, IL
Tejvir S. **Khurana**, Pennsylvania Muscle Institute, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA
Stefan **Kochanek**, Zentrum für Molekularmedizin, Universität Köln
Louis **Kunkel**, Harvard University, Children's Hospital, Boston, MA
Hanns **Lochmüller**, Genzentrum der Universität, München
Jerry **Mendell**, Dept. of Neurology, Ohio State University, Columbus, OH
Clemens **Müller-Reible**, Humangenetisches Institut, Biozentrum der Universität, Würzburg
Francesco **Muntoni**, Dept. of Paediatrics, Imperial College School of Medicine, London
Roel **Nusse**, Dept. of Developmental Biology, Stanford University, Stanford
Gertjan B. **van Ommen**, Dept. of Human Genetics, Leiden University Medical Center, Leiden
Terrence **Partridge**, Muscle Cell Biology Group, Hammersmith Hospital, London
Thomas **Rando**, Dept. of Neurology, Stanford University School of Medicine, Palo Alto, CA
Bernd **Reitter**, Kinderklinik der Universität, Mainz
Michael **Rudnicki**, Ottawa Health Research Institute, Ottawa
Urs T. **Rüegg**, Ecole de Pharmacie de l'Université, Lausanne
Günter **Scheuerbrandt**, Testlaboratorium Breitnau, Breitnau bei Freiburg
H. Lee **Sweeney**, Dept. of Physiology, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA
James G. **Tidball**, Dept. of Physiological Sciences, University of California, Los Angeles
Theo **Wallimann**, Institut für Zellbiologie, Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich
Maggie C. **Walter**, Friedrich-Baur-Institut, Medizinische Klinik der Universität, München
Dominic **Wells**, Dept. of Neuromuscular Diseases, Imperial College of Medicine, London
Steve **Wilton**, Australian Neuromuscular Research Institute, University of Western Australia, Perth
Jon **Wolff**, Dept. of Pediatrics, University of Wisconsin Medical School, Madison, WI

Dr. rer. nat. Günter Scheuerbrandt, Im Talgrund 2, D-79874 Breitnau bei Freiburg/Br.

Tel.: 07652-91813-0, Fax: 07652-91813-13, e-Mail: gscheuerbrandt@t-online.de

Der Bericht wird mit neuen Forschungsergebnissen von Zeit zu Zeit aktualisiert. Alle, die es wünschen und ihre e-Mail-Adresse mitteilen, erhalten Aktualisierungen und die 2004-Version zugesandt. Diesen Bericht gibt es unter http://www.duchenne-forschung.de im Internet neben deutsch auch auf englisch, französisch, spanisch und italienisch.

Exon Skipping, ein Beispiel

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

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

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

versteckter Stoppcode — Antisense-Oligoribonukleotid

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

| Anfang Exon 47
| UUA-CUG-GUG-GAA-GAG-UUG---
| leu leu val glu glu leu
```

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

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

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

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

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

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