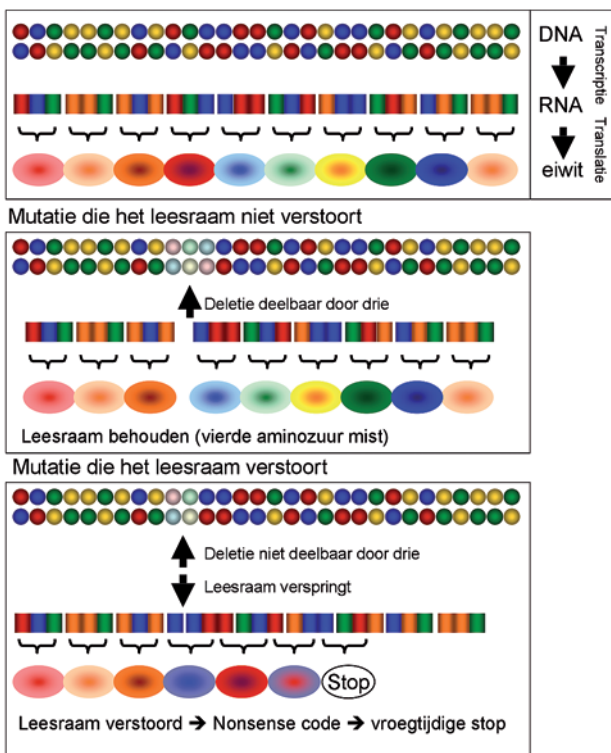


RNA-therapie voor de ziekte van Duchenne

Minder is meer

C.L. de Winter en A. Aartsma-Rus; Afdeling Humane Genetica, Leids Universitair Medisch Centrum.

Duchenne spierdystrofie is een ernstige, erfelijke spierziekte die wordt veroorzaakt door mutaties in het *DMD*-gen. Als gevolg van deze mutaties wordt in de spiervezels van Duchenne-patiënten geen functioneel dystrofine-eiwit gemaakt. Omdat het gen op het X-chromosoom ligt, treft de ziekte nagenoeg altijd jongens. Momenteel is er geen therapie beschikbaar voor Duchenne-patiënten en als gevolg van de progressieve spierzwakte overlijden ze veelal voor hun dertigste. Er wordt veel onderzoek gedaan naar de mogelijkheid om de ziekte te genezen, dan wel het verlies van spierfunctie te verminderen. Bij de afdeling Humane Genetica in het Leids Universitair Medisch Centrum in Leiden wordt momenteel gewerkt aan het ontwikkelen van een veelbelovende 'exon skip'-therapie met behulp van antisense oligonucleotides (AONs). Deze heeft als doel het genetische defect op RNA-niveau te herstellen, zodat een kleiner, maar deels functioneel dystrofine-eiwit gemaakt kan worden. Zulke dystrofine-eiwitten worden ook gevonden bij Becker-spierdystrofiepatiënten, die (veel) minder ernstig zijn aangedaan dan Duchenne-patiënten. De 'exon skip'-therapie zou de spieraafbraak bij Duchenne-patiënten kunnen vertragen en mogelijk zelfs helemaal kunnen stoppen.



Figuur 1 Van gen naar eiwit.

De genetische code voor onze eiwitten is opgeslagen in genen die bestaan uit DNA (bovenste kader), wat is opgebouwd uit twee strengen DNA-bouwstenen (nucleotides). Er zijn vier verschillende nucleotides (hier aangegeven met vier verschillende kleuren cirkels). Ieder nucleotide kan een verbinding vormen met slechts één ander nucleotide in de tegenoverliggende streng (in dit voorbeeld ligt groen altijd tegenover geel en rood altijd tegenover blauw). Tijdens een proces dat "transcriptie" genoemd wordt, wordt een RNA-kopie gemaakt van het DNA. Ook RNA is opgebouwd uit nucleotides (hier aangegeven met vier kleuren rechthoeken), maar RNA bestaat uit een enkele streng. Tijdens de "translatie" wordt RNA omgezet in eiwit. Hierbij coderen steeds drie RNA-nucleotides (tripletten) voor één van de meer dan twintig aminozuren (eiwit bouwstenen). Ieder eiwit is uniek en opgebouwd uit tientallen tot duizenden aminozuren. Mutaties (fouten) in het DNA van een bepaald gen hebben effect op de functionaliteit van het eiwit waarvoor dat gen codeert. Wanneer bij een deletie (het verdwijnen van nucleotides uit het DNA) de hoeveelheid gedeleteerde nucleotides deelbaar is door drie (3, 6, 9, 12 etc.) zal één of meerdere aminozuren uit het uiteindelijke eiwit ontbreken (middelste paneel: het vierde rode aminozuur is niet aanwezig, omdat de genetische code hiervoor is verdwenen). Afhankelijk van hoeveel aminozuren er missen en waar in het eiwit deze ontbreken, kan dit nauwelijks tot desastreuze gevolgen hebben voor de eiwitfunctie. Het ontbreken van een hoeveelheid nucleotides die niet deelbaar is door drie heeft een groter effect op de aminozuur volgorde (onderste paneel). Na de deletie verspringt het "leesraam" en worden er verkeerde aminozuren

ingebouwd (vanaf het vierde aminozuur in het voorbeeld). Ook resulteert dit vaak tot een vroegtijdig stopsignaal en over het algemeen gaat de eiwitfunctie volledig verloren bij deze mutaties.

De genetische code voor lichaamseigen eiwitten ligt opgeslagen op het DNA in genen. DNA is opgebouwd uit vier verschillende bouwstenen (nucleotides). Voordat een gen kan worden omgezet in een eiwit, wordt eerste een RNA-kopie gemaakt van het DNA (figuur 1). Ook RNA is opgebouwd uit nucleotides. In de meeste genen ligt de genetische informatie die de eiwitcode bevat in stukjes verdeeld over het gen. Daarom worden alle stukken RNA die geen coderende informatie bevatten (intronen) weggeknipt en de coderende gedeeltes (exonen) aan elkaar gezet in een proces dat RNA-splicing wordt genoemd (zie **figuur 4**). Het resultaat is een boodschapper (messenger) RNA (mRNA) dat door de cel wordt gebruikt om eiwit te maken. Hierbij coderen steeds drie RNA-bouwstenen (nucleotides) voor een eiwitbouwsteen (aminozuur) (figuur 1). Mutaties (fouten) in het DNA worden dus via RNA doorgegeven en resulteren in foutieve eiwitten die geen of een verkeerde functie hebben. Bij Duchenne spierdystrofie, een ernstige spierziekte, worden meestal deleties (dat wil zeggen: er verdwijnt een stuk DNA) gevonden in het *DMD*-gen dat codeert voor het eiwit dystrofine. Door deze deleties missen één of meerdere exonen in het DNA en dus ook in de RNA-kopie. Dit kan twee gevolgen hebben voor het omzetten van RNA in eiwit (translatie). Meestal zal het totale aantal nucleotides van de missende exonen niet deelbaar zijn door drie. Omdat RNA steeds per drie bouwstenen codeert voor een aminozuur, zal hierdoor de genetische code verspringen, of 'het leesraam raakt verstoord' (figuur 1, onderste paneel), wat resulteert in een nonsense code en de eiwitproductie wordt vroegtijdig afgebroken. Het kan echter ook gebeuren dat de hoeveelheid bouwstenen van het RNA wel deelbaar is door drie. In dit geval blijft het leesraam behouden en zal de eiwitproductie gewoon doorgaan, alleen mist het eiwit een deel (het deel dat gecodeerd werd door de exonen die uit het DNA verdwenen zijn – **figuur 1** middelste paneel). Voor de meeste eiwitten zijn beide type mutaties funest. Het dystrofine-eiwit is hierop een uitzondering, omdat de functionele delen zich met name aan het begin en aan het einde van het eiwit bevinden, en het middelste deel vooral in een lange elastische binding daarvan voorziet (figuur 2). Het gevolg is dat een mutatie die het leesraam niet verstoort meestal resulteert in een eiwit dat nog (deels) functioneel is, terwijl mutaties die het leesraam verstoren

leiden tot dystrofines waar het laatste functionele domein mist. Deze eiwitten zijn niet functioneel. In de genetische therapie voor Duchenne-patiënten die in dit artikel wordt beschreven wordt getracht het leesraam te herstellen op RNA-niveau. Het doel is om de spiercellen in plaats van niet-functionele, deels functionele eiwitten te laten maken, zodat het ziekteverloop van Duchenne-patiënten aanzienlijk zou kunnen verbeteren.

Duchenne spierdystrofie

Symptomen

De ziekte van Duchenne wordt gekenmerkt door progressieve spierzwakte (1). Ouders van kinderen met Duchenne zien meestal al in de eerste twee tot drie jaar na de geboorte signalen van de ziekte. Door spierzwakte en een verminderd uithoudingsvermogen gaan kinderen laat lopen en hebben ze moeite met opstaan, rennen, springen en traplopen. De voortgang van de spierzwakte leidt veelal bij kinderen rond het tiende levensjaar tot rolstoelgebruik. Door de toenemende zwakte van de tussenribspieren ontstaan vaak ademhalingsproblemen en ook cardiomyopathie (een hartafwijking) is zeer frequent en leidt bij 20% van de patiënten tot voortijdige dood. Naast de spierzwakte zijn 20-30% van de patiënten mentaal geretardeerd, en vertonen veel patiënten gedrags- en emotionele problemen, waarvan niet zeker is of die aan het gendefect liggen, of door het gehandicapte bestaan worden veroorzaakt.

Genetische oorzaak

Duchenne spierdystrofie wordt veroorzaakt door mutaties in het *DMD* (Duchenne muscular dystrophy) gen, dat codeert voor het eiwit dystrofine (2). Door de mutaties gaat de functie van dystrofine volledig verloren. Omdat dit eiwit is essentieel voor de stabiliteit van spiervezels tijdens de spiercontractie, leidt verlies van dystrofine tot de ernstige, progressieve spierzwakte die kenmerkend is voor Duchenne. Het *DMD*-gen ligt op het X-chromosoom, zodat de ziekte vrijwel alleen maar jongetjes treft. Vrouwen met een mutatie worden meestal niet ziek, omdat het gebrek wordt opgevangen door een intacte kopie van het gen op het andere X-chromosoom. Wel kunnen ze de mutatie doorgeven aan hun zoons. De ziekte komt bij 1 op de 3500 nieuw geboren jongens voor en is daarmee de meest voorkomende erfelijke dodelijke ziekte wereldwijd. Het *DMD*-gen is relatief gevoelig voor nieuwe mutaties. Bij een op de drie patiënten is de mutatie 'de novo' (nieuw) ontstaan in de geslachtscellen van de moeder (of grootvader).

Diagnose

Naast het hebben van de karakteristieke spierzwakte, wordt de diagnose gesteld op DNA-onderzoek en afwijkingen in bloed en spierweefsel. Deze afwijkingen uiten zich in het hebben van een sterk verhoogde CK-gehalte (creatine kinase) in het bloed. Dit is een spierenzym dat bij spierschade in de bloedbaan lekt en dus verhoogd is bij Duchenne, maar ook bij patiënten met andere spierdystrofieën. Een spierbiopsie laat als voornaamste afwijking de afbraak van de vezels zien. Het sluitstuk van de diagnose wordt gevormd door onderzoek naar de aanwezigheid van het dystrofine-eiwit in het spierweefsel en het aantonen van een mutatie in het *DMD*-gen.

Prognose en behandeling

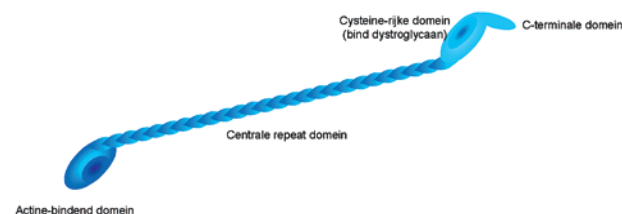
Omdat Duchenne spierdystrofie nog niet te genezen is, is de behandeling vooral gericht op het bestrijden en verlichten van de verschijnselen. Dit gebeurt voornamelijk door toediening van corticosteroiden (bijvoorbeeld Prednison). Deze hebben een positief effect op de spierkracht en vertragen de voortgang van de ziekte enigszins. De behandeling wordt meestal gestart vanaf het moment dat er sprake is van duidelijke klachten.

Zonder medisch ingrijpen was de levensverwachting van jongens met Duchenne tot voor kort 15-20 jaar. De prognose is de laatste jaren sterk verbeterd door verbeterde zorg en vooral door de mogelijkheid van (langdurige) beademing. Inmiddels zijn er patiënten van veertig bekend, maar de meeste patiënten overlijden nog altijd voor hun dertigste levensjaar.

Dystrofine

Dystrofine is een heel groot staafvormig eiwit, dat bestaat uit 3.685 aminozuren (2). Het eiwit heeft een molecuulgewicht van 427 kDa. Het is 125 nm lang, dat wil zeggen als 8.000 moleculen in een rechte lijn worden gezet, dan zou de totale lengte precies 1 mm zijn. Dystrofine maakt slechts 0,002% van het gewicht aan spiereiwitten uit (20 mg per kg spier!) (2).

Het eiwit functioneert als een brug tussen het actine celskelet en de extracellulaire matrix in spiervezels. Hierdoor hebben de spieren veerkracht en stevigheid. Het eiwit bestaat uit vier verschillende domeinen (figuur 2). Als eerste een N-terminaal actine-bindend domein, gevolgd door een groot centraal domein dat is opgebouwd uit 24 repeats, dan een cysteine-rijk domein en een C-terminaal domein (2). Via het cysteine-rijke domein is het dystrofine verbonden met een complex van dystroglycanen en sarcoglycanen. De dystroglycanen op hun beurt zijn verbonden met laminine 2, een component van de extracellulaire matrix. Het actine-bindende en het cysteine-rijke domein van het dystrofine eiwit, zijn beide essentieel voor de dystrofinefunctie. Bij Duchenne-patiënten gaat de dystrofinefunctie, en dus de verbinding tussen het celskelet en de extra-cellulaire matrix, verloren. Met name de dystroglycanen en de sarcoglycanen komen dan verlaagd tot expressie, maar ook samentrekbare eiwitten zoals actine en myosine degenereren. Hierdoor zijn spiervezels gevoelig voor schade tijdens spiercontractie. De afgebroken spiervezels worden uiteindelijk vervangen door vet- en bindweefsel, wat gepaard gaat met verlies van spierfunctie.



Figuur 2 Schematisch figuur van het dystrofine-eiwit.

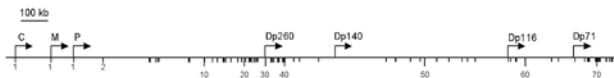
Dystrofine is een groot structureel eiwit met vier domeinen. Aan het begin van het eiwit (N-terminale deel) ligt het actine-bindende domein. Actine is een belangrijk bestanddeel van het celskelet. Het midden van dystrofine bestaat uit een langgerekt domein dat is opgebouwd uit 24 repeats (stukken aminozuren die veel op elkaar lijken). Aan het einde bevinden zich de cysteine-rijke en C-terminale domeinen. Het cysteine-rijke domein is verbonden met het bindweefsel dat spiervezels omgeeft via een transmembraan eiwit (dystroglycaan). Op deze manier vormt dystrofine een verbinding tussen het celskelet in de spiervezel en het bindweefsel buiten de spiervezel. Inmiddels is bekend dat dystrofine nog redelijk kan functioneren wanneer 75% van het centrale domein is gedeleteerd, zolang het actine-bindende en cysteine-rijke domein maar onaangetaast zijn.

Het *DMD*-gen

Het *DMD*-gen is het grootste gen dat tot nu toe bekend is bij de mens. Het bestaat uit 2,4 miljoen baseparen (circa 1,5% van het hele X-chromosoom), terwijl een gemiddeld gen 30 duizend baseparen bevat. Als je het DNA zou uitstreken is het gen 0,84 mm lang. Mede door deze enorme lengte was het een van de eerste genen die werd geïdentificeerd, in 1986. Kort hierna werd ook de structuur van het gen opgehelderd. Deze is zeer complex en naast de spievorm kunnen er nog vele andere dystrofines gemaakt worden (figuur 3). De coderende sequentie van de spievorm is ondergebracht in 79 exonen en beslaat slechts 0,5% (13.973 baseparen) van de totale lengte van het gen. Hieruit volgt

[vervolg op volgende pagina >](#)

dat het overgrote deel van het gen (99,5%) wordt ingenomen door het niet-coderende DNA van de intronen. Niemand weet waarom dit gen zo groot is, maar ook in andere zoogdieren, vissen en zelfs in de fruitvlieg is het gen voor dystrofine uitzonderlijk groot. Na het maken van een RNA-kopie moeten de intronen worden verwijderd en de exonen aan elkaar geplakt in het proces dat 'splicing' wordt genoemd (zie **figuur 4**). Hierna kan het RNA worden omgezet in het dystrofine-eiwit.



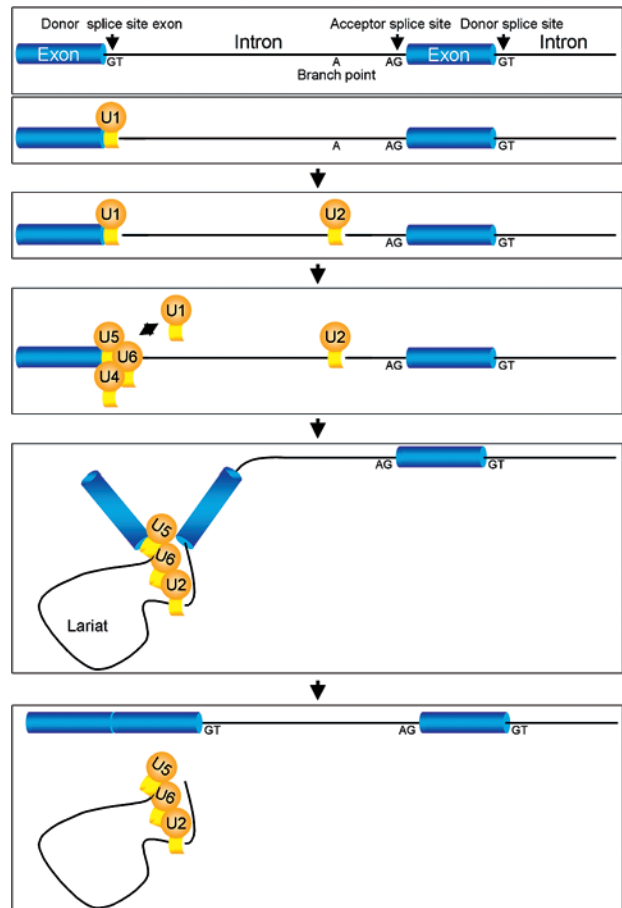
Figuur 3 De structuur van het DMD-gen.

De structuur van het *DMD*-gen is zeer complex. De 79 exonen liggen verspreid over een gebied van 2,4 miljoen baseparen. Naast de spievorm (M) zijn er nog twee andere volledige isovormen (C en P), die een eigen promotor en eerste exon hebben en verder identiek zijn aan de spievorm (exon 2-79). Ook zijn er vier interne promotoren verantwoordelijk voor de generatie van kortere dystrofine isovormen (Dp260, Dp140, Dp116 en Dp71). Verder bezit het gen een alternatieve polyadenylingsite na exon 70 en zijn sommige exonen (bijvoorbeeld exon 78) onderhevig aan alternatieve splicing (dat wil zeggen dat sommige exonen soms worden overgeslagen in bepaalde weefsels). Hierdoor kan een zeer grote hoeveelheid van dystrofine isovormen gegenereerd worden. De precieze functie van deze isovormen is momenteel nog niet bekend. De meeste promotoren zijn weefsel-specifiek en komen bijvoorbeeld alleen voor in de spieren, onderdelen van de hersenen of het oog, terwijl de kleinste isovorm in alle weefsels wordt geproduceerd.

Mutaties in het *DMD*-gen

Duchenne spierdystrofie wordt hoofdzakelijk veroorzaakt door drie soorten mutaties in het *DMD*-gen: deleties (het ontbreken van exonen), duplicaties (het verdubbelen van exonen) en kleine mutaties (één of een paar basen ontbreken, zijn toegevoegd of vervangen). Deleties van een of meerdere exonen worden gevonden bij ruim 70%, duplicaties bij 7% en kleine mutaties bij ongeveer 25% van de Duchenne-patiënten (3). Wanneer deze mutaties het leesraam van de genetische code verstoren (**figuur 1**), dan zal de vertaling van RNA naar eiwit vroegtijdig worden afgebroken. Hierdoor ontstaat een half eiwit dat zijn verbindingfunctie niet kan uitoefenen en dus leidt tot Duchenne-spierdystrofie. Als een deletie het centrale-repeat-gedeelte van het dystrofine-eiwit betreft en het leesraam niet verstoort, kan een eiwit gemaakt worden dat de belangrijkste functionele domeinen (actine-bindend en cysteïne-rijke domeinen) bevat, alleen een (iets) verkort centraal domein heeft. Deze eiwitten zijn deels functioneel en worden gevonden bij Becker-spierdystrofie (BMD). Dit is een mildere spierdystrofie die voorkomt bij 1 op de 20.000 mannen. De ernst van deze ziekte is meer variabel, maar over het algemeen is het ziekteverloop (veel) milder (1). Vaak zijn deze patiënten pas op latere leeftijd afhankelijk van een rolstoel. De levensverwachting van ernstig aangedane BMD-patiënten ligt iets lager, maar is normaal voor de milder aangedane patiënten. De hoeveelheid van het (gedeeltelijk) functionele dystrofine is de belangrijkste maat voor de ernst van de ziekte. Bij Becker-patiënten is het niveau van dystrofine (met interne deletie) meer dan 20% van normale niveaus. In Duchenne-patiënten varieert dit van minder dan 3% tot helemaal geen dystrofine. Ook de locatie en de grootte van de mutatie hangen samen met de mate van de ernst van de ziekte. Er zijn Becker-patiënten die meer dan 66% van het centrale domein missen en zeer mild zijn aangedaan. Deleties waardoor meer dan 75% van het dit domein is verwijderd hebben echter Duchenne tot gevolg, ook als het actine-bindende en cysteïne-rijke domein aanwezig zijn. Hieruit kan worden geconcludeerd dat grote delen van het centrale, elastische domein van dystrofine gemist kunnen worden, hoewel wel een beperkt aantal repeats nodig is voor de eiwitfunctie. In de functionele domeinen van dystrofine hebben deleties die het leesraam niet verstoren grotere gevolgen. Zulke deleties in het actine-bindende gedeelte worden gevonden bij ernstige

Becker-patiënten, terwijl ze in het cysteïne-rijke gedeelte altijd Duchenne veroorzaken. Er zijn ook diervormen voor de ziekte van Duchenne. De meest bekende is het mdx muis-model en een golden retriever spierdystrofie model. Beide zijn het gevolg van een spontane mutatie in het muizen en honden *DMD*-gen en resulteren in niet-functionele dystrofines. Het hondenmodel vertoont net als de mens ernstige, progressieve spierzwakte en verlies van spierfunctie en een kortere levensverwachting. Vreemd genoeg zijn de symptomen van de mdx-muis minder ernstig: de spierfunctie is enigszins verminderd en de levensverwachting is nagenoeg normaal. Beide modellen worden gebruikt voor onderzoek naar therapieën voor Duchenne-spierdystrofie.



Figuur 4 Splicing (kader)

In de meeste genen is de sequentiecode verdeeld over verschillende kleine exonen. De exonen worden onderbroken door intronen, stukken niet-coderend DNA. Het gemiddelde intron is 3000 baseparen groot, maar de intronen in het *DMD*-gen zijn veel groter (tussen de 107 en de 248 duizend baseparen). Tijdens de pre-mRNA splicing (zie **figuur 4**) worden de intronen uit het pre-mRNA geknipt en de exonen aan elkaar geplakt. Dit proces wordt gecoördineerd door een katalytisch complex dat het spliceosoom wordt genoemd. Het spliceosoom bestaat uit vijf small nuclear ribonucleoproteins (snRNP): U1, U2, U4, U5 en U6 snRNP. Elk snRNP bevat een RNA-gedeelte en een functioneel eiwitgedeelte. Intronen hebben een donor (begin) en acceptor (einde) splicesite en een branch point, die allemaal gekenmerkt worden door een bepaalde nucleotidesequentie en zo herkend kunnen worden door het RNA-gedeelte van de verschillende snRNPs. Het splicingsproces begint wanneer de U1 snRNP (U1) bindt aan de donor splicesite. U2 snRNP bindt vervolgens aan een specifiek nucleotide dat iets voor de acceptor splicesite is gelegen (de zogenaamde branchpointsequentie). Hierna wordt U1 snRNP vervangen door het U4-U5-U6 snRNP complex. Na het loslaten van U4 snRNP kunnen U6 snRNP en U2 snRNP aan elkaar binden. Door deze binding wordt vervolgens een zogenaamde lasso (lariat) gevormd. Dit leidt tot een katalytisch actief complex, waarbij het intron aan het begin en einde wordt losgeknipt en de exonen met elkaar worden verbonden. Vervolgens begint het hele splicingproces weer opnieuw bij het volgende intron, totdat alle intronen verwijderd en alle exonen aan elkaar geplakt zijn.

Strategieën voor gentherapie

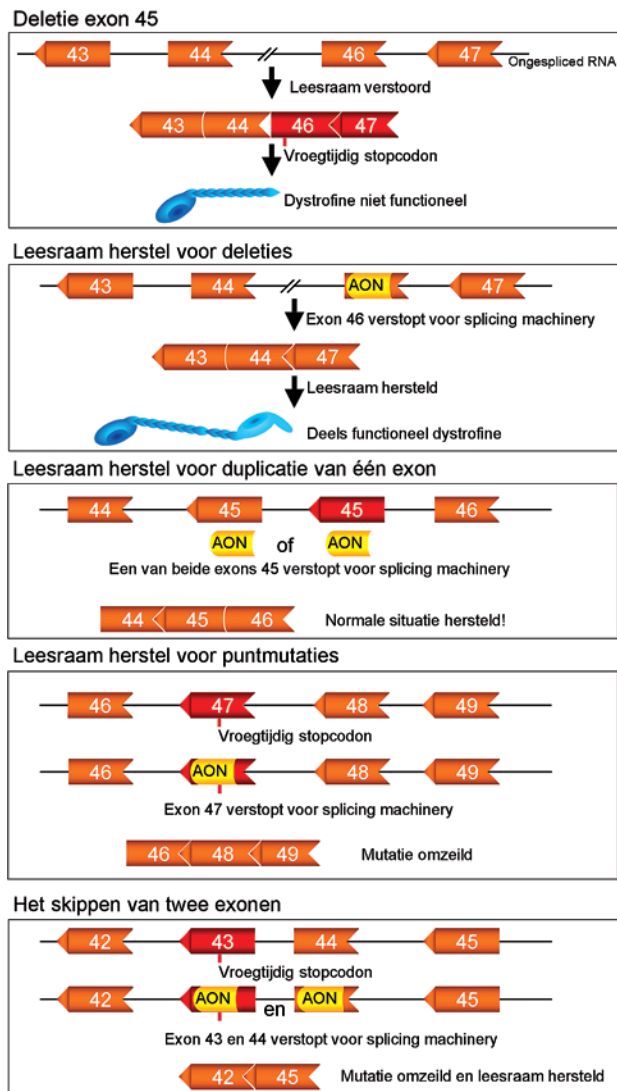
Momenteel wordt Duchenne-spierdystrofie behandeld door symptoombestrijding. Dit kan niet voorkomen dat patiënten uiteindelijk toch hun spierfunctie verliezen omdat de oorzaak,

het gebrek aan dystrofine door een mutatie in het *DMD*-gen, niet wordt aangepakt. Een van de meest voor de hand liggende therapieën is het toevoegen van een intact *DMD*-gen (gentherapie) aan de kernen van dystrofe spiercellen (4). De genetische informatie van het nieuwe gen kan dan worden gebruikt door de eiwitsynthetiserende ribosomen van de cel om zo functioneel dystrofine te maken. Vanwege de gigantische omvang van het gen is het onmogelijk om het gen in zijn geheel toe te voegen. Daarom wordt veelal getracht om alleen de genetische code (bijna 14 duizend baseparen) in te brengen, wat kan door dit DNA simpelweg te injecteren als circulaire plasmidevector. Dit is echter nog erg inefficiënt na lokale toediening. De lage efficiëntie wordt veroorzaakt door het bindweefsel dat de individuele skeletspiervezels, bundels van vezels en de hele spier omgeven. Het plasmide blijft waarschijnlijk grotendeels plakken aan deze barrières. Er kunnen verschillende methodes worden toegepast om de efficiëntie na lokale injectie te verhogen, bijvoorbeeld elektroporatie of het gebruik van liposomen. Voor een behandeling van alle aangedane spieren is echter een systemische toediening (via de bloedbaan) nodig en dat is op dit moment nog niet haalbaar met plasmides.

Een andere manier om genetisch materiaal in levende cellen binnen te brengen is door gebruik te maken van virale vectoren. Dit zijn virusgenomen waarin alle ziekmakende genen zijn vervangen door de genetische code van een gen (in dit geval de genetische code voor dystrofine). Deze gemodificeerde virussen zetten zich vast aan het oppervlak van een levende cel en brengen hun genetisch materiaal (in dit geval het coderende deel van het *DMD*-gen) naar binnen. Het ontwikkelen van gentherapie voor Duchenne is ingewikkeld. Om te beginnen zijn spiervezels post-mitotisch, dat wil zeggen ze delen niet of nauwelijks, terwijl virussen bij voorkeur delende cellen infecteren. Ook is spierweefsel moeilijk te bereiken vanwege al genoemde bindweefselbarrières. Deze bevatten poriën waar alleen zeer kleine virussen doorheen passen. Er is echter een virus, het zogenaamde adeno-geassocieerde virus, dat bij voorkeur spiervezels infecteert en zo klein is dat het door de poriën in het bindweefsel past (4). Adeno-geassocieerde vectoren kunnen echter alleen genetisch materiaal transporteren dat niet groter is dan een derde van het totale coderende deel van dystrofine. Daarom is een micro-dystrofinen ontwikkeld. Dit is ongeveer 70% kleiner, omdat het coderende deel voor het centrale domein en het laatste C-terminale domein grotendeels zijn verwijderd. Het resulterende dystrofine-eiwit is deels functioneel in mdx-muizen (vergelijkbaar met Becker-dystrofines). Een mogelijke toekomstige gentherapie met dit micro-dystrofinen zal Duchenne-spierdystrofie niet volledig genezen, maar omzetten in een mildere vorm. Hoe dit micro-dystrofine functioneert in de mens moet nog worden onderzocht.

Genetische correctie met behulp van antisense oligonucleotiden (AONs)

Meer dan de helft van de Duchenne-patiënten heeft in zijn spieren een laag niveau dystrofine-positieve spiervezels. Vermoedelijk zijn deze zogenaamde 'revertant fibers' het gevolg van het skippen (overslaan) van één of meerdere exonen tijdens de splicing van het dystrofine-RNA. Wordt hierdoor het verstoorde open leesraam hersteld, dan kunnen kortere (interne deletie) Beckerachtige eiwitten worden gevormd. Het niveau van dit spontane herstel van het leesraam is te laag om een duidelijk effect te hebben, maar deze observatie heeft wel geleid tot het idee om het niveau van deze 'zelf-skippen' te verhogen door de pre-mRNA-splicing te beïnvloeden. Dit kan worden bewerkstelligd door kleine, synthetische stukjes RNA, zogenaamde antisense oligonucleotides (AONs). Deze plakken aan een specifiek stuk



Figuur 5 Exon skippen voor verschillende mutaties.

Het leesraam kan op verschillende manieren verstoord worden. De meeste patiënten hebben een deletie van één of meerdere exonen, bijvoorbeeld van exon 45 (bovenste paneel). Dit exon bevat 176 nucleotides (niet deelbaar door 3) en dus wordt het leesraam verstoord. Hierdoor worden er vanaf exon 46 verkeerde aminozuren ingebouwd en ontstaat er een stopcodon, zodat de translatie vroegtijdig wordt afgebroken en er een niet-functioneel dystrofine gemaakt wordt. Een deletie van exon 45 en 46 beslaat in totaal 324 nucleotides (deelbaar door 3) en zou het leesraam dus niet verstoren. Om het leesraam voor patiënten met een exon 45 deletie te herstellen, wordt daarom exon 46 tijdens de splicing afgeschermd met een antisense oligonucleotide (AON), zodat dit exon niet in het uiteindelijke boodschapper RNA terecht komt, maar wordt overgeslagen. Dit RNA kan worden vertaald naar een deels functioneel dystrofine-eiwit (dat in het centrale deel een stuk mist). Wanneer het leesraam is verstoord door een duplicatie van één exon (exon 45 in dit voorbeeld) kan het originele RNA worden hersteld door één van beide vertaalde exonen af te schermen. Hiervan kan dus ook een volledig normaal dystrofine-eiwit worden gemaakt. Echter, wanneer beide exonen worden overgeslagen leidt dit opnieuw tot een verstooring van het leesraam (exon 46 past niet op exon 44). Bij sommige Duchenne-patiënten is er een kleine mutatie aanwezig, die bijvoorbeeld een triplet dat normaliter codeert voor een aminozuur, verandert in een stopsignaal. Omdat exon 47 (voorbeeld derde paneel) uit 150 nucleotides (deelbaar door drie) is opgebouwd, kan dit exon ongestraft worden overgeslagen zonder dat het leesraam wordt verstoord. Op deze manier wordt de puntmutatie omzeild. Ligt de mutatie echter in een exon dat niet deelbaar is door 3 (bijvoorbeeld exon 43 (173 nucleotides) in het laatste paneel), dan moeten er twee exonen worden afgeschermd (in dit geval exon 43 en 44). Zo wordt de mutatie in exon 43 omzeild en wordt het leesraam niet verstoord.

binnen een exon, zodat dit exon wordt verstoort voor de splicing machinery en wordt overgeslagen. Daarmee kan het leesraam van de genetische code worden hersteld en de productie van een korter, maar grotendeels functioneel dystrofine worden aangezet in Duchenne-patiënten (figuur 5). Het voordeel van deze aanpak is dat AONs klein zijn en dus makkelijker de spiervezels kunnen bereiken. Omdat de splicing van het RNA wordt beïnvloed en

[vervolg op volgende pagina >](#)

geen nieuw DNA wordt ingebracht, valt deze therapie niet onder de gentherapie. In Leiden wordt sinds 1998 aan de AON-therapie gewerkt. De eerste positieve resultaten werden bereikt met een AON waarmee het skippen van exon 46 in het *DMD*-gen werd geïnduceerd (5). In gekweekte spiercellen van Duchenne-patiënten met een exon 45-deletie werd na behandeling met de exon 46 AON dit exon overgeslagen (geskipt). Dit leidde tot herstel van het verstoorde leesraam en een iets verkort, maar functioneel dystrofine (figuur 5, bovenste twee panelen). Op basis van de mildere ziekteverschijnselen bij Becker-patiënten met een exon 45-46 deletie, zou deze vorm van therapie het ziektebeeld aanzienlijk begunstigen. Vervolgens is in gekweekte cellen van meerdere patiënten aangetoond dat deze aanpak breder toepasbaar is voor andere deleties, puntmutaties en kleine duplicaties (figuur 5) (6,7). Het beoogde exon werd na AON-behandeling telkens geskipt, wat leidde tot de productie van deels functioneel dystrofine in minimaal 75% van de behandelde spiercellen. Bij duplicaties van één enkel exon leidt het skippen van of het originele of het geduplicateerde exon tot herstel van normaal dystrofine (figuur 5 derde paneel) (7). Bij veel mutaties is het skippen van één enkel exon genoeg om het leesraam te herstellen en de productie van deels-functionele dystrofines te induceren. Een uitzondering is een puntmutatie die leidt tot een vroegtijdige translatiestop en gelokaliseerd is in een exon waarvan de lengte niet deelbaar is door drie (figuur 5 onderste paneel). Het skippen van dit exon zal de stopmutatie omzeilen, maar zelf het leesraam verstoren. Door ook een aangrenzend exon te skippen kan het leesraam weer worden hersteld. Ook is er een kleine groep deleties waarbij twee exonen geskipt dienen te worden om het leesraam te herstellen. Dit zogeheten 'dubbel exon skippen' is mogelijk door een menselijk toe te dienen van AONs gericht tegen twee verschillende exonen (8). Dit is bijna net zo efficiënt als het skippen van een enkel exon: 70% van de behandelde cellen werden dystrofine-positief. In theorie kan exon skippen toegepast worden voor de meerderheid van de Duchenne-patiënten. Uitzonderingen zijn mutaties die zich bevinden tussen exon 64 en exon 70, want dit gedeelte codeert voor het cysteïne-rijke gebied en is essentieel voor de eiwitfunctie. Ook grote deleties waardoor zowel het actine-bindende deel en het merendeel van het centrale domein, of deleties in het eerste of laatste exon zijn niet te behandelen door middel van exon skippen. Deze mutaties komen niet vaak voor (minder dan 10% van de mutaties). Theoretisch is exon skippen daarom toepasbaar voor meer dan 90% van de Duchenne-patiënten. In principe is het nadeel van deze vorm van therapie dat er veel verschillende Duchenne-mutaties zijn, waarvoor verschillende exonen geskipt moeten worden om het leesraam te herstellen. In de praktijk komen *DMD*-deleties echter voornamelijk voor in twee gebieden van het gen, namelijk tussen exon 45 en exon 53 (70% van de deleties) en tussen exon 2 en exon 20 (23% van de deleties). Daarom kan door een strategische keuze van 10 exonen meer dan 50% van alle patiënten geholpen worden. Het beste individuele voorbeeld is het skippen van exon 51, wat toepasbaar zou zijn voor bijna 25% van de patiënten met een deletie, of voor 16% van alle Duchenne-patiënten. Overigens hebben we inmiddels AONs ontwikkeld om 39 van de 79 exonen in het *DMD*-gen skippen.

Exon skippen 'in vivo'

Resultaten die werden verkregen in *mdx*-muizen bevestigden dat deze therapie veelbelovend is. De *mdx*-muis heeft een nonsense puntmutatie in exon 23, waarvan de lengte (213) deelbaar is door drie. Dus door het skippen van exon 23 wordt de mutatie verwijderd, terwijl het leesraam behouden blijft (zie figuur 5, een na laatste paneel). Lokale intramusculaire injecties met een AON gericht tegen dit exon leidde in behandelde spieren tot een dystrofinehoeveelheid van 20% en een verbetering in

spierhistologie en spierfunctie (9). Western blot-analyse liet zien dat het dystrofine tenminste drie maanden na een intramusculaire injectie aanwezig was. Naar aanleiding van deze positieve resultaten verkregen in dystrofische muizen was de volgende stap om de AON te testen in Duchenne-patiënten. In samenwerking met het bedrijf Prosensa B.V. en de Afdeling Neurologie van het LUMC is een klinische studie opgezet om het lokale effect van een AON te bestuderen in de spieren van de patiënten en om eventueel mogelijke neveneffecten van de AON waar te nemen. Vier *DMD*-patiënten kregen een lokale intramusculaire injectie toegediend met een AON voor exon 51. Een maand na deze injectie werd een spierbiopsie genomen. De resultaten waren opnieuw veelbelovend en er werden geen negatieve neveneffecten van de injectie waargenomen.

Toekomst

Om exon skippen daadwerkelijk als therapie in patiënten toe te passen moet de toediening geoptimaliseerd worden om te zorgen dat genoeg AON door de spieren wordt opgenomen. Het lichaam bestaat voor 40% uit spierweefsel, dus lokale injectie van alle spieren is ondoenlijk, mede omdat sommige spieren moeilijk te bereiken zijn (bijvoorbeeld het hart en het middenrif). Om zoveel mogelijk spierweefsel te bereiken, zal uiteindelijk aan een systemische toediening moeten worden gedacht (10). Dit is gecompliceerd, omdat de lever en nieren gespecialiseerd zijn in het opruimen van vreemde stoffen uit de bloedcirculatie. Daarom wordt het toedienen van AONs via de bloedbaan geoptimaliseerd in *mdx*-muizen in voorbereiding van een nieuwe klinische studie waarbij ook bij patiënten AONs systemisch zullen worden toegediend. Tegelijkertijd wordt gezocht naar een molecuul dat specifiek naar de spiercellen gaat, waardoor er minder AON door de lever en/of nieren wordt afgevoerd. Ook word door de chemische verbindingen van het AON zelf aan te passen geprobeerd het molecuul nog stabiel en veiliger te maken. Dit onderzoek kan nog enkele jaren duren. Uiteindelijk is de hoop dat met deze therapie de voortgang van de ziekte in Duchenne-patiënten vertraagd of zelfs gestopt kan worden.

Literatuur

Suggesties voor verder lezen: referenties 4, 5 en 7)

- 1 Emery, AE e.a.: The Muscular Dystrophies. *Lancet* 2002, 359, 687-695.
- 2 Koenig, M e.a.: The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* 1988, 53, 219-226.
- 3 Aartsma-Rus, A e.a.: Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule. *Muscle Nerve* 2006, 34, 135-144.
- 4 Van Deutekom, JCT e.a.: Advances in Duchenne muscular dystrophy gene therapy. *Nat Rev Genet* 2003, 4, 774-783.
- 5 Van Deutekom, JCT e.a.: Antisense-induced exon skipping restores dystrophin expression in *DMD* patient derived muscle cells. *Hum Mol Genet* 2001, 10, 1574-1554.
- 6 Aartsma-Rus A e.a.: Therapeutic antisense-induced exon skipping in cultured muscle cells from six different *DMD* patients. *Hum Mol Genet* 2003, 12, 907-914.
- 7 Aartsma-Rus A e.a.: Antisense-induced exon skipping for duplications in Duchenne muscular dystrophy. *BMC Med Genet* 2007, 8, 43.
- 8 Aartsma-Rus A e.a.: Antisense-induced multiexon skipping for Duchenne muscular dystrophy makes more sense. *Am J Hum Genet* 2004, 74, 83-92.
- 9 Lu QL e.a.: Functional amounts of dystrophin produced by skipping the mutated exon in the *mdx* dystrophic mouse. *Nad Med* 2003, 8, 1009-1014.
- 10 Alter J e.a.: Systemic delivery of morpholino oligonucleotide restores dystrophin expression bodywide and improves dystrophic pathology. *Nat Med* 2006, 2, 175-177.

De auteurs

Christa de Winter heeft Biologie & Medisch Laboratoriumonderzoek gestudeerd aan de Hogeschool Rotterdam. Sinds 2003 is zij als onderzoeksanalist werkzaam bij de afdeling Humane Genetica, onderdeel van het Leids Universitair Medisch Centrum.

Annemieke Aartsma-Rus heeft Biomedische Wetenschappen gestudeerd aan de Universiteit Leiden. In 2005 is zij gepromoveerd op de ontwikkeling van de exon skip-therapie bij de afdeling Humane Genetica van het Leids Universitair Medisch Centrum. Sindsdien zet zij als postdoc-onderzoeker dit werk voort bij dezelfde afdeling.