

Duchennova Svalová dystrofie (DMD)

Exon skipping změnil Duchenneovu svalovou dystrofii v daleko mírnější Beckerovu

Interview s profesorem Stephen D. Wiltonem

Profesor Wilton je šéfem skupiny Experimentální molekulární medicíny v Centru pro nervosvalové a neurologické nemoci na University of Western Australia ve městě Nedlands near Perth. 16.7.2006 po výroční konferenci PPMD v Cincinnati/Ohio, která proběhla ve dnech 13 - 16. července 2006, profesor Wilton odpovídal na otázky Guentera Schuerbrandta, PhD (*otázky psány italikou*) o metodě exon skipping, nejpokročilejší metodu léčby Duchenneovy svalové dystrofie. .

Exon skipping – klinické pokusy začínají

Exon skipping je technika, která vyvolává syntézu bílkoviny ignorováním části genetického kódu dystrofínového genu takže dochází k produkci dystrofínu kratšího než je normální čímž mění rychle postupující Duchenneovu svalovou dystrofii v daleko pomaleji postupující Beckerovu. Tímto potenciálním lékem jsou antisense oligonukleotidy, zkráceně AONy nebo taky oligo. Během důležitého setkání v Cincinnati byly diskutovány detaily této techniky, které nebudeme v tomto interview opakovat.

Na začátek můžete, prosím, vysvětlit rodinám s chlapci s DMD co velmi slibné výsledky výzkumu znamenají pro ty, kteří zoufale čekají na léčbu této hrozné choroby.

Nepoužíval bych slova léčba, exon skipping nikdy DMD nevyлéčí. V nejlepším případě budeme schopni zredukovat závažnost choroby, v některých případech výrazně.

Raději bych byl opatrně optimistický a řekl že pokud budeme schopni nemoc ovlivnit pomocí metody exon skipping bude to středně silně.

Hovořím o metodě exon skipping s rodiči docela často. Také jim to vysvětluji a vždy dodávám, že AONy byly odzkoušeny pouze na zvířatech takže nikdo teď nemůže říct jestli to bude fungovat i u chlapců. Pak dodávám, že klinické testy na chlapcích s DMD právě teď probíhají, ty nám ukáží jestli metoda exon skipping bude fungovat na dětech nebo ne.

Právě to je důvod proč jsem na tomto setkání vždy říkal, že naše laboratoř byla schopna vyvolat přeskočení všech exonů kromě exonu 1 a 79. Všechny exony od 2 do 78 dokážeme přskočit. Mnoho exonů dokážeme snadno odstranit, některé vzdorují, ale vyvíjíme metodu zvládající i tyto obtížné exony.

Naše klinické pokusy musí být prováděny pomalu, krok za krokem, na neštěstí pro rodiče, kteří potřebují léčbu nyní. Důležité je, že jakmile je jeden krok zvládnut pokračujeme ihned dalším. Nepředpokládáme velké bezpečnostní problémy v nynějších klinických testech protože je léčen pouze jeden sval a poté odebrán vzorek pro analýzu. Větší riziko bude až testy pokročí do fáze systematické léčby celého těla pomocí daleko větších dávek AONů, zde nelze vyloučit nepředvídatelné vedlejší efekty.

Nikdo neví jak dlouho dystrofín vydrží po dvou nebo čtyřech týdnech první léčby. V návrhu britského pokusu bude od prvního do čtvrtého týdne každý týden odebrán vzorek z příslušného svalu a otestován molekulárními

metodami na přítomnost dystrofínu. To bude důkaz toho, že exon skipping funguje u lidí.

Myslím, že teď nikdo nebude experimentovat s dávkováním nebo dobou podávání, opravdovým důkazem bude systematická léčba celého těla, která ukáže jestli exon skipping opravdu funguje i ve všech lidských svalech. A to bude velmi obtížné protože netušíme kolik AONů bude potřeba a jak často je bude potřeba podávat.

Francesco Muntoni, který povede britské testy, jednou řekl: „Pronásleduje mne noční můra: Jak stanovíme správné dávkování. Za deset let budeme diskutovat stále ty samé problémy, které se teď řeší u léčby steroidy : podávat obden, nebo deset dní ano, deset ne, nebo podle toho odkud momentálně fouká!“ A to máme jen dva podobné steroidy, a dosud ani nevíme jak vlastně fungují.

U metody exon skipping budeme mít různé typy AONů pro různé pacienty s různými mutacemi. Bude to velmi náročný výzkum. Ale možná jsem zde příliš pesimistický.

Holandští vědci z Leidenu právě zkouší vynechání exonů 51 a 46. Zkoušky budou rozšiřovat na další exony. Budou muset pokaždé procházet zdlouhavou schvalovací procedurou?

Budou muset mít pokaždé nové schválení protože technicky každý AON je nový lék. Ale doufáme v to, že AONy pro první pokusy jsou vhodně vybrané vzorky a že u dalších bude možno zkrátit schvalovací proceduru, samozřejmě pokud se všechny budou chovat podobně a nebudou mít nějaké vedlejší negativní účinky.

My pracujeme na modifikovaných AONech s trochu jiným chemickým složením, které se nazývá *morfolino*. Tento typ sloučeniny byl již testován na lidech jako potenciální antibiotikum. Morfolína prokázaly, že jsou bezpečné, a protože nejsou v těle odbourávány zdají se být perfektně stabilní. S morfoliny byly provedeny již rozsáhlé testy a proto nebudou vyžadovat tak rozsáhlé klinické testování jako jiné typy OANů, například Holanďané používají oligo stabilizované pomocí 2O-methyl-thioate, které ještě na lidech nebylo odzkoušeno.

Morfolino má úplně odlišnou, nepřirozenou konstrukci takže nehrozí, že bude zabudováno do genomu. To co děláme není ani tak genová terapie jako spíš modifikace genové genového produktu.

Jestliže se ukáže, že prvních pár morfolin jsou bezpečné léky na svalovou dystrofii, doufám, že lidé, kteří mají na starosti lékovou regulaci, vezmou do úvahy předchozí zkušenosti a trochu zjednoduší směrnice co a jak má být uděláno pro ověření nových olig. Kdybychom museli dělat rozsáhlé testy pro všechna oligo tak bychom to rovnou děl

mohli zastavit, bylo by prakticky nemožné to provést a nebyli bychom schopni léčit mnoho různých mutací způsobujících Duchenneovu svalovou dystrofii.

V současnosti firma AVI Biopharma z Portlandu v Oregonu vyvíjí morfolinová oliga jako látky účinné proti virům, které by byly určeny pro stovky tisíc lidí. A protože jde o léky určené pro běžnou populaci musí mít rozsáhlé bezpečnostní testy tak, aby bylo jisté, že ani 0.1% z nich nebude mít neočekávané nebo nepředvídatelné negativní reakce. Naproti tomu naše Duchenneovská oliga nebudou podávána tisícům lidí ale spíš velmi specifickým případům DMD. Takže pokud se vyskytne problémový případ, k čemuž doufáme že nedojde, mohlo by to postihnout jen jednoho nebo dva chlapce, a protože pacienti budou velmi pečlivě sledováni během léčby všechny negativní reakce by měly být zjištěny velmi rychle a měly by být okamžitě učiněny potřebné kroky.

Stále se můžou vyskytnout různé účinky pro různé nukleotidové sekvence olig. Musíme si být vědomi tohoto rizika. Toto je otázka zvážení potenciálních vedlejších negativních účinků a možného zisku. Dokonce i kdyby se vyskytly nějaké vedlejší účinky u morfolin zaměřených na některé mutace, zisk z obnovení tvorby určitého množství dystrofinu by mohl převážit toto riziko. Steroidy mají mnoho vedlejších účinků a přesto jsou akceptovány jako nejlepší léčba.

Na tomto setkání Dominic Wells ukázal, že když injikoval AONy přímo do svalů myši dosáhl velmi dobrých výsledků ve vynechávání potřebných exonů na RNA úrovni ještě po 14ti dnech. To znamená, že morfolina vyvolávají přeskočení exonů ještě nejméně po 14ti dnech. A samotná bílkovina bude daleko stabilnější než RNA. To znamená, že po 14ti dnech byste mohli dostat spoustu dystrofinu, který by mohl vydržet až 26 týdnů, to je 6 měsíců! Nikdy jsem nepředpokládal, že by účinky mohly být tak dlouhodobé. Funguje to lépe než se očekávalo. A jestliže se vyskytnou vedlejší účinky poté co chlapec dostane morfolino doufáme, že se najdou cesty jak to dostat pod kontrolu. V takovém případě bude mít chlapec asi nepříjemný jeden týden a pak bude do další léčby, tj. 6 měsíců v pohodě. A zase musíme zjistit jestli léčba dvakrát ročně bude postačující. Můžeme to přirovnat k chemoterapii nebo radioterapii při léčbě rakoviny. I ty mají závažné vedlejší efekty. A přesto jsou akceptovány protože nic jiného prostě není.

Dva typy antisense oligonukleotidů

Holandané zkouší svou verzi oliga (2O-methyl-phosphothioates) pro přeskočení exonu 51, vy a Britové budete testovat morfolino. Budete spolupracovat? A jaký je důvod toho, že Holandané pracují s jejich odlišným typem oligonukleotidu?

Holandané se zaměřili na řadu různých exonů, Angličané provedli porovnání různých AONů a zjistili, že sloučeniny, které jsme vyvinuli, fungují velmi dobře, obzvláště morfolino, a proto se rozhodli jej použít v jejich klinických testech, které jsou stále ve fázi plánování. Zkusí také přeskočení exonu 51 a to z důvodu mít paralelní studii k Holandským testům. Takže budou moci porovnat AONy s různým chemickým složením a porovnat účinnost různých

typů léčby. To by nemohlo být provedeno kdyby zkoušeli vynechání jiného exonu. Takže pokud oba typy AONů budou bezpečné, práce na obou budou pokračovat. Doufejme, že oba budou mít podobné výsledky.

Nikdo fakticky neví co se může stát při dlouhodobém vystavení organismu různým AONům. Vycházíme z toho, že konkurence je zdravá a že nejsou „všechna vejce v jednom koši“. Jestliže obě metody jsou nadějně musíme pokračovat v obou.

A opět, pokud se něco stane po třech letech léčby morfolinem vrátíme se zpět k 2O-methylu. Pokud ale nebudeme mít nic než jen morfolino tak budeme mít problém. Proto kromě morfolina a 2O-methylu pracujeme i s dalšími typy AONů s jiným chemickým složením.

První experimenty s exon skipping

Čí je metoda exon skipping nápad?

Myslím, že to bylo vyvinuto současně na několika různých místech. Pracoval jsem na revertantních vláknkách s dystrofinem, která se spontánně vyskytují v dystrofických svalech u některých chlapců s DMD, a zkoušel jsem zjistit jaký mechanismus to způsobuje. A bylo mi jasné, že je to mechanismus umožňující přeskočit vhodný exon. Bylo to přibližně v roce 1994 kdy jsme objevili funkční mRNA pro zkrácený dystrofin. Později, v roce 1996 jsem na mítinku v Lake Tahoe potkal Ryszarda Kole z University Severní Karolíny. Hovořil tam o potlačení abnormální sestřihu v β -globinovém genu jako terapii pro thalassemiu. Pokud vím byl prvním člověkem, který modifikoval expresi genu modifikací sestřihu. Později jsem Ryszardem několikrát hovořil a při jednom takovém rozhovoru mi to došlo, bylo to jako blesk z čistého nebe. Bylo jasné, že to právě takhle funguje. Jestliže je možno použít pro potlačení abnormálního sestřihu proč nezkusit stejný postup pro normální sestřih? Pár týdnů po návratu do Perthu jsem obdržel nějaká oliga od Ryszarda. Měli jsme jen pár nepříliš dobrých kultur svalových vláken přesto jsme ihned udělali pár pokusů a pomocí jednoho z Ryszardových olig dosáhli prvního přeskočení exonu.

Takže jste byl první kdo aplikoval tuto techniku u svalové dystrofie?

Svým způsobem ano, přinejmenším to byl první pokus odstranit mutaci na dystrofinové mRNA způsobující chorobu. Myslím ale, že Masafumi Matsuo z Kobe v Japonsku byl první, kdo aplikoval AONy na transkript dystrofinového genu. Udělal to dříve, ale tehdy jsem to nevěděl. On ale fakticky vyvolával „Kobe“ mutaci, delecí exonu 19 na normálním dystrofinovém transkriptu. Byl pravděpodobně prvním člověkem, který provedl přeskočení exonu na dystrofinovém genu.

Nedávno léčil chlapce s DMD s delecí exonu 20 nitrožilní injekcí speciálního DNA oliga zaměřeného na exon 19. Podle posledních informací u tohoto chlapce bylo nalezeno 6% normálního množství dystrofinové mRNA a také nějaký dystrofin. Podle dat, která jsem viděl, to ale nebylo přesvědčivé. Aspoň však dokázal, že systematický exon skipping je u chlapců s DMD možný bez nebezpečných vedlejších účinků.

Myslím, že hlavní problém zde byl výběr DNA oliga,

keré, pokud tomu správně rozumím, reaguje s RNA tak, že mRNA je zničena enzymem nazývaným RNaseH. Byl to závod mezi exon skipping mechanismem a mRNA degradací pomocí RNaseH. Zopakovali jsme Matsuův pokus na myších a zjistili, že funguje jen pro některé cíle (myšleny další exony, resp jejich okraje, které se účastní mechanismu "slepování" exonů), nikoliv pro všechny. Pak jsme zkusili obyčejné 2O-methyl oligo se stejnou sekvencí pro stejný exon 19, to bylo 30x až 40x efektivnější. Je to způsobeno tím, že 2O-methyl oligo je stabilní oligo, které pronikne do buněk a vyvolá přeskočení exonu ale nespouští RNaseH mechanismus.

Kdy bude terapie na principu exon skipping?

Dystrofinový gen byl nalezen před dvaceti lety. Všichni byli nadšeni, že příští rok bychom mohli mít lék. Co můžeme říct rodičům, kteří vidí jak rychle běží čas jejich chlapců? Před dvěma mi Gertjan van Ommen z Leidenské university v interview řekl, že to bude trvat tak deset let než exon skipping bude použitelné u chlapců. Dva roky uběhly takže zbývá ještě osm. Ptal jsem se rodičů jestli opravdu chtějí vědět kdy bude metoda exon skipping použitelná, jejich odpověď byla „Ano, chceme to vědět a chápeme, že takovéto odhady nemohou být přené, že to neznamená, že přesně v lednu 2014 bude něco co pomůže jejich synovi. Jaká je teď situace Jak dlouho si myslíte, že to bude trvat?

Ano, toto je hodně těžké. Toto je šestý rok, kdy jsem na mítinku Parent Projektu. Bohužel, každý rok zde potkám nové lidi a každý rok někteří chybí a už nikdy nepřijdou. Ale my musíme pokračovat pomalu, opatrně, krok za krokem tak, abychom se vyhlí chybám, které by čekání ještě prodloužily.

Jsem optimistický v jedné věci – pokud budou první klinické testy provedeny pečlivě a bezpečně potom budou velmi rychle následovat další. Nové testy budou zahrnovat nové cíle, které umožní přeskočení dalších exonů a léčení dalších mutací. Odpadne dlouholeté čekání na výsledky a jejich analýza. Jakmile dostaneme pozitivní výsledky v jednom pokuse ihned začneme další.

Jedna z cest jak urychlit vývoj je místo vystřihávání jednotlivých exonů zkusit dva nebo dokonce víc naráz, udělat multi-exon skipping. Proč neudělat koktejl z olig pro vysatření několika exonů naráz. Už jsme udělali pokus na kultuře svalových buněk se směsí olig pro odstranění exonů 50, 51, 52 a 53 naráz a funguje to dobře. Jiný koktejl, který jsme zhotovili, je zaměřen na exony 6, 7, 8 což jsou exony, které je potřeba odstranit u dystrofických psů. Takže to můžeme odzkoušet na psech před tím než to vyzkoušíme na lidech. Tyto koktejly mohou léčit několik různých typů mutací. Další výhodou použití koktejlů je, že je možno dělat bezpečnostní testy tří nebo i více olig naráz. Toto by mělo výrazně urychlit výzkum.

Takže jak to teď vypadá Gertjanův odhad je docela realistický, možná ten čas bude i kratší, do pěti, šesti let bychom mohli léčit první chlapce s dobrými výsledky.

Když hovořím s rodiči často slyším: „Proč DMD potkalo zrovna nás? Co je příčinou“. Odpovídám: „Příčinou jsou mutace, ty se objevují náhodně, nelze je předvídat.“ Mutace jsou pouze nástroje evoluce. Kdyby nebyly mutace

nebyli bychom zde ani my, nebyl by život na zemi, možná jen nějaký sliz. Ale evoluce dělá i vědce jako vy, kteří se tyto chyby evoluce snaží napravit, opravit vadný gen, vyřešit problém nalezením terapie.

To je zajímavý pohled na věc. Je pravda, že bez evoluce bychom nevznikli. Každý z nás je jiný, každý z nás má pravděpodobně trochu jiný dystrofinový gen. V některých případech dochází ke změně jednotlivých bází a vzniku jiné aminokyseliny, ale pokud to není zrovna velmi důležitá aminokyselina nejsou tyto změny důležité. Každý dystrofinový gen je trochu jiný, genetická odlišnost je i u jiných genů a také u genů kontrolujících tvorbu bílkovin z jiných genů. Jsme prostě velmi složitá genetická zařízení což je i důvod proč různí pacienti s DMD mají různé symptomy.

Výroba oligonukleotidů.

Kdo vlastně vyrábí oligonukleotidy? Pravděpodobně se vyrábí automatizovaně, ne?

První 2O-methyl oligo jsem si udělal sám za pomoci zařízení, které máme v laboratoři. Zadal jsem AONovou sekvenci, naplnil jej potřebnými chemikáliemi a strávil mnoho bezesných nocí sledováním syntézy AONů. Použité chemikálie jsou velmi drahé a já nenávidím zbytečné plýtvání takže jsem syntetizér udržoval v chodu jakmile byl jednou naplněn chemikáliemi. Dnes už existuje spousta firem, které umí oliga vyrobit ale já preferuji kontrolu nad celým procesem. Také jsem se tím naučil víc o používaných chemikáliích. Jakmile jsme zoptimalizovali naše 2O-methyl oliga na buněčných kulturách zkontaktovali jsme se s firmou AVI Biopharma v Oregonu, která pro nás teď dělá morfolina. Úzce s námi spolupracují, velmi nás podpořili a dobře se nám s nimi dělá. A co je nejdůležitější jsou schopni vyrobit morfolina v kvalitě potřebné pro klinické zkoušky.

Jak budou oliga drahá až budou použitelná pro chlapce?

Budou drahá, ale ne tak jako produkce virů pro genovou náhradu. Exon skipping bude mnohonásobně levnější. Výrobní cena olig bude značná, a to ještě budeme potřebovat spoustu různých sekvencí. Pokud ale budeme schopni vytvořit oliga velmi účinná i v malém množství, která můžete podávat v malých dávkách a ještě budou mít dostatečný terapeutický účinek, tak pak lék nemusí být tak moc drahý.

Včasná diagnóza bude důležitá.

Jestliže exon skipping nebo nějaká jiná technika bude fungovat neměla by být použita dříve než svaly zmizí? Stále mám funkční laboratoř pro screening, ale pomalu odumírá. Přál bych si nalézt investora, který by mohl počkat 5 let než bude chtít zpět své peníze, a většinu jich utratit na podporu zjišťování svalové dystrofie u novorozenců. Ve spojených státech právě probíhá takovýto pilotní program v Atlantě a v Columbusu ve státě Ohio.

Včasná diagnóza bude důležitá. A možná, když metoda exon skipping bude fungovat a bude bezpečná, potom po včasné diagnóze můžete začít léčbu dřív než se objeví první příznaky. To by mohl být velký rozdíl ve

výsledku léčby. Takže si myslím, že novorozenecká kontrola na svalové dystrofie je dobrá idea a měla by být prováděna všude.

Takže je naděje?

Na závěr interview mohl byste říct rodičům něco povzbudivého po mítku v Cincinnati?

Nejříve mi dovoďte jedno překvapení: Pokrok s morfoliny za poslední rok byl ohromující, získali jsme lepší výsledky než jsme očekávali. Jsme optimisté a očekáváme, že budou fungovat daleko, daleko lépe než jsme ještě nedávno předpokládali. Na začátku naší práce jsme zjistili, že morfolino nefunguje dobře na buněčných kulturách. A když jsme začali pracovat na myších s in-vivo injekcemi dělali jsme spoustu šílených triků, abychom dostali morfolina do svalů. V principu to fungovalo, pak jsme ale zkusili jistý druh negativní kontroly, morfolino pouze v solném roztoku, jen 0.9% běžný solný roztok, a ono to fungovalo bezvadně bez jakéhokoliv nosiče na zlepšení dopravy morfolinu do svalů. Jen čisté morfolino v solném roztoku, ten nejjednodušší způsob jak morfolino podávat fungoval velmi, velmi efektivně. A pak lidé z AVI Biopharma připojili kousek nějakého peptidu pro ještě lepší účinnost a ono to fungovalo na myších ještě lépe. Nyní to musíme odzkoušet na lidech. Lidé z AVI, kteří dělají morfolina, jsou velmi akční a novátorští. Vytváří nové

chemikálie, nové modifikace a je báječné s nimi spolupracovat. Takže morfolina jsou to nejlepší v tento okamžik. I já doufám, že tito lidé přijdou v budoucnu s něčím ještě lepším.

Ale abychom to ukončili. Chci říct, že tento mítink Parent Projektu byl velmi pozitivní. V tomto okamžiku je zkoumána řada různých metod pro svalovou dystrofii. Existují nadějně pokusy s genovou náhradou, obcházením nonsense mutací, běží dva pokusy s metodou exon skipping, pracuje se na myostatinech, steroidy se zkoumají velmi podrobně. To nám dává důvod k naději.

Ale nikdy to nejde dostatečně rychle. Přál bych si, abychom měli léčbu už včera. Kdosi mi kdysi řekl: „Vyleč svalovou dystrofii a jdi do důchodu.“ Je mi teď 50 let a myslím, že na tomto poli budu pracovat ještě dlouho. Ale jestli můžeme něco významného udělat brzo je to exon skipping. Získá to čas než bude něco ještě lepšího nebo přijde něco trvalého. Exon skipping není perfektní léčba. Ale je to to nejlepší co můžeme udělat nyní.

Velmi Vám děkuji, opravdu jménem lidí z celého světa, kteří budou číst toto interview, jménem chlapců s DMD, jejich rodičů a příbuzných, lékařů a všech, kteří se starají o děti s DMD, vědeckých pracovníků v této oblasti a vlivných lidí, kteří jsou schopni změnit některé věci tak, abyste Vy a Vaši kolegové měli finance a příležitost dosáhnout co nejdříve cíle – léčby Duchenneovy svalové dystrofie.

Vysvětlení některých vědeckých faktů

Geny jsou funkční jednotky genetického materiálu **deoxyribonukleové kyseliny, DNA**. Její struktura vypadá jako zkroucený žebřík, *dvojitá spirála*. Příčky tohoto žebříku jsou tvořeny ze čtyř typů malých molekul, **bází: adenin, guanin, thymin a cytosin** (zkráceně A, G, T, C). Z prostorových důvodů příčky mohou obsahovat jen dva typy kombinací bází, **bázové páry** A-T a G-C. Proto **sekvence bází** na jednom vlákně jsou *komplementárním* doplňkem druhého vlákna.

Většina genů nese instrukci pro tvorbu **bílkovin**. V jádře buňky dochází k využití genetické informace - **expresi**, to znamená kopírování a přepisu do jiné genetické substance: **pre-mRNA**, což je kopie nazývaná **transkript**. Většina genů obsahuje aktivní oblasti nazývané **exony**, které obsahují informace o bílkovinách, a neaktivní oblasti - **introny**, které jsou obvykle podstatně delší a které mohou být důležité pro genovou expresi. Po transkripci jsou introny odstraněny z pre-mRNA a samotné exony jsou poslepovány do **mRNA**, ta se potom přesune ven z jádra buňky k **ribozomům**, což jsou struktury syntetizující proteiny. Ribonukleové kyseliny, **RNA**, používají místo thyminu *uracil* (U).

V mRNA tři následné báze zvané **kodon** nebo **triplet** specifikují jednu aminokyselinu podle jejího genetického kódu. Tři ze 64 kodonů UAA, UAG a UGA jsou **stop kodony** – místa kde se ukončuje syntéza bílkovin. Kodony navazují jeden na druhý, není mezi nimi žádné místo. V ribozomech se genetická informace z mRNA dekóduje a využívá k tvorbě bílkovin, které se skládají z dvaceti různých stavebních bloků – **aminokyselin**. DMD a BMD jsou způsobeny **mutací** genu pro **dystrofin**. Gen je umístěn na X

chromozomu, obsahuje 2.220.223 **nukleotidů** což jsou něco jako **genetická písmena**. Gen pro dystrofin je daleko největší gen v lidském těle. Přitom jen 11.058 nukleotidů, tj. pouze 0,5% , z nich je obsaženo v exonech a kóduje 3.685 aminokyselin.

Svalové buňky potřebují dystrofin pro mechanickou stabilitu. Je umístěn na vnitřní straně membrány svalové buňky a zakotven do ní pomocí mnoha dalších bílkovin, které tvoří **dystrofin-glykoproteinový komplex**.

Existují tři typy mutací: **delece**, kde chybí jeden nebo více exonů, **duplikace**, kde část genu je zopakována, a **bodové mutace**, kde jedna báze je nahrazena jinou, vynechána nebo přidána. V ribozomech jsou třípísmenné kodony čteny jeden za druhým bez přerušení, jestliže mutace odstraní nebo přidá celý kodon **čtecí rámeček** není přerušen. V tomto případě čtení zůstává **v rámci** a dystrofin je vyrobený o něco delší nebo kratší než normálně. Jestliže takovéto změny ovlivní strukturu, které nejsou podstatné, dystrofin může být stále částečně funkční. Pak vzniká benigní forma **Beckerova svalová dystrofie**.

Jestliže ale mutace posune čtecí rámeček o jednu nebo dvě báze dochází ke čtení **mimo rámeček**. Potom se vytváří bílkovina, která je od místa mutace složená z mnoha nesprávných aminokyselin a čtení je obvykle zakončeno nově vzniklým **přecházním stop kodonem**. Nekompletní a poškozený dystrofin pak nemůže vykonávat svou normální funkci, je buněčnými mechanismy odstraněn a vzniká Duchenneova svalová dystrofie. **Slepovací místa** (splice sites) jsou specifické oblasti exonů na hranicích s introny a jsou nutné pro správné odstranění nekódujících částí genu,

intronů, z pre-mRNA. Slepování samotné je provedeno **spliceozomy** což jsou komplexy malých RNA a bílkovin.

Technika **exon skipping** mění DMD na BMD. Jestliže mutace přeruší čtecí rámec a tím způsobí DMD může být navracena zpět do čtecího rámce umělým odstraněním jednoho nebo více exonů z mRNA před nebo za delecí, inzercí nebo bodovou mutací.

Exon se odstraňuje z mRNA pomocí **antisense oligonukleotidů**, AONů. AONy jsou krátké kousky RNA obsahující asi 20 nukleotidů konstruované tak, aby jejich sekvence byly schopny se samy přichytit na komplementárních sekvencích v exonech, které mají být odebrány, a *nikde jinde*. AONy tedy interferují se spojovacím mechanismem (splicing machinery) tak, aby **cílové exony** nebyly součástí mRNA, tedy byly přeskočeny (skipped).

Gen samotný ani jeho mutace nejsou metodou exon skipping ovlivněni, ale jeho produkt mRNA neobsahuje informaci odstraněného exonu nebo exonů. Protože tato mRNA je kratší než normální, dystrofin samotný je také kratší, obsahuje méně aminokyselin. Jestliže se chybějící aminokyseliny vyskytují v oblastech které nejsou klíčové pro funkčnost dystrofinu, jako je třeba středová oblast nazývaná *rod domain*, výsledná bílkovina může stále vykonávat svou stabilizační úlohu ve svalové membráně. To by mělo změnit DMD na mnohem mírnější BMD.

Poznámka pro ty, kdo se trochu učili chemii na škole: **Oligonukleotidy** jsou krátké kousky jednoho ze dvou druhů nukleových kyselin: DNA nebo RNA (oligo znamená malý).

Dvě vlákna DNA jsou tvořena řetězcem střídajících se jednotek z fosfátu a deoxyriboz a tvoří kostru (backbone) DNA. Deoxyriboza je molekula cukru s pěti atomy uhlíku, kde u druhého uhlíku chybí atom kyslíku. Každá jednotka cukru nese jednu ze čtyř genetických bází na prvním atomu uhlíku. RNA, ribonukleová kyselina, má normální ribozovou jednotku s atomem kyslíku na druhém uhlíku. Nukleotidy jsou stavební bloky obou druhů nukleových kyselin. Každý nukleotid je tvořen jednou ribozou, jednouází a jedním fosfátem. Takže existují 4 různé **ribonukleotidy** a 4 různé **deoxyribonukleotidy**. Oligo diskutovaná v v interview jsou **antisense oligoribonukleotidy**, AONs. Antisense znamená, že jejich bázevá sekvence je doplňkem ke specifické cílové sekvenci spojovací oblasti v pre-mRNA.

Dva druhy olig neboli AONů použité pro přeskočení exonů jsou chráněny oligoribonukleotidy takže nejsou ničeny enzymy svalových buněk. Holanďané používají **2O-methyl-phosphothioate**, zkráceně **2O-methyl**. 2O-methyl obsahuje metylovou skupinu, tj. uhlík se třemi atomy vodíku na atomu kyslíku druhého atomu uhlíku v ribozové jednotce a atom síry místo jednoho z atomů kyslíku na fosfátové jednotce. Morfolino, které používá britsko-australský tým, má jeden z kyslíků fosfátu nahrazen dimethylamidovou skupinou, dusík nesoucí dvě metylové skupiny a celá ribozová jednotka je nahrazena morfolinem, šestičlenným prstencem tvořeným čtyřmi uhlíky, jedním kyslíkovým a jedním dusíkovým atomem s vodíkovými atomy na uhlících.

Prof. Stephen D. Wilton, PhD,
Centre for Neuromuscular and Neurological Disorders,
University of Western Australia,
Nedlands, Australia,
E-mail: swilton@cyllene.uwa.edu.au

Dr. rer. nat. Günter Scheuerbrandt
Im Talgrund 2, D-79874 Breinau
E-Mail: gscheuerbrandt@t-online.de

Přeložil a mírně upravil: Miroslav Stuchlík