

## **19. jährliches ForscherInnen-Treffen der amerikanischen**

### **PatientInnen-Organisation Cure SMA**

von M.Sc. Miriam Peters

und Dr.rer.nat. Niko Hensel

## **Anhang**

### **3. Die Entwicklung neuer Medikamente und prä-klinische Studien (Fortsetzung)**

#### **3.3 *Small molecules* (kleine Moleküle) zur Behandlung der SMA: Ausgleich des SMN1 Gendefekts durch SMN2 Hochregulierung**

Shoutian Zhu berichtet davon, eine neue Klasse kleiner Moleküle entdeckt zu haben, die die Herstellung des SMN-Proteins durch das SMN2-Gen hochregulieren können und somit den Verlust des SMN1-Gens zu kompensieren in der Lage sind. Dies ist ein erster Schritt in Richtung eines neuen Therapieansatzes, welcher am CALIBR (Californian Institute for Biomedical Research) getan wurde. Momentan wird gerade daran gearbeitet, die Effizienz, die pharmakokinetischen Eigenschaften (wie lange hält das Medikament im Organismus vor) und die Sicherheit des Wirkstoffes zu optimieren. Weitere Tests sollen dazu in einem SMA-Mausmodell folgen.

#### **3.4 Ein bereits für eine andere Erkrankung zugelassenes Medikament erhöht die SMN-Proteinkonzentration**

Bei der Verwendung von bereits für andere Erkrankungen zugelassenen Medikamenten (*repurposed drugs*) verringern sich die Genehmigungshürden für klinische Studien. Hagar Grief (Bioblast Pharma) berichtet von einem Medikament, welches in SMA-Modellmäusen die SMN-Proteinmenge erhöht. In einem Mausmodell mit milder Verlaufsform erhöhte sich das Körpergewicht. In einem Mausmodell mit schwerer Verlaufsform gab es eine leichte Verbesserung der Gewichtszunahme, des Überlebens sowie der motorischen Fähigkeiten. Eine klinische Studie ist in Planung.

## **5. Pathologie der Spinalen Muskelatrophie**

Die Degeneration der Motoneurone stellt ein wichtiges Ereignis in der Pathologie der SMA dar, welches in der Folge zum Muskelschwund führt. Die Prozesse, die schließlich zur Degeneration führen sind jedoch noch immer unklar. Auch hat sich in Untersuchungen von SMA-Modellmäusen in den letzten Jahren herausgestellt, dass sich Muskelgewebe zum Teil unabhängig von der Degeneration der Motoneurone verändert. Zudem scheint es so, dass auch andere Gewebe betroffen sind. Welche Ereignisse führen zur Degeneration der Motoneurone? Welche Gewebe sind zu welchen Zeitpunkten verändert? Wie kann man diese Veränderungen zu verschiedenen Zeitpunkten der Erkrankung messen? Eignen sich diese Messungen dazu die Wirkung von potentiellen Therapeutika in klinischen Studien nachzuweisen?

### **5.1 Die Motoneuron-Defekte werden durch verstärkte Aktivität in den sensorischen Synapsen gemildert**

Um den Mechanismus der Motoneuron-Degeneration aufzuklären, lohnt es sich krankhafte Veränderungen zu betrachten, welche der Degeneration vorausgehen. In SMA Mäusen konnte die Arbeitsgruppe um George Z. Mentis bereits zeigen, dass eine Fehlfunktion innerhalb sogenannter sensibler Nervenbahnen vor der Motoneuron-Degeneration stattfindet. Diese sensiblen Nervenbahnen sind ein Teil des Reflexbogens und stehen mit den Motoneuronen in Kontakt. Interessanterweise waren die Kontaktstellen zwischen Motoneuronen und sensiblen Neuronen defekt (siehe auch 1.9). Daraus ergibt sich die Frage, ob niedrige SMN-Protein Konzentrationen in den Motoneuronen oder in den sensiblen Neuronen für diese Defekte verantwortliche sind. Dieser Frage ist Emily V. Fletcher nachgegangen, indem die SMN-Proteinkonzentrationen in einem SMA-Mausmodell selektiv entweder in Motoneuronen oder sensiblen Neuronen wiederhergestellt wurden. Dabei ergab sich, dass die Kontakt-Defekte nicht von den Motoneuronen, sondern von den sensiblen Neuronen ausgingen. Die Degeneration insgesamt konnte dadurch jedoch nicht vollständig rückgängig gemacht werden. Diese Versuche zeigen, dass auch andere Zellen an der Degeneration der Motoneurone zumindest teilweise beteiligt sind und deuten auf ein komplexeres Bild der degenerativen Prozesse in der SMA hin.

## **5.2 Die Kontaktstelle zwischen Motoneuron und Muskel ist in einer frühen SMA-Phase verändert**

Die Signalweiterleitung vom Motoneuron zum Muskel erfolgt an spezialisierten Strukturen, den sogenannten neuromuskulären Endplatten. Vorangegangene Beobachtungen hatten gezeigt, dass eine Degeneration der neuromuskulären Endplatten der Degeneration der Motoneurone vorrangig. Doch ist auch die Funktion der neuromuskulären Endplatte gestört? Lucia Tabares berichtet von solchen Störungen in SMA-Modellmäusen. Die neuromuskulären Endplatten konnten die Signale der Motoneurone nicht in gleichem Maße an den Muskel weiterleiten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine eingeschränkte Funktion der neuromuskulären Endplatten zunächst zu deren Degeneration und in der Folge zum Untergang der Motoneurone führt.

## **5.3 Die Umhüllung von motorischen Nervenfasern ist in der SMA verringert**

Die Nervenzell-Fortsätze der Motoneurone sind in Bündeln arrangiert, welche ähnlich wie bei einem Kabel durch eine Isolierschicht umhüllt sind. Diese sogenannte Myelinscheide ist wichtig für die Reizweiterleitung und das Überleben der Motoneurone. Charlotte Sumner berichtet in ihrem Vortrag von einer Schädigung der Myelinscheide in SMA-Patienten. Interessanterweise waren nicht alle Nervenfasern in gleichem Maße betroffen: Lediglich diejenigen, welche Muskelpartien mit starkem Muskelschwund versorgten, zeigten Beeinträchtigungen der Myelinscheide. Doch zu welchem Zeitpunkt der Erkrankung traten diese Veränderungen auf? Um diese Frage zu klären, wurde die SMN-Konzentration von SMA-Modellmäusen bereits im Mutterleib oder nach der Geburt erhöht. Nur bei den im Mutterleib behandelten Tieren gingen diese Schädigungen wieder zurück. Damit gehören Schädigungen der Myelinscheide wohl eher zu den sehr frühen pathologischen Veränderungen.

## **5.4 Der Mangel an SMN Protein führt zu Kontraktionsstörungen von Herzmuskelzellen im SMA Mausmodell**

Obwohl in der Vergangenheit immer wieder über Herzinsuffizienz in SMA-Mausmodellen berichtet worden ist, gab es bisher noch keine konkreten Studien, die sich mit dem direkten Einfluss des SMN Mangels auf die Herzmuskelzellen befassen haben. Kasey Moritz konnte nun erstmalig zeigen, dass in SMA Mäusen, bei denen das SMN-Gen ausgeschaltet worden ist und somit ein Mangel an SMN Protein vorliegt, sowohl die Kontraktilität als auch die

Relaxationszeit des Herzens negativ verändert sind. Überdies konnte die Arbeitsgruppe um Barrington G. Burnett feststellen, dass ein Mangel an SMN-Protein zu einem verlangsamten Calcium-Transport innerhalb der Herzmuskel-Zellen führt. Ein schneller Calcium-Transport ist für die Kontraktion der Herzmuskel-Zellen nötig. Dies deutet darauf hin, dass in der Abwesenheit des SMN Proteins der Zell-interne Calcium-Transport gestört ist und sich daraus eine Beeinträchtigung der Herzmuskel-Kontraktion ergeben könnte.

### **5.5 Der muskuläre Scheinwiderstand, Plasmaproteine und Elektrophysiologie als pharmakodynamische Biomarker der SMA**

Therapeutische Ansätze um das SMN Proteinlevel zu stabilisieren, konnten in mehreren SMA Modellorganismen bereits mit vielversprechendem Erfolg angewendet werden. Antisense Oligonukleotide (ASO), Gentherapieansätze und der Einsatz von „small molecules“ (kleinen Molekülen) befinden sich momentan in verschiedenen klinischen Studien. Um den Erfolg einer möglichen Therapie nachzuweisen, müssen messbare, Krankheits-spezifische Eigenschaften von SMA-PatientInnen gefunden werden, die sich bei einer Veränderung der Krankheit gleichermaßen mit ändern. Man spricht dann auch von pharmakodynamischen Biomarkern. David Arnold und seine Kollegen untersuchten den muskulären Scheinwiderstand (EIM: *elektrical impedance myography*) und die Konzentration von 10 verschiedenen Proteinen im Blutplasma als mögliche Biomarkerproteine im SMA-Mausmodell. Elektrophysiologische Vermessungen einschließlich CMAP (*compound muscle action potential*) und MUNE (*motor unit number estimation*) bestätigten die Datensätze des EIM und der Plasmaproteinvermessungen. Somit konnte erstmalig eine stabile Schnelldiagnose und Befundaufnahme etabliert werden; vorerst allerdings nur im Mausmodell.

### **5.6 Die Messung von muskulären Parametern von zu Hause aus kann bei klinischen Studien helfen**

In klinischen Studien muss die Wirksamkeit von Medikamenten statistisch nachgewiesen werden. Bei muskulären Erkrankungen wie der SMA kann der Krankheitsverlauf z.B. durch die Messung der elektrischen Eigenschaften des Muskels nachvollzogen werden. Die elektrische Impedanz Myographie ist ein solches nicht invasives Verfahren und kann mit wenigen technischen Hilfsmitteln durchgeführt werden. Seward Rutkovez schlägt vor, solche Messungen so weit zu vereinfachen, dass sie von PatientInnen, die sich in einer klinischen

Studie befinden oder deren Eltern, selbstständig zu Hause durchgeführt werden können. Dadurch wären häufigere und damit genauere Messungen möglich –ein Vorteil um die Wirksamkeit von klinischen Studien nachzuweisen.

## 6. Das SMN Protein und seine molekularen Interaktionspartner

Die SMA wird durch niedrige Konzentrationen eines speziellen Eiweiß-Moleküls (Protein) verursacht. Dieses sogenannten *Survival of Motoneuron (SMN) Protein*, befindet sich in allen Körperzellen, auch den Motoneuronen -diejenigen Nervenzellen, welche in der SMA degenerieren. Das SMN-Protein kann in den Körperzellen nur dann hergestellt werden, wenn das sogenannten *Survival of Motoneuron (SMN) Gen* vorhanden ist. Beim Menschen existieren zwei SMN-Gene, die als SMN1 und SMN2 bezeichnet werden. In fast allen Fällen wird die SMA aufgrund eines Verlusts oder einer Zerstörung des SMN1-Gens ausgelöst – das SMN2-Gen kann alleine nicht genügend SMN-Protein herstellen, um den SMN1-Genverlust auszugleichen.

Prinzipiell sind zwei verschiedene SMA-Therapie-Ansätze möglich: Die Wiederherstellung der **SMN-Protein-Menge** in den Körperzellen oder die Wiederherstellung einzelner **Funktionen** des SMN-Proteins. Die Wiederherstellung der SMN-Protein Menge ist sicherlich der zurzeit vielversprechendste Ansatz und es gibt zahlreiche unterschiedliche Strategien, wie man dieses Ziel erreichen kann. Bei dem zweiten Ansatz, der Wiederherstellung der Funktionen des SMN-Proteins, spricht man auch von SMN-unabhängigen Therapieansätzen, da die SMN-Proteinmenge dabei nicht verändert wird. Die Funktionen, welche nötig sind, um den SMA-Krankheitsverlauf zu verhindern oder zu lindern sind jedoch noch immer nicht vollständig verstanden. Die Interaktionen mit anderen Molekülen mit bekannter Funktion können Hinweise auf diese kritischen Funktionen des SMN-Proteins geben. Möglicherweise können beeinträchtigte SMN-Funktionen, welche sich durch zu niedrige SMN-Proteinkonzentrationen in der SMA ergeben dann durch Manipulationen der Interaktionspartner wiederhergestellt werden.

Solche Erkenntnisse werden oft in SMA-Modellorganismen gewonnen, die so manipuliert worden sind, dass geringere Konzentrationen des SMN-Proteins vorhanden sind. Das können z.B. Zellen in Kulturschalen, Fruchtfliegen, Fische oder Mäuse sein. In diesen Modellorganismen sind natürlich Manipulationen möglich, die häufig nicht als Therapien in Frage kommen. Trotzdem können entsprechende Experimente wertvolle Hinweise für künftige therapeutische Strategien liefern.

### **6.1 Gezielter Therapieversuch der SMA durch SMN2-Splicing Korrektur**

Das SMN2 Gen, welches in allen Menschen vorhanden ist, kann nicht genügend SMN-Protein produzieren und den SMN1-Gen-Verlust in SMA-PatientInnen daher nicht vollständig ausgleichen. Doch warum ist das so? Schon seit längerem ist bekannt, dass ein Zwischenschritt bei der Herstellung von SMN-Protein vom SMN2-Gen nicht richtig funktioniert. Dieses sogenannten *Splicing*, führt beim SMN2-Gen zu verkürztem, instabilem SMN-Protein, das nicht funktionsfähig ist. Auf der Suche nach einem neuen potentiellen Therapieansatz für die SMA wurden nun eine Reihe kleiner modifizierende Moleküle identifiziert, die speziell für das SMN2-Gen eine dementsprechende *SMN2-Splicing* Korrektur durchführen können. Letztendlich sollen so wieder stabile SMN-Proteine in voller Länge entstehen. Diese *Splicing* Korrektur Moleküle werden nun auf ihr Potential hin getestet. Die Moleküle, die für eine sehr starke SMN-Protein Zunahme verantwortlich sind, gilt es herauszufiltern. Zudem soll der Mechanismus, der für diese Erhöhung verantwortlich ist, auf molekularer Ebene entschlüsselt werden.

### **6.2 Gestörter zellulärer Protein-Abbau als möglicher Mechanismus der SMA**

In allen Zellen des menschlichen Körpers werden ständig Eiweiß-Moleküle (Proteine) hergestellt und abgebaut. Beide Prozesse beeinflussen die Protein-Konzentration in der Zelle und sind daher gleich wichtig für die Funktion der jeweiligen Proteine. Entsprechend ist der Protein-Abbau ein fein regulierter Prozess. Ewout Groen aus der Arbeitsgruppe von Thomas Gillingwater berichtet, dass der Protein-Abbau in einem Zellkulturmodell der SMA gestört ist. Interessanterweise führt eine ähnliche Störung in einem Mausmodell auch zu einem SMA-ähnlichen Krankheitsbild. Mit Hilfe eines Gentherapeutischen Ansatzes –also mittels eines Virus- wurde der Protein-Abbau dann in einem SMA-Mausmodell wiederhergestellt. Dies führte dann auch tatsächlich zu einem mildereren SMA-Verlauf in den Mäusen.

### **6.3 Die Hemmung eines molekularen Signalweges verbessert die Symptome eines SMA-Mausmodells**

In einem komplexen mehrzelligen Organismus wie dem menschlichen Körper, müssen sich die verschiedenen Zellen koordinieren. Dies geschieht durch Signalmoleküle, die von einer Zelle freigesetzt werden und an einen Rezeptor auf der Oberfläche einer Zielzelle binden. Der Rezeptor leitet das Signal dann in das Innere der Zielzelle weiter, wo es verarbeitet wird und

schließlich eine Reaktion der Zelle bewirkt. Laxman Gangwani berichtet von einem überaktiven Signalweg im Rückenmark eines Mausmodells mit schwerer Verlaufsform. Schaltet man diesen Signalweg in SMA-Mäusen aus, führt dies zu einer deutlichen Verbesserung der SMA-ähnlichen Symptome in den Mäusen. Interessanterweise hatte sich die SMN-Proteinkonzentration nicht verändert, es handelt sich also damit um einen SMN-unabhängigen Therapieansatz. In einem Mausmodell mit schwerer SMA-Verlaufsform war dies bisher noch nicht gelungen.

#### **6.4 SMN reguliert axonale Proteinsynthese**

Der Mechanismus, der aufgrund des geringeren Vorhandenseins des SMN-Proteins zu Fehlfunktionen in den Motoneuronen führt, ist bis heute nicht vollständig entschlüsselt. Was macht Motoneurone so empfindlich? Eine Besonderheit der Motoneurone sind ihre langen Nervenzell-Fortsätze, welche vom Rückenmark bis in die Muskeln reichen. In diesen sogenannten Axonen befindet sich auch SMN-Protein, jedoch sind die Funktion des SMN Proteins im Axons immer noch unzureichend verstanden. Die Frage lautet also: Was macht das SMN-Protein im Axon?

Studien zeigen jetzt, dass SMN mit dafür verantwortlich ist, dass die sogenannte mRNA entlang des Axons transportiert werden kann, um gezielt dort die Proteinsynthese zu aktivieren. Bei mRNA (englisch *messenger RNA*), auch Boten-RNA genannt, handelt es sich um eine spezielle Klasse von Biomolekülen. Diese vermitteln die auf Genen kodierten Informationen, wie ein Eiweismolekül (Protein) beschaffen ist, an die zelluläre Maschinerie, welche letztendlich diese Proteine zusammenbaut. Verringerte Mengen an SMN führen nicht nur zu einer geringeren Menge dieser mRNAs. Entlang des Axons treten diese nun in nur sehr geringen Mengen auf, da nicht genügend SMN Protein für eine ausreichende Verteilung sorgen kann. Dies könnte zur Degeneration der Motoneurone und damit zur Ausprägung der SMA beitragen.

#### **6.5 Einige Funktionen des SMN-Proteins während der neuronalen Entwicklung können wiederhergestellt werden.**

Während der embryonalen Entwicklung wachsen die Nervenzell-Fortsätze der Motoneurone aus, mit denen schließlich der Kontakt zum Zielgewebe, dem Muskel, hergestellt wird. Währenddessen müssen viele Biomoleküle zum auswachsenden Ende transportiert werden.

Schon seit längerem ist bekannt, dass das SMN-Protein mit einer Reihe von Proteinen gemeinsam an Transportprozessen in Nervenzellen beteiligt ist. Sara Custer aus der Arbeitsgruppe von Elliot Androphy liefert Hinweise, dass höhere Konzentrationen eines solchen Proteins einen SMN-Mangel teilweise ausgleichen können: In einem SMA-Fischmodell mit geringen SMN-Konzentrationen entwickeln sich die Fortsätze der Motoneurone nicht richtig. Erhöht man nun die Konzentration des anderen, gemeinsam mit SMN an Transportprozessen beteiligten Proteins, normalisieren sich diese Änderungen wieder. Darüber hinaus führte eine ähnliche Strategie in schwer betroffenen SMA-Modellmäusen zu einem verlängerten Überleben der Tiere.

#### **6.6 Die Verzweigung von Motoneuronen wird vom SMN-Protein in Kooperation mit einem RNA-Transportprotein reguliert.**

Während der Nervenzell-Fortsatz des Motoneurons auswächst, findet ein weiterer wichtiger Prozess statt: Die Fortsätze verzweigen, sodass ein Motoneuron mehrere Muskelfasern ansteuert. Christine Beattie berichtet von einer gestörten Verzweigung der Motoneurone eines SMA-Fischmodells. Eine Wiederherstellung der SMN-Konzentrationen lediglich in den Motoneuronen unter Auslassung anderer Zellen des SMA-Fischmodells führte dann auch zu einem Verschwinden der gestörten Verzweigung. Dazu passte, dass das SMN-Protein nur während der Phase der Verzweigung in den Nervenzell-Fortsätzen nachgewiesen werden konnte. Dort interagiert SMN mit einem anderen Protein, welches den Transport von Biomolekülen (mRNA oder Boten-RNA) vermittelt. Interessanterweise konnten die Störungen der Verzweigung auch durch höhere Konzentrationen dieses Transportproteins behoben werden. Zum einen weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass SMN am Transport von Biomolekülen beteiligt ist und dies wichtig für die Verzweigung von Motoneuronen ist, zum anderen konnte ein SMN-unabhängiger Therapie-Ansatz gefunden werden.

#### **6.7 Das ausschalten eines Zellskelett regulierenden Proteins verbessert die Symptome eines SMA-Mausmodells**

Alle Zellen verfügen über ein Zellskelett, das nicht nur Stabilität gewährleistet, sondern auch an vielen dynamischen Prozessen beteiligt ist: Fast immer wenn sich Strukturen innerhalb einer Zelle, Teile einer Zelle oder der gesamten Zelle gerichtet bewegen, ist das Zellskelett beteiligt. In Nervenzellen müssen z.B. viele Moleküle im Nervenfortsatz transportiert werden;



diese Transportprozesse werden überwiegend durch das Zellskelett durchgeführt. Ein wichtiges Protein, welches das Zellskelett reguliert, ist das sog. Tau-Protein. In anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson wurde bereits eine Beteiligung des Tau-Proteins am Pathomechanismus vorgeschlagen –man spricht in diesem Zusammenhang auch von sogenannten Tauopathien. Ist SMA ebenfalls eine Tauopathie? Dieser Frage ist Nimrod Miller aus dem Labor von Yong-Chao Ma nachgegangen. Zwar ist das Tau-Protein in SMA-Modellmäusen verändert, doch unterscheidet sich diese stark von Veränderungen in Alzheimer oder Parkinson. Macht man diese Veränderungen jedoch in SMA-Mäusen rückgängig, gehen auch die Anzeichen einer SMA im Muskel und im Rückenmark zurück. Allerdings gab es keine Verbesserung der Überlebensdauer der Mäuse. SMA ist nach diesen Erkenntnissen also keine klassische Tauopathie, das Tau-Protein könnte allerdings beteiligt sein.

### **6.8 Verbesserung des SMA Phänotyps durch Endozytose**

In vorangegangenen Studien hatte sich gezeigt, dass SMA-PatientInnen mit gleicher SMN-Protein Menge unterschiedlich schwer betroffen waren. In der Folge wurden mehrere Faktoren entdeckt, die auf die Entwicklung der SMA einen positiven Effekt hatten. Doch welche Funktionen erfüllen diese Faktoren? Seyyed Mohsen Hosseini aus der Arbeitsgruppe von Brunhilde Wirth berichtet von Untersuchungen dieser Faktoren in Zellkultur als auch in SMA-Fisch- und Mausmodellen. Interessanterweise trugen einige dieser krankheitsmodifizierenden Faktoren zur Stabilisierung der des Zellskeletts bei. Überdies waren diese Faktoren auch an sogenannten endozytotischen Prozessen beteiligt. Als Endozytose bezeichnet man die Aufnahme von Material in die Zelle durch Einstülpung und Abschnüren von Teilen der Zellhülle. In diesen Modellorganismen konnte durch Herunterregulieren der SMN Proteinmenge (Simulation der SMA) ein drastischer Rückgang der Endozytose in Menge und Geschwindigkeit nachgewiesen werden. Diese Versuche bestätigen die grundlegende Notwendigkeit dieser Interaktionsmoleküle sowie die Wichtigkeit des SMN Proteins für diese zellinternen Prozesse.

### **6.9 Defekte im Reflexbogen können SMN-unabhängig behoben werden**

Motoneurone treten nicht nur mit den Muskeln in Kontakt, sondern auch mit anderen Nervenzellen. Bei einigen diese Nervenzellen handelt es sich um sogenannte sensible

Nervenzellen. Diese Zellen sind darauf spezialisiert, Informationen über den Muskel zurück an das Motoneuron zu leiten. Auf diese Weise werden viele Reflexe gesteuert und eine sensible Nervenzelle bildet zusammen mit dem Motoneuron und dem Muskel den sogenannten Reflexbogen. In der SMA wurden schon früher Defekte im Reflexbogen gezeigt; der Kontakt zwischen sensibler Nervenzelle und Motoneuron ist beeinträchtigt. Elena Bianchetti erläutert in ihrem Vortrag, dass diese Beeinträchtigungen in einem SMA-Mausmodell teilweise wieder rückgängig gemacht werden können. Zuvor hatte die Arbeitsgruppe um Livio Pellizzoni beobachtet, dass in den SMN-defizienten SMA-Mäusen ein anderes Protein ebenfalls in nur geringen Mengen vorhanden war. Erhöht man diese Menge, werden die Kontakte zwischen sensibler Nervenzelle und Motoneuron wiederhergestellt. Obwohl kein Effekt auf das Überleben der Tiere beobachtet werden konnte, ging dies mit verbesserten motorischen Fähigkeiten einher.