

DISZTROFIN MOLEKULÁK EXPRESSZIÓJA MDX
IZOMBAN

PhD értekezés tézisei

Dr. Dankó István

Pécsi Orvostudományi Egyetem

Pécs, 1997

DISZTROFIN MOLEKULÁK EXPRESSZIÓJA MDX
IZOMBAN

PhD értekezés tézisei

Dr. Dankó István

Pécsi Orvostudományi Egyetem

Pécs, 1997

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

- Dankó, I., V. Chapman, J. A. Wolff. The frequency of revertants in mdx mouse genetic models for Duchenne muscular dystrophy. *Pediatric Research* 32: 128-131, (1992).
- Dankó, I., J. D. Fritz, J. S. Latendresse, H. Herweijer, E. Schultz, J. A. Wolff. Dystrophin expression improves myofiber survival in mdx muscle following intramuscular plasmid DNA injection. *Human Molecular Genetics* 2: 2055-2061, (1993).
- Dankó, I. és J. A. Wolff. Direct Gene Transfer Into Muscle. *Vaccine* 12: 1499-1502, (1994).
- Fritz, J. D., I. Dankó, S. L. Roberts, J. S. Latendresse, K. P. Campbell, J. A. Wolff. Expression of deletion-containing dystrophins in mdx muscle: implications for gene therapy and dystrophin function. *Pediatric Research* 37: 1-8, (1995).
- AZ ÉRTEKEZÉS TÁRGYÁBAN MEGJELENT EGYÉB KÖZLEMÉNYEK
- Dankó, I., J. D. Fritz, S. Jiao, K. Hogan, J. S. Latendresse, J. A. Wolff. Pharmacological enhancement of in vivo foreign gene expression in muscle. *Gene Therapy* 1: 114-121, (1994).
- Herweijer, H., J. S. Latendresse, P. Williams, I. Dankó, S. Schlessinger, J. Wolff. High level gene expression in vitro and in vivo using a plasmid based self-amplifying Sindbis virus vector. *Human Gene Therapy* 6:1161-1167, (1995).
- Dankó, I., P. Williams, H. Herweijer, G. Zhang, J. S. Latendresse, I. Bock, J. A. Wolff. High Expression of Naked Plasmid DNA in Muscles of Young Rodents. *Human Molecular Genetics* 6: 1435-1443, (1997).

BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

A génterápia célja a sejtekben folyó fehérjeszintézis minőségét és/vagy mennyiségét befolyásolása új gének bevitelével. A kérdéses gén hordozója lehet vírus, vagy egyszerű plazmid DNS, melynek *in vitro* bejuttatására eukarióta sejtekbe különböző fizikokémiai módszerek használatosak (Dankó és Wolff, 1994). Figyelemreméltó, hogy harántcskolt izomsejtek külön manipuláció nélkül is képesek plazmid DNS-t az extracelluláris térből felvenni (Wolff, Malone és mtsai., 1990). Egér vázizomba injektált, riporter gént tartalmazó plazmid bejut a sejtmagokba, és expressziója az állatok egész életére megmarad anélkül, hogy integrálna a kromoszómákba (Dankó és Wolff, 1994, Wolff, Ludtke és mtsai., 1992). Az izomsejtek e különleges tulajdonsága lehetővé teszi öröklött primér myopathiák génterápiás korrigálását, és más felhasználási lehetőségeket is ígér, melyek közül említést érdemel vírusfehérjék expressziója immunizálás céljából, vagy a szervezet távolabbi pontjain ható fehérjék, mint növekedési hormon (Dhawan, Pan és mtsai., 1991) és IX alvadási faktor (Yao és Kurachi, 1992) termelése és szekréciója.

Munkánk során az egyik leggyakoribb hereditier izomsorvadás, a **Duchenne Muscularis Dystrophia (DMD)** egy állatmodelljében tanulmányoztuk plazmid DNS-be épített normális és mutáns disztrófin cDNS expressziójának hatását az izomrostokra. A DMD nemhez kötöten öröklődik, kb. 1/3000 fiút érint. Jelenleg hatásos kezelése nincs, befolyásolhatatlanul

progrediáló izomsorvadás jellemzi, ami 4-5 éves kor körül okozza az első tüneteket és fiatal felnőttkorra betegek halálához vezet (Papp, 1990, Robinson és Linden, 1993). A beteg izomrostokra jellemző a **disztrófin** nevű 427 kD molekulahúlyú fehérje hiánya vagy aberrációja (Hoffman, Fishbeck és mtsai., 1988, Hoffman, Brown és mtsai., 1987).

A disztrófin kódoló gén melynek mutációja a kórkép hátterében áll, az X kromoszómán helyezkedik el, 79 exont foglal magába és több mint 2,5 millió bázispárra terjed ki (Koenig, Hoffman és mtsai., 1987). A génről különböző promoterek irányítása alatt többféle transzkripti fródiók (Ahn és Kunkel, 1993). Az elsősorban a váz- és szívizomban előforduló disztrófin izoformának, amely DMD-ben hiányzik vagy kóros, egy 14 kb nagyságú mRNS felel meg (Hoffman, Brown és mtsai., 1987). A gén hatalmas mérete miatt a mutációk gyakoriak és sokfélék, változatos klinikai képet eredményezve. Az enyhébb fenotípus Becker-, a súlyosabb Duchenne-féle izomdisztrófia néven ismert. A diagnózisra került esetek 1/3-a új mutáció következménye (Robinson és Linden, 1993), tehát genetikai vizsgálatokkal és tanácsadással a gyakorlatban nem előzhető meg, ami kiemeli a hatásos kezelés szükségességét.

A disztrófin molekula négy fő részre, (a) aminos-terminális, (b) centrális, (c) u.n. ciszteinben gazdag és (d) karboxil-terminális doménekre osztható. A plazmalemma belső felszínén elhelyezkedve komplexet alkot az aminos-terminális domén felől az izomrost aktinjával, a karboxil-terminális részen keresztül

pedig egy négy tagból álló transzmembrán glikoprotein komplexszel ("dystrophin-associated glycoproteins"-DAG) (Ervasti és Campbell, 1991). A DAG komplex a szarkolemma extracelluláris felszínén kapcsolódik az alfa-disztroglikán nevű glikoproteinhez, és azon keresztül az extracelluláris lamininhez. Ezáltal a disztrofin molekulán keresztül horgonyozódnak az izomrost kontraktilis fehérjei a szarkolemmához és az extracelluláris matrix fehérjéhez (Ervasti és Campbell, 1993). Ismert, hogy a disztrofinhiány a DAG komplex fehérjének drasztikus csökkenésével is jár (Ohlendieck, Matsumura és mtsai., 1993). Jelen elközelítés szerint DMD-ben az izomnekrózis annak a következménye, hogy megszűnik az összeköttetés a szubsarkolemmális citoskeleton és az extracelluláris matrix között és ez esendőbbekké teszi a sejteket az izomkontrakciók okozta mechanikus stresszel szemben (Matsumura és Campbell, 1994).

A humán X-hez kötött izomdisztrofíának több állatmodellje ismert, génterápiás kutatás céljára az **mdx** egér (Bulfield, Siller és mtsai., 1984) használatos a legszélesebb körben. Az eredeti mutáns izomsejtjeiben az X-kromoszómán lévő nonszensz pontmutáció következtében nem termelődik disztrofin (Sicinski, 1989). Különösen idősebb mdx egerekben azonban, viszonylag nagy számban fordulnak elő disztrofin-pozitív "reverzáns" rostok, melyek valószínűleg második, szomatikus mutáció eredményei (Hoffman, Morgan és mtsai., 1990). Ezek a disztrofin expresszió immunhisztokémiai kiértékelését nagyon megnehezítik. A disztrofin-géntranszfer eredményességének immun-

hisztokémiai tanulmányozására olyan állatmodellre van szükség, amelyben annyira alacsony a háttér reverzáns rostok száma hogy viszonylag kis hatások mellett is biztonságosan értékelhető a génextpresszió.

A DMD génterápiájának sikere attól függ, hogy elérhető-e megfelelő számú izomrost transzformációja, és hogy a génextpresszió az adott sejtek fenotípusát normalizálja-e. A disztrofin struktúrális fehérje, korlátozott nukleáris doménnel (Pavlati, Rich és mtsai., 1989), ezért sok sejmagnak kell normális génkópiát tartalmaznia ahhoz, hogy az izomostok teljes kiterjedésében termelődjön. Jelenleg a vírusvektorok túlnnek alkalmaznak arra, hogy klinikailag is hasznosítható hatásokkal transzformálják az izomrostokat, azonban a disztrofin kódszekvencia meghaladja befogadóképességüket.

Kísérleteinkkel ahhoz a munkához kívántunk hozzájárulni, melynek célja olyan **megfelelő terápiás transzsgén** konstruálása amelynek expressziója megakadályozza az izomrostok pusztulását, és a nagyobb határfokú, de kisebb befogadóképességű adenovírus vektorokba is behelyezhető. Ehhez elengedhetetlen a disztrofin molekula funkcionális szempontból nélkülözhető részeinek meghatározása. Munkánkhoz plazmidvektorokat használtunk, melyek képesek a teljes cDNS-t befogadni és így alkalmasak különböző disztrofin mutánsok funkcionálisitásának összehasonlító vizsgálatára.

KÍSÉRLETI MÓDSZEREK

A disztrofin expresszió sajátosságait tanulmányozva elin-nitrozo-urea (ENU) expozícióval létrehozott új mdx variánsokban (Chapman, 1989), két új mutáns allélt hordozó törzset írtunk le (mdx4 és mdx5) (Dankó, Chapman és mtsai., 1992), melyek a revertáns rostok alacsony száma miatt disztrofin immun-hisztokémiai vizsgálatok céljára kiválóan alkalmasak. Ezeket az egértörzseket használtuk kísérleteinkhez, melyekben disztrofin mutánsok expresszióját vizsgáltuk.

A disztrofin molekula egyes részei hiányának következményeit különböző delécioákat tartalmazó cDNS-ek expressziójával járó fenotípus változások összehasonlításával tanulmányoztuk. Az állatok quadriceps izmába rekombináns plazmidot injektáltunk, mely vagy a teljes cDNS-t vagy olyan disztrofin molekulákat kódoló mutáns cDNS-t tartalmazott, melyekből hiányzott a centrális domén nagy része (Becker) (England, Nicholson és mtsai., 1990), az amino-terminus és/vagy a karboxil-terminus (Fritz, Dankó és mtsai., 1995). A géntranszferet követően vizsgáltuk a disztrofin és a DAG komplex fehérjéknek kimutathatóságát a szarkolemma mentén, valamint a centrális elhelyezkedésű sejtmagok előfordulási arányát. Centromukleált izomrostok korábbi degenerációs-regenerációs ciklusok következtében jellemnek meg (Grounds, 1991), arányuk csökkenése a progresszív lassulását mutatja. A génextpresszió stabilitása a transzduktált izomrostok tartós túlélését jelzi, változásait két mód-

szerral is tanulmányoztuk. Egyrészt immunhisztokémiai vizsgálá-tokkal nyomonkövettük a rekombináns disztrofint tartalmazó izomrostok számának alakulását, másrészt olyan markert alkalmaztunk, melynek expressziója párhuzamos a disztrofin expressziójával, de kimutatása a disztrofin kimutatásától független (Dankó, Fritz és mtsai., 1993, Fritz, Dankó és mtsai., 1995). Nevezetesen, olyan plazmidokat állítottunk össze, melyek a különböző disztrofin cDNS-ek mellett a Luciferáz gént is tartalmazták. Luciferáz expresszió tehát csak olyan sejtmag működésének eredményeként lehetett kimutatható, amely disztrofin gént is tartalmazott. A Luciferáz expressziót azért választottuk markerként, mert az normális izomban stabil, mdx egérben viszont hamar elvész az izomrostok pusztulása miatt.

EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

(1) Két ENU mutagenézissel létrehozott új mutáns mdx tör-zset írtunk le, melyekben a vizsgálatok sokkal megbízhatóbban vé-gezhetők a "háttér" disztrofin-pozitív rostok alacsony száma miatt. Egyéb tulajdonságokban, mint hisztopathológiai jegyek és emelke-dett szérum kreatin kináz, az állatok megkülönböztethetetlenek voltak az eredeti mutánstól. Aktív nekrotikus góccok és az egyes sejtmagokban folyó DNS replikációt jelző brómdeoxiuridin beépülés és retrovírus-vektor expresszió az állatok egész élettartama során kimutathatók voltak. Az állatok életkorának előrehaladtával

nóti a rostok közötti kaliberingadozás és a centrális elhelyezkedésű sejtmagok aránya, ugyancsak jelezve az ismételtlen visszatérő degenerációs-regenerációs ciklusokat. A többi vizsgált vázizmomal szemben, a rekeszizmomban jelentős kötőszöveti felszaporodás is észlelhető volt. Az állatokat több kutatócsoportnak is rendelkezésére bocsátottuk.

(2) A szövettani vizsgálatok alapján a teljes és a Becker disztrofín expressziója legalább hat hónapig stabil volt és a centrális elhelyezkedésű magok aránya csökkent a kontrollokhoz viszonyítva, jelezve, hogy a transzformált rostok esendősége kisebb lett.

A többi mutáns expressziója csak egy hétig volt kimutatható a plazmid injekció után. A plazmamembrán mentén helyezkedtek el azok a rekombináns disztrofín proteinek is melyekből hiányzott az amino-terminus, karboxil-terminus, vagy a centrális domén nagy része.

Csak a karboxil-terminussal rendelkező molekulák voltak képesek stabilizálni a DAG komplexet a sejtmembrán mentén, és csak ezeknek a molekuláknak az expressziója volt kimutatható egy héten túl.

(3) A génextpresszió megbízhatóbb értékelése céljából egy másik, új megközelítést is alkalmaztunk azzal, hogy olyan expressziós kazettákat építettünk a plazmidvektorokba melyek az adott disztrofín mutánson kívül luciferáz riportergént is

tartalmaztak. Ezáltal az immunhisztokémiai vizsgálatoktól függetlenül, indirekt módon is értékelhető volt a disztrofín gén expressziójának stabilizáló hatása az izomrostokra.

Hasonlóan a szövettani vizsgálatok eredményeire, csak a teljes és a Becker disztrofint (is) kódoló plazmidok injekciója után volt a luciferáz expresszió legalább két hónapon át stabil mdx izomban.

Összefoglalva, először vizsgáltuk különböző amino- és karboxil terminális delécióit tartalmazó mesterséges disztrofín-mutánsok posztnatális géntranszferet követő expresszióját mdx izomban. Azt találtuk, hogy lehetséges a molekula membrán-lokalizációja az amino- és karboxil-terminus akár együttes hiányában, vagy nagy centrális domén deléció esetén is. Ennek alapján a disztrofín molekula több részén is képes kötődni a plazmamembránhoz. Eredményeink azt támasztják alá, hogy a karboxil domén kritikus a DAG komplexszel való kötődés szempontjából. A DAG komplexszel való lokalizáció nem volt előfeltétele a különböző disztrofín molekulák membrán-lokalizációjának, de szükséges volt a mutáns disztrofín molekulák expressziójának stabilizálásához, és a disztrofín hiány hisztológiai jeleinek enyhítéséhez.

Ezek az adatok egyrészt hasznos iránymutatók az optimális terápiás transzgen megtalálásához, másrészt bizonyítják, hogy a posztnatális géntranszfer hasznos lehet DMD-ben amennyiben elegendő számú izomrostban el lehet érni a teljes vagy Becker-disztrofín expresszióját.

IRODALOM

- Ahn, A. H., L. M. Kunkel. The structural and functional diversity of dystrophin. *Nature Genetics* 3: 283-291, (1993).
- Bulfield, G., W. G. Siller, P. A. L. Wight, K. J. Moore. X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81: 1189-1192, (1984).
- Chapman, V. M., Miller, D.R., Armstrong, D., Caskey, C.T. Recovery of induced mutations for X-chromosome-linked muscular dystrophy in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 1292-1296, (1989).
- Dankó, I., V. Chapman, J. A. Wolf. The frequency of revertants in mdx mouse genetic models for Duchenne muscular dystrophy. *Pediatric Research* 32: 128-131, (1992).
- Dankó, I., J. D. Fritz, J. S. Latendresse, H. Herweijer, E. Schultz, J. A. Wolf. Dystrophin expression improves myofiber survival in mdx muscle following intramuscular plasmid DNA injection. *Human Molecular Genetics* 2: 2055-2061, (1993).
- Dankó, I., J. A. Wolf. Direct Gene Transfer Into Muscle. *Vaccine* 12: 1499-1502, (1994).
- Dhawan, J., L. C. Pan, G. K. Pavlath, M. A. Travis, A. M. Lanchot, H. M. Blau. Systemic delivery of human growth hormone by injection of genetically engineered myoblasts. *Science* 254: 1509-1512, (1991).
- England, S. B., L. V. Nicholson, M. A. Johnson, S. M. Forrest, D. R. Love, E. E. Zubrzycka-Gaarn, D. E. Bulman, J. B. Harris, K. E. Davies. Very mild muscular dystrophy associated with the deletion of 46% of dystrophin. *Nature* 343: 180-182, (1990).
- Ervasti, J. M., K. P. Campbell. Membrane Organization of the Dystrophin-Glycoprotein Complex. *Cell* 66: 1121-1131, (1991).
- Ervasti, J. M., K. P. Campbell. A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *Journal of Cell Biology* 122: 809-823, (1993).
- Fritz, J. D., I. Dankó, S. L. Roberds, J. S. Latendresse, K. P. Campbell, J. A. Wolf. Expression of deletion-containing dystrophins in mdx muscle: implications for gene therapy and dystrophin function. *Pediatric Research* 37: 1-8, (1995).
- Grounds, M. D. Towards understanding skeletal muscle regeneration. *Pathology, Research & Practice* 187: 1-22, (1991).
- Hoffman, E. P., K. H. Fishbeck, R. H. Brown, M. Johnson, R. Medori, J. D. Loike, J. B. Harris, R. Waterston, M. Brooke, L. Specht, W. Kupsky, J. Chamberlain, C. T. Caskey, F. Shapiro, L. M. Kunkel. Characterization of dystrophin in muscle biopsy specimens from patients with Duchenne's or Becker's muscular dystrophy. *New England Journal of Medicine* 318: 1363-1368, (1988).
- Hoffman, E. P., R. A. Brown, L. M. Kunkel. Dystrophin: The Protein Product of the Duchenne Muscular Dystrophy Locus. *Cell* 51: 919-928, (1987).
- Hoffman, E. P., J. E. Morgan, S. C. Watkins, H. S. Slayter, T. A. Partridge. Somatic Reversion/Suppression of the Mouse mdx Phenotype in Vivo. *Journal of Neuroscience* 99: 119-125, (1990).
- Koenig, M., E. P. Hoffman, C. J. Bertelson, A. P. Monaco, C. Feener, L. M. Kunkel. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD)cDNA and preliminary genomic organization of the gene in mouse and affected individuals. *Cell* 50: 509-517, (1987).
- Matsumura, K., K. P. Campbell. Dystrophin-glycoprotein complex: its role in the molecular pathogenesis of muscular dystrophies. *Muscle & Nerve* 17: 2-15, (1994).
- Ohlendieck, K., K. Matsumura, V. V. Ionasescu, J. A. Towbin, E. P. Bosch, S. L. Weinstein, S. W. Sernett, K. P. Campbell. Duchenne muscular dystrophy: deficiency of dystrophin-associated proteins in the sarcolemma. *Neurology* 43: 795-800, (1993).

- Papp, Z. *Obstetric Genetics* 417-421 old., Akad. Kiadó, Budapest (1990).
- Pavlah, G. K., K. Rich, S. G. Webster, H. M. Blau. Localization of muscle gene products in nuclear domains. *Nature* 337: 570-573, (1989).
- Robinson, A., M. G. Linden. *Clinical Genetics Handbook* 191-194 old., Blackwell Scientific Publications, Boston (1993).
- Sicinski, P., Geng, Y., Ryder-Cook, A.S., Barnard, E.A., Darlison, M.G., Barnard, P.J. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science* 244: 1578-1580, (1989).
- Wolff, J. A., J. J. Ludtke, G. Acsádi, P. Williams, A. Jáni. Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Human Molecular Genetics* 1: 363-369, (1992).
- Wolff, J. A., R. W. Malone, P. Williams, W. Chong, G. Acsádi, A. Jáni, P. L. Felgener. Direct Gene Transfer into Mouse Muscle in Vivo. *Science* 247: 1465-1468, (1990).
- Yao, S. N., K. Kurachi. Expression of human factor IX in mice after injection of genetically modified myoblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 3357-3361, (1992).