

Izomdystrophiák genetikai háttere és terápiás lehetőségük

Dr. Karcagi Veronika, dr. Pikó Henriett, dr. Nagymihály Marianna, dr. Garami Márta, dr. Herczegfalvi Ágnes, dr. Tímár László
Országos Környezetegészségügyi Intézet Molekuláris Genetikai és Diagnosztikai Osztály, Budapest, MRE Bethesda Gyermekkórház Neurológiai Osztály, Budapest, OGYEI, Genetikai Tanácsadó, Budapest

Duchenne/Becker izomdystrophia (DMD/BMD)

Általános jellemzők

A Duchenne/Becker típusú izomdystrophia X kromoszómához kötött recesszív öröklődésű betegség, előfordulási gyakorisága: DMD esetében 1/3500; BMD esetében 1/30000. A DMD betegségre súlyos, korai halállal járó fenotípus jellemző, míg a BMD betegség tünetei enyhébbek, nincs korai halál.

A dystrophin gén (Xp21) 2,5 Mb méretű, 79 exont tartalmaz, 8 promóter régióval, a mRNS 14 kb hosszúságú. A géntermék a dystrophin fehérje (427 kDa), a sarcolemmális elhelyezkedésű dystrophin asszociált fehérje komplex legfontosabb tagja. A fehérje komplex feladata az izommembrán stabilitásának biztosítása a kontrakció ill. relaxáció során.

A betegség kialakulásában szerepet játszó géndefektusok

Deléciók (60%), hot-spot régiókban a gén proximális (ex02-ex10) és a középső (ex44-ex52) részén. Duplikációk (5–8%). Pontmutációk (30–35%).

Minden harmadik esetben új mutáció alakul ki; azonban germinális/szomatikus mozaikosság lehetséges.

A két eltérő fenotípus hátterében az ún. frame-shift elmélet áll:

- „in frame” mutáció (a mRNS leolvasási kerete nem tolódik el)
BMD fenotípust eredményez
- „out of frame” mutáció (a leolvasási keret eltolódik, így értelmetlen fehérje keletkezik), DMD fenotípust okoz

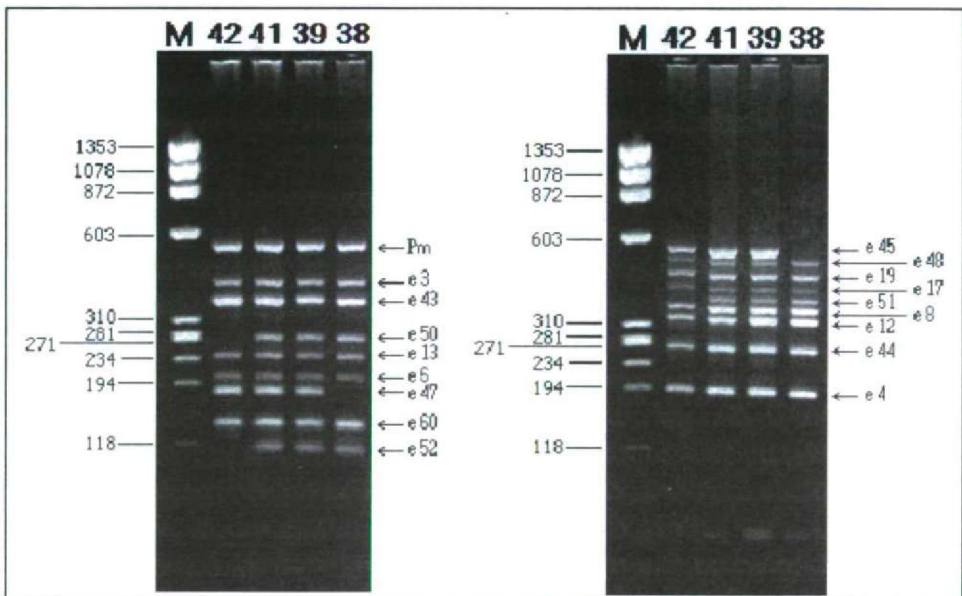
- pontmutációk esetén a stopkodon DMD fenotípust eredményez

Célkitűzéseink

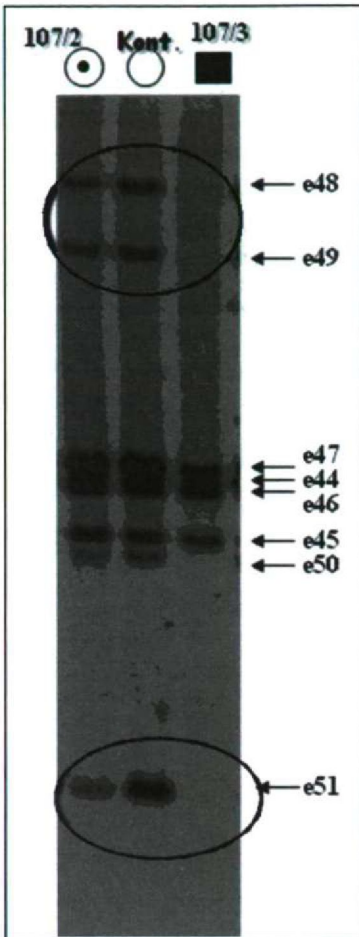
- A DMD/BMD betegséggel érintett fiú/férfi betegek mutációs analízise, exon deléciók lokalizációja, mérete és gyakoriságának elemzése a vizsgált magyar populációban
- Hordozóság szűrés a betegséggel érintett családok női hozzátartozóiban
- Prenatális vizsgálatok felajánlása az érintett családokban

Alkalmazott vizsgálati módszerek

- Multiplex PCR reakció: 2 X 9 exon egyidejű vizsgálata
- Southern blot analízis: cDNS próbákkal (XJ10, 7b8, 30.2, 30.1, 47.4, 60.1)
- MLPA (multiplex ligáció függő próba amplifikálás)
 - deléciók, duplikációk és bizonyos pontmutációk kimutatására alkalmas, valamint kvantitatív hordozósági analízisre
 - kis mennyiségű DNS elegendő (100–200 ng);
 - gyors analízis (3–4 nap)
 - a DMD/BMD betegségnél a teljes dystrophin gén (79 exon) vizsgálható



1. ábra. Multiplex PCR reakció: A 42. és 38. minta pozitív, míg a 41. és 39. beteg mintájában nem találtuk meg a gyakori deléciókat

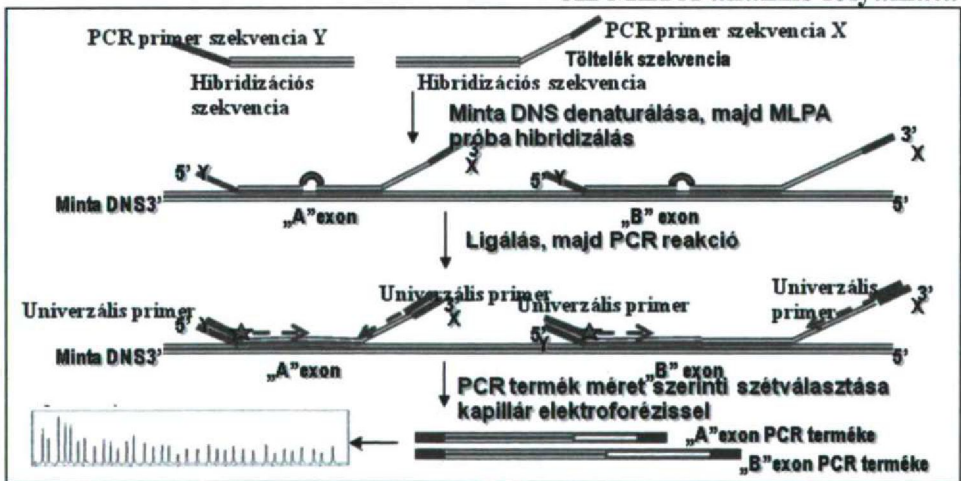


2. ábra.

Southern blot analízis hordozóság szűrésre; 7b8 cDNS próbával történő hibridizálás: 107/3 beteg édesanyja (107/2) hordozza a dystrophin gén e48-e51 delécióját

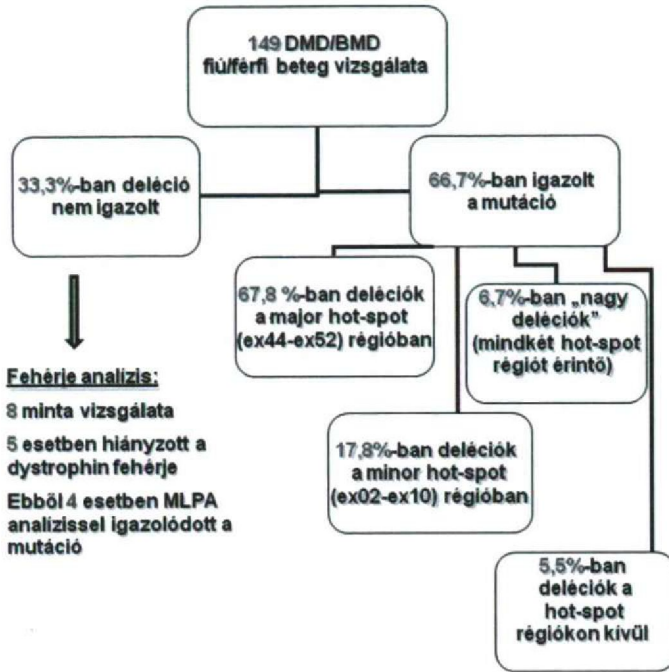
3. ábra.

Az MLPA analízis folyamata



Eredmények

a) Fiú/férfi betegek dystrophin gén analízise



Az MLPA vizsgálat bevezetésével kapott eredményeink a következők:

Duplikációk: A betegek 7,5%-ában detektálhatóak.

Ritka deléciók: ex22-ex41; ex30, ex32, ex61, ex61-ex64 kimutatása csak MLPA-val vált lehetővé.

Pontmutáció: Egy ikerpár esetében, 4147C>T; Gln1383Stop mutáció, egy másik betegnél egy exon

deléció detektálása MLPA-val, ezt követő DNS szekvenálás igazolta, hogy valójában pontmutációval jelen.

Teljes dystrophin gén deléció: két beteg esetében. Folyamatos gén-deléciós szindrómát mutattunk ki, a szomszédos gének deléciója is igazolódott (ARX;IL1RAP11, NR0B1, GK, RPGR gének).

b) Hordozóság szűrés női hozzátartozókban



c) Prenatális analízisek eredményei

16 eset, 10 fiú magzatból 3 beteg magzatot detektáltunk.

Spinalis izomatrophia (SMA)

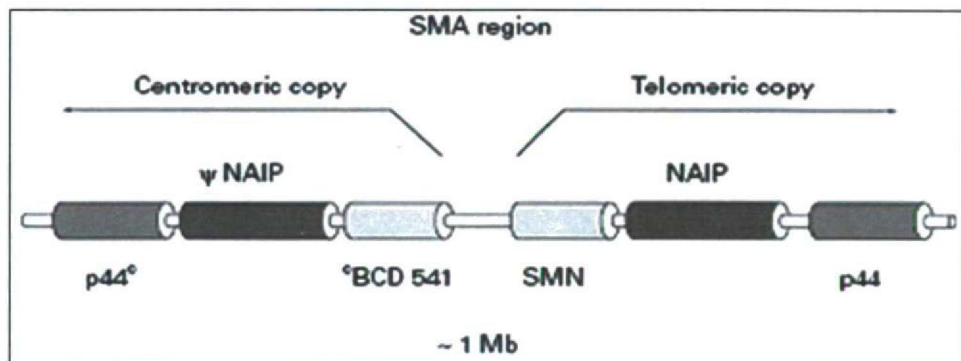
A betegség klinikai háttere

A spinalis izomatrophia a második leggyakoribb autoszomális recesszíven öröklődő betegség, előfordulási gyakorisága 1/6000. A hypotoniával, denervációval, izombénulással járó tüneteket a gerincvelői α -motoneuronok fokozatos pusztulása okozza. A hordozósági gyakoriság a normál populációban magas, 1/35. A betegségnek 5 különböző súlyosságú fenotípus csoportját különböztetjük meg:

- congenitalis forma, SMA 0
- halál < 4 hó
- Werdnig–Hoffmann kór, SMA I
- kezdet < 6 hó, halál < 18 hó, nem ül
- Fried-Emery, SMA II
- kezdet < 18 hó, halál > 2 év, nem jár
- Kugelberg–Welander, SMA III
- kezdet > 18 hó, halál felnőttkorban, jár
- felnőttkori forma, SMA IV
- kezdet > 30 év, normális élettartam

Az SMA betegség genetikai háttere

SMA determináns gén az SMN (survival motor neuron) gén, az 5q13 lókuszbán helyezkedik el, egy inverz duplikációban lévő 500 kb-os elemben. Ez az SMN, NAIP és a p44 gének homológ kópiáit tartalmazza. A betegség mutációs spektruma viszonylag szűk, az SMN1 exon7 (és exon8) deléció a betegek >95%-ában megtalálható, míg 5%-uk összetett heterozigótának bizonyult (deléció, valamint pontmutáció).



6. ábra.

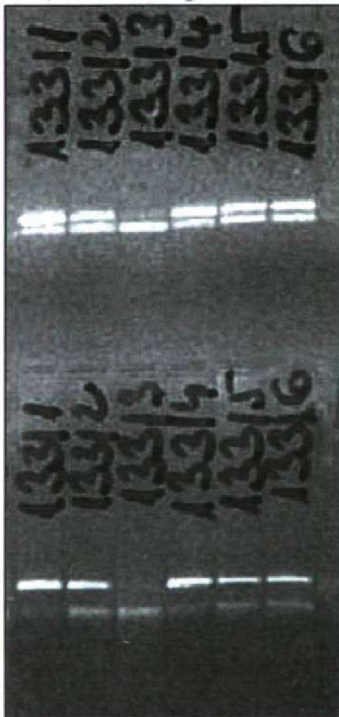
Az SMA region sematikus felépítése

Az SMN gének és a protein funkciója

SMN1 gén 294 as-ból álló, 38 kD fehérjét kódol, 9 exon. SMN2 gén 5 nukleotid különbség, alternatív splicing ? exon 5 és 7 skipping ? csak 20% teljes hosszúságú fehérje. SMN2 gén a betegekben mindig jelen van, kontroll egyének 5%-ában hiányzik. Génkonverzió ? SMN2 gén kópiaszáma megnő. A három súlyossági forma kialakításáért felelős ? minél magasabb az SMN2 gén kópiaszáma, annál enyhébb a fenotípus. Protein funkció az mRNS metabolizmusban, splicingban. Ubiquiter fehérje, de a motoneuronokban kitüntetett szerepe van (axon növekedési kúpban koncentrálnak). Anti-apoptotikus funkció? neuron-specifikus gének regulációja?

Genetikai szűrővizsgálatok

a) Direkt mutáció analízis: PCR és RFLP technika; az SMN1 gén 7. és 8. exon deléció kimutatására alkalmas. Homozigóta deléció esetén a betegség molekuláris diagnózisa igazolt. Heterozigóta állapot kimutatására (hordozóság szűrésre) nem alkalmazható.



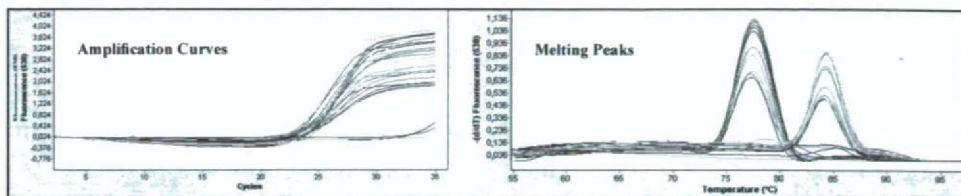
b) Haplotípus analízis: 5q13 régióban az SMN génhez közeli polimorf mikroszatellita markerek vizsgálatán alapul. Elsősorban prenatális diagnosztika esetében alkalmazzuk.

c) Kvantitatív real-time PCR az SMN1 és SMN2 kópiaszám meghatározására. A kvantitatív real-time PCR az alábbi vizsgálatokra alkalmazható: Hordozóság szűrés: SMN1 kópiaszám alapján. Fenotípus előrejelzése: SMN2 kópiaszám alapján Compound heterozigóták azonosítása (deléció/egyéb mutáció).

A módszer korlátai (93,5%-os szenzitivitás):

- az egyének 4%-ában egyik kromoszómán több SMN1 kópia van jelen; ebben az esetben a hordozót nem azonosítja.
- az intragenikus mutációt hordozót nem azonosítja.

7. ábra. SMN1 és SMN2 exon 7. és exon 8. mutáció analízise. 133/3 minta homozigóta deléciót mutat



8. ábra. SMN1 gén exon 7. real-time PCR amplifikációs görbéje, valamint az olvadási hőmérséklet csúcsok SMN1 exon 7. és a referencia albumin gén esetében

Hazai spinalis izomatropia családok

265 családban genetikailag igazoltuk a betegséget. Ezek fenotípusos megoszlása a következő: SMA I. típus 136, SMA II: típus 62, SMA III. típus 67, bizonytalan 75. Kiemelve 17 összetett heterozigóta.

Prenatális vizsgálatok 1993 óta 182 esetben végeztünk (SMA I: 141, SMA II: 34, SMA III:7); ennek eredménye 132 egészséges, 50 beteg magzat.

Neuromusculáris betegségek (NMD) és terápiás lehetőségük

Jelenleg gyógyíthatatlan betegségcsoport, de terápiás módszerek kidolgozás alatt állnak. Egyénekenként ritka betegségcsoport (<5/10,000) – szükséges egy európai betegadatbázis létrehozása, a klinikai kipróbálás összehangolásához.

A TREAT-NMD konzorcium struktúrája

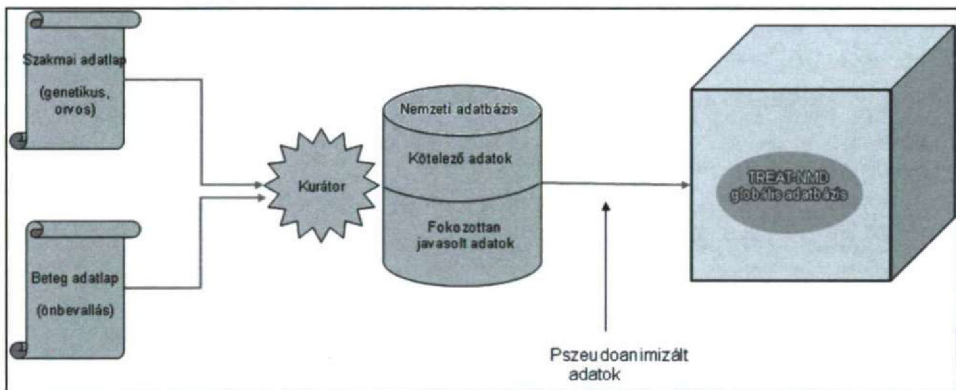
EU FP6 által támogatott projekt, 2007 – 2011. periódusban. Partnerei: 11 európai ország, 21 partner (klinikusok, kutatók, betegszervezetek, gyógyszer-, biotechnológiai cégek). A konzorcium célja: örökletes neuromuscularis betegségek, elsősorban (SMA, DMD) terápiájának kidolgozása és a klinikai kipróbálás európai összehangolása. 16 munkacsoportból áll (állat- és sejtszintű modellek, molekuláris diagnosztika fejlesztése, ápolás standardizálása, betegek felkutatása, terápia – toxikológia, szisztémás bejuttatás, multicentrumos klinikai kipróbálás, etika). Az OKI feladata: kelet-európai SMA és DMD beteg-adatbázis létrehozása a pontos genetikai diagnózis birtokában.

Az adatbázis létrehozásához a betegeknek beleegyező nyilatkozatot, valamint a következő DMD/BMD ill. SMA klinikai kérdőívet küldjük ki:

Kötelező adatok

- beteg személyes adatai (név, lakcím, TAJ szám, stb.)
- mi az orvosa által felállított diagnózis?
- mi a beteg genetikai tesztjének eredménye?

- jelenlegi legjobb motoros teljesítmény
- ha a beteg 3 éves vagy annál idősebb, használ-e tolószéket?
- jelenleg szed a beteg szteroidokat izomdystrophiára?
- volt-e a betegnek műtete scoliosis (gerincferdülés) miatt?
- fokozottan ajánlott adatok:
- volt a beteg családjában valakinek hasonló betegsége?
- diagnosztizáltak-e a betegnél cardiomyopathiát?
- kap-e a beteg jelenleg gyógyszeres kezelést a szívére?
- használ-e rendszeresen nem-invazív lélegeztető készüléket?
- használ-e a beteg invazív lélegeztetést?
- regisztrálva van-e a beteg más DMD beteg-adatbázisban?
- volt-e a betegnek izombiopsziája?



9. ábra. Harmonizált, tartós és releváns biobankok és beteg-adatbázisok létrehozása

Terápiás lehetőségek

Támogató: ortopédiai, légzés. *Megelőző:* genetikai tanácsadás, prenatális vizsgálat, preimplantációs genetika, egyéb. *Gyógyító:* farmakológiai (sérült fehérje külső bejuttatása, funkcionálisan rokon fehérje fokozása vagy közvetve izom degeneráció gátlása), sejt-terápia (embrionális ill. szöveti őssejtek), génterápia (transzgén bejuttatása különböző módon).

Terápiás eljárások DMD betegség esetében

Gén transzfer

Az egészséges dystrophin gén bevitele a sejtbe vektor segítségével, amely lehet:

- vírus-mediált: Hátránya, hogy erős immunválaszt indukálhat, valamint, hogy korlátozott klónozó kapacitással rendelkezik. Jelenleg

a legjobb vector az adeno-associated virus (AAV): csökkent immunválasz, mini-dystrophin gén bevitelle lehetséges, amely BMD fenotípussá módosíthatja a DMD fenotípust

- nem virus-mediált: Plazmid DNS. Nincs immunválasz a plazmid és az új dystrophin fehérje ellen. Jelenleg elért legjobb határfok: az izomrostok 10%-ába épült be a transzsgén
- celluláris transzfer: Myoblast transzfer: A donor izom prekursor sejtek (myoblastok) bejuttatása a beteg izomba. Hátránya, hogy immunválasz alakul ki a donor myoblastok ellen
- őssejtek (szatellita sejtek, mesangioblastok, embrionális őssejtek). Pótolhatják az elpusztult izmot.

Gén repair

Antiszenz oligonukleotidok (AON): exon-skipping (bizonyos exonok átugrása) történik mesterséges ribonukleotidokkal, amely leolvasási keret eltolást eredményez, így BMD fenotípus alakítható ki a DMD helyett.

Kompenzáló fehérjék túltermeltetése

Utrophin: 80% hasonlóság a dystrophin fehérjével, így képes átvenni a dystrophin szerepét. Bevitel az izomba vírus vektorral történhet.

Gyógyszeres kezelés

Stop kodon átugrás. Aminosav beépítése a stop kód helyére. Szóbagyhető szerek: Gentamicin (toxikus), Negamicin, valamint a PTC 124 nevű vegyület, amely kipróbálás alatt van. Lehetséges még az IGF-1 (inzulinszerű növekedési faktor) fokozása is. Sejtdifferenciáció szabályozás.

Myostatin gátlás. Gátolja az izom szatellita sejtjeinek osztódását. Gátlásával (follisztatin) mdx egérben növekedett az izomtömeg és az izomerő.

Glükokortikoidok/szteroidok

Prednisolon: Lassítja a betegség progresszióját, azonban sok mellékhatása van. Deflazacort: Kevésbé súlyos mellékhatások. Megnövekedett tüdőfunkció, növeli az utrophin termelést is.

- növekedési faktorok: izomtömeg növelésre
- kalcium homeosztázis fenntartása
- proteáz gátlók: szójabab kivonat

Étrend kiegészítők: aminosavak, karnitin, kreatin, antioxidánsok (koenzim Q10, zöldtea kivonat – Protandim).

Terápia SMA betegségben

Gén módosítás: SMN2 génből teljes hosszúságú-SMN fehérje leolvasására. mRNS kivágását módosító vegyületek.

Promoter aktiváló és SMN2 transzkripciót fokozó hiszton deacetiláz gátlók.

Nem az SMN gén módosítása

- SMN fehérje komplex egyéb tagjainak fokozása
- trofikus faktorok a motoneuronok működésében
- neuroprotektív, neurotrofikus vegyületek a sejtpusztulás megakadályozására:
- riluzole, Cardiotrophin-1 (IL-6 cytokine család tagja)
- trophos: mitochondriális permeabilitás átmeneti membrán pórus (mPTP) funkciójának javítása

Lentivirus gén-transzfer (SMA egérben ill. SMA fibroblasztokban működik).

Oligonukleotidok: 7. exonhoz kapcsolódnak, ún. splicing faktorokat vonzanak.

Kis fragmens homológ kicserélés (SHFR) – T>C báziscsere az SMN2. Exonban teljes hosszúságú fehérje előállítására.

Össejtterápia – problémák

- össejtek differenciációja a megfelelő sejttypussá
- gerincvelőből kilépés és izomkontaktus kialakítása
- embrionális össejtek tumorképződést indukálhatnak

Összefoglalás

Neuromuscularis betegségek ritka betegségek – fontos, hogy a klinikai kipróbálás kritériumainak eleget tevő betegek Európa-szerte elérhetőek legyenek

Korszerű terápiás eljárások kidolgozása, majd kipróbálása a betegségek gyógyítása érdekében

Elsődleges feladat: nemzeti adatbázisok létrehozása, európai ill. globális adatbázisba összegzés

Klinikusok és betegszervezetek bevonása elsődleges fontosságú

Hatékony kezelés lehetősége, európai szinten összehangolt, standardizált protokoll szerint történik majd meg

Betegek részvétele önkéntes (adatbázis, klinikai kipróbálás)

EU FP6 által támogatott TREAT-NMD konzorcium segítségével valósulnak meg a célok

Elérhetőség: www.treat-nmd.eu, karcagi.veronika@oki.antsz.hu