

A link protein szerepe az osteochondrogenesisben Egy állatkísérletes osteochondrodysplasia modell és génterápiája

DR CZIPRI MÁTYÁS¹, DR THAN PÉTER², DR VERMES CSABA²

Érkezett: 2015. március 2.

DOI: 10.21755/MTO.2015.058.0203.005

ÖSSZEFOGLALÁS

A szerzők egy génmutáción alapuló állatkísérletes modellt ismertetnek, amely alkalmas osteochondrodysplasiák modellezésére és vizsgálatára. Hasonló modellek segítséget nyújtanak a humán chondrodysplasiák kutatásában és genetikai hátterük felderítésében. A modell a hyalin porc extracelluláris mátrixában előforduló egyik strukturális molekula, a link protein célzott mutációval kiváltott hiányán, illetve annak transzgenek által történő, különböző mennyiségű visszapótlásán alapul. A homozygota mutáció súlyos chondrodysplasiát eredményez, és letális. A különböző mennyiségben helyreállított link protein szintézis biztosítja a túlélést és a skeletális elváltozások dózis dependens gyógyulását eredményezi. A modell a génterápia lehetőségét is magában hordja.

Kulcsszavak: *Állatkísérlet; Extracellularis mátrix fehérjék; Génterápia; Protein; Osteochondrodysplasiák;*

M. Czipri, P. Than, Cs. Vermes: The role of link protein in osteochondrogenesis: an experimental animal model of osteochondrodysplasia with genetic rescue

Authors present an experimental animal model that is based on a genetic mutation and allows to model and investigate osteochondrodysplasias. Similar models are helpful in the research of human osteochondrodysplasias to explore their genetic background. This model is based on the lack of a cartilage extracellular matrix protein, the link protein and its restoration in different amounts, caused by the targeted mutation of the link protein gene and its replacement with a transgene. The homozygous mutation results in severe osteochondrodysplasia and is lethal. When the link protein synthesis is restored at different levels, it prevents perinatal death and cures the skeletal changes in a dose-dependent manner.

Keywords: *Animals; Cartilage; Extracellular matrix proteins; Models, genetic; Proteins – Genetics; Osteochondrodysplasias;*

BEVEZETÉS

Az osteochondrodysplasiák az osteochondralis szövetek örökletes, generalizált fejlődési zavarai. Az egyes chondrodysplasiák előfordulása ritka, de együttesen az előfordulási gyakoriságuk közel 1/5000 (8). A jelenleg ismert több mint 350 kórkép genetikailag heterogén csoportot alkot. Ezen kórképek osztályozása korábban pusztán klinikai megjelenés és radiológiai jellegzetességek alapján történt, de genetikai háttérük robbanásszerű feltérképezése lehetőséget ad a hasonló molekuláris háttérű betegségcsoportok családokba sorolására, és újabb kutatási irányok kijelölésére (8, 13, 17).

A csontrendszer kialakulása az embrionális korban, és növekedése a születés után döntően az enchondralis csontosodás mechanizmusán keresztül valósul meg. Az embrionális mesenchyma kondenzálódása után chondrocyták jelennek meg és extracellularis mátrix (ECM) termelésükkel létrehozzák a későbbi csontok porcos alapját. Az enchondralis csontosodás során a diaphysisben kezdődve a porcsejtek hypertrophyzálódnak, extracellularis mátrix termelésük megváltozik, erek betörését és ezzel csont progenitor sejtek érkezését segítve elő. A folyamat a csontvégek felé haladva létrehozza az embrionális csontok diaphysisét és metaphysisét, de a végekhez közeledve a csontosodási zónától distalisan chondrocyták proliferációja indul meg, létrehozva a növekedési porcot. Ezek a proliferáló porcsejtek a hypertrophyzálódás előtt de novo porcot termelnek, amely az epiphysis fuga porcállományát alkotja. A növekedési porc folyamatosan újratermelődő porcállománya megvédi a porcos epiphysist az elcsontosodástól, valamint alapot biztosít a chondrocyták differenciálódására (prehypertrophia, hypertrophia) és ezzel biztosítja a lineáris csontnövekedést. A porcos epiphysisek centrumában beinduló chondrocyta differenciálódással pedig megkezdődik az epiphysis csontmagok kialakulása az előbbiekhöz hasonló események eredményeként (5). Ezen összetett folyamatok időben és térben specifikus és direkt genetikai kontroll alatt állnak (8).

A chondrocyták által termelt fehérjék építik fel a porc ECM-jét, amelynek épsége

egyik alapfeltétele a hibátlan skeletális fejlődésnek. A hyalin porc ECM strukturális molekulái a kollagének, proteoglikánok, glikoproteinek és glükózaminoglikánok. A porc legfőbb fibrilláris alkotóeleme a II-es típusú kollagén, de kisebb mennyiségben más porc-specifikus kollagének is jelen vannak, mint a IX-es és XI-es típusú, valamint a kizárólag a növekedési porc hypertrophyás zónájában jelen levő X-es típusú kollagén (3, 7). Ezen fehérjéket kódoló gének mutációja áll sok jól ismert osteochondrodysplasia háttérében (6).

A porc ECM legnagyobb mennyiségben jelen lévő, nem kollagén típusú makromolekulája az aggregán, amely egy nagy molekulású, hyaluronsav (HA) kötő képességgel rendelkező proteoglikán. A molekulához nagyszámú chondroitin-szulfát (glükózaminoglikán) oldallánc kapcsolódik, és legfőbb jellemzője, hogy egy centrális HA molekulához nagy számban kapcsolódva óriás aggregátumokat hoz létre. Az aggregán-HA kapcsolatot egy harmadik molekuláris szereplő, a porc link proteín (cartilage link proteín, LP) stabilizálja. A kis molekulású (46 kDa) glikoproteín legfőbb tulajdonsága, hogy HA kötő képességgel rendelkezik. Stabilizáló hatását úgy fejt ki, hogy egyszerre kötődik a HA szálhoz és a vele szomszédos aggregán molekulához (4). LP nélkül ezen aggregátumok nagysága és stabilitása jelentősen csökken (12), megváltoztatva az ECM összetételét és tulajdonságait. Tekintve a proteoglikánok és glikoproteinek szerepét az ECM felépítésében, az ezeket érintő mutációk kis száma meglepő. A két ismert aggregán mutációra csak az utóbbi időben derült fény (8). LP mutáció mindmáig nem ismeretes egyik osteochondrodysplasia háttérében sem.

A dolgozat célja egy olyan állatkísérletes modell bemutatása, amely bizonyítja a LP szerepét a chondrogenézisben a fehérje hiánya vagy csökkent mennyisége által előidézett osteochondrodysplasia vizsgálatán keresztül. Ugyanakkor bizonyítja, hogy a fehérjeszintézis helyreállítása dózis dependens módon gyógyulást eredményez.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A jelen tanulmány alapjául szolgáló, és alábbiakban ismertetett kísérleteket a chicagói Rush Medical Center, Department of

Orthopaedic Surgery, Section of Biochemistry and Molecular Biology laboratóriumában végeztük.

A link protein gén manipulációja

A modell létrehozásához két genetikailag manipulált egértörzsrre volt szükség. Egyrészt olyan állatokra, amelyek LP-t kódoló génje célzott mutáció (gene knockout) következtében működésképtelen, ezért fehérjét nem termel. Heterozigóta mutáció esetén ($LP^{+/-}$) az egyedek normálisan fejlődnek, homozigóta mutáció ($LP^{-/-}$) azonban súlyos osteochondrodysplasiát okoz perinatális letalitással (16). A heterozigóta tenyésztelést a National Institute of Health, Craniofacial Developmental Biology and Regeneration Branch laboratóriumából kaptuk.

Másrészt szükség volt olyan állatokra, amelyek a LP-t feleslegben termelik. Ezeket az úgynevezett transzgenikus egereket a chicagói laboratóriumban állítottuk elő. A transzgenikus egerek genomja a saját link protein génjükön kívül egy porcspecifikus vektor segítségével bejuttatva további LP géneket (gén másolatokat) is tartalmazott (2). A tenyésztés során két törzs mutatott stabil transzgen expressziót, a transzgenikus A és C törzs (LP^{TgA} és LP^{TgC}).

A kísérlet során olyan állatok kitenyésztése volt a cél a két törzs (knockout és transzgenikus) keresztezésével, amelyek saját LP génjüket tekintve homozigóta mutánsok, ugyanakkor hordozzák a transzgént. A tenyésztés során az utód generációk egyedeinek genotípusát meghatároztuk, és mind a knockout mutációt, mind a transzgént hordozó egyedeket kereszteztük tovább. A kívánt genotípusú, transzgént hordozó homozigóta mutánsok ($LP^{-/-TgA+}$ és $LP^{-/-TgC+}$) a második generációban jelentek meg. Feltételeztük, hogy a transzgenek által biztosított fehérjetermelés pótolja a kiesett saját fehérjetermelést, és terápiás hatással lesz az osteochondrodysplasia elváltozásaira, de legalábbis elősegíti az egyedek túlélését.

A link protein génexpresszió mérése

A porc LP gén expresszióját real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-QT-PCR) segítségével (Smart Cycler System, Cepheid, Sunnyvale, CA) mértük. Az analízishez szükséges komplementer DNS (cDNS)

mintákat újszülött egerek porcmintáiból kivont RNS-t használva állítottuk elő reverz transzkripcióval. Minden genotípushoz tartozóan három különböző alomból származó, kilenc állat két független mintáját használtuk, és mintánként három mérést végeztünk. A reakció oldathoz LP génspecifikus primereket használtunk, és a gén expressziót a dupla szálú DNS-hez kötődő CYBR green festék fluoreszcenciáját valós időben (real time) mérve határoztuk meg.

A link protein mérése

Az LP fehérje termelés detektálása és kvantitatív analízise újszülött egerek skeletális szöveteiből készült extraktumokon, Western blot segítségével történt. Genotípusonként három vagy négy alomból származó, 9 állat fehérjemintáin végeztünk méréseket, mintánként három alkalommal. A mélyfagyasztott és porított porc mintákból a fehérje extrakció 4 mólos guanidinium klorid oldatban történt, majd a minták azok dialízise, liofilizálása és normalizálása után kerültek felhasználásra Western blot analízishez. A fehérjéket 10%-os SDS-polyacrylamide gélen szeparáltuk, majd nitrocellulóz filterre való átvitelt követően nyúlban termeltetett LP ellenes poliklonális antitestekkel kezeltük. A másodjára hozzáadott, peroxidázzal jelölt, kecskében termeltetett nyúl-ellenes antitest a végül hozzáadott luminol szubsztráttal kemilumineszcens reakciót váltott ki. A felszabaduló fényjelenséget, amely arányos a minta LP tartalmával, röntgenfilmen rögzítettük. Előhívás után az eredményeket PDI gél scanner és szoftver segítségével értékeltük (Protein Database Inc., Huntington Station, NY).

Morfológiai vizsgálatok

Az osteochondralis szövetek hisztológiai vizsgálathoz kéthetes egerekből készült metszeteket használtunk. A mintákat 10%-os formalinban fixáltuk, majd 12 napig 4 °C-on 10%-os EDTA oldatban való dekalcinálás után paraffinba ágyztuk. A metszetek festése safranin O és fast green kombinációjával történt. A készítményeket fénymikroszkóppal vizsgáltuk. A csontrendszer minőségi és mérhető változásait az állatokról készült röntgenfelvételeken tanulmányoztuk.

Statistikai analízis

Leíró statisztikát alkalmaztunk a csoport-átlagok, standard deviációk megállapítására. Több csoport összehasonlításánál MANOVA analízist végeztünk, két kijelölt csoport összehasonlításánál Student T tesztet alkalmaztunk Bonferroni korrekcióval. A szignifikanciát a $p < 0,01$ szinten állapítottuk meg. A statisztikai számításokat az SPSS 10.0 statisztikai programmal végeztük (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)

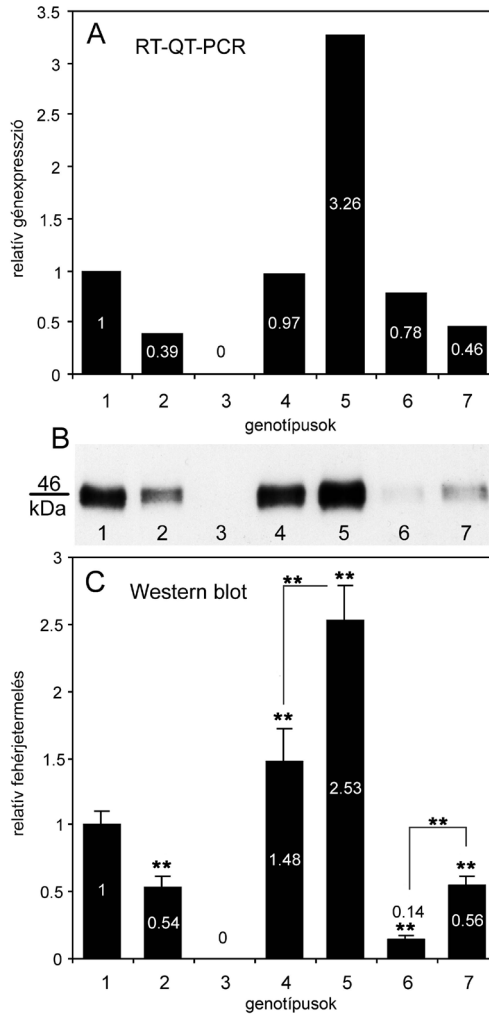
EREDMÉNYEK

A genetikailag manipulált egerek túlélése

A kiindulási feltételezésnek megfelelően azok az egyedek, amelyeknek saját LP termelésük a homozigóta mutáció miatt nem volt, de valamelyik transzgént hordozták ($LP^{-/-TgA^+}$ vagy $LP^{-/-TgC^+}$) túléltek. Különbség volt azonban a túlélési arányokban annak megfelelően, hogy a túlélést biztosító transzgén az A, vagy a C transzgenikus törzsből származott. A túlélési arányok a harmadik generációban stabilizálódtak úgy hogy az A transzgént hordozó homozigóta knockout egerek (túlélő A csoport) aránya 12,9%, a C transzgént hordozó homozigóta knockout egerek (túlélő C csoport) aránya pedig 21,1% volt az összes élve születésre számítva. Összehasonlításul, a szelektív tenyésztés során a Mendeli szabályok szerint, valamint a homozigóta mutánsok szükségszerű perinatális pusztulásával is számolva a harmadik generációban várható túlélési arány 29,3%-ban jósolható.

A genetikailag manipulált egerek génexpressziója és protein termelése

Heterozigóta knockout egerekben ($LP^{+/-}$) az LP génexpresszió kevesebb, mint fele volt mérhető, míg a fehérjetermelés $54 \pm 7\%$ volt a vad típusú ($LP^{+/+}$) kontrollhoz képest (1. A–C ábra, 2. oszlop), ugyanakkor ezen egerek skeletális fejlődése, és születési aránya fiziológiás maradt. A homozigóta LP deficiens egerekben ($LP^{-/-}$) sem LP génexpresszió, sem fehérjetermelés nem volt kimutatható (1. A–C ábra, 3. oszlop). A real time PCR mérések nem igazoltak magasabb LP génexpressziót a transzgenikus A törzsből (LP^{TgA}) (1. A ábra, 4. oszlop). Ugyanakkor a termelt LP fehérje mennyisége mintegy 50%-kal ($48 \pm 24\%$) magasabb volt, mint a vad típusú kontrollban (1. C ábra, 4. oszlop). A transzgenikus C törzsből (LP^{TgC}) az LP génexpresszió legalább háromszoros volt a kontrollhoz képest (1. A ábra, 5. oszlop). Ugyanitt, a megnövekedett génexpresszióval társultan a porc LP fehérje tartalma $153 \pm 21\%$ -kal volt magasabb (1. C ábra, 5. oszlop). Mindkét túlélő csoportban alacsonyabb volt a mért LP génexpresszió a vad típusú kontrollhoz viszonyítva úgy, hogy nem várt módon a túlélő A csoport ($LP^{-/-TgA^+}$) génexpressziója magasabb volt, mint a túlélő C csoport ($LP^{-/-TgC^+}$) génexpressziója (1. A ábra, 6–7. oszlop). Ezzel ellentétben az LP fehérjetermelés a túlélő C csoportban volt magasabb, a kontrollhoz képest annak valamivel több, mint fele ($56 \pm 6\%$) (1. C ábra, 7. oszlop). A túlélő A csoportban



1. ábra

LP géneexpresszió és fehérjetermelés kvantitatív analízise. A géneexpresszió mért különbségeit az A, a fehérjetermelés mért különbségeit a C ábra foglalja össze. Mindkét esetben az adatok a kontroll vad típushoz viszonyított relatív expressziót mutatják. A B ábra egy reprezentatív Western blot analízis eredményét szemlélteti. A szignifikáns különbségeket kettős csillag jelöli (**= $p < 0,01$).

A különböző genotípusokat jelölő számok:

1. kontroll vad típus ($LP^{+/+}$);
2. heterozigóta LP knockout ($LP^{+/-}$);
3. homozigóta LP knockout ($LP^{-/-}$);
4. LP transzgenikus A (LP^{TgA});
5. LP transzgenikus C (LP^{TgC});
6. túlélő A csoport ($LP^{-/-TgA+}$);
7. túlélő C csoport ($LP^{-/-TgC+}$);

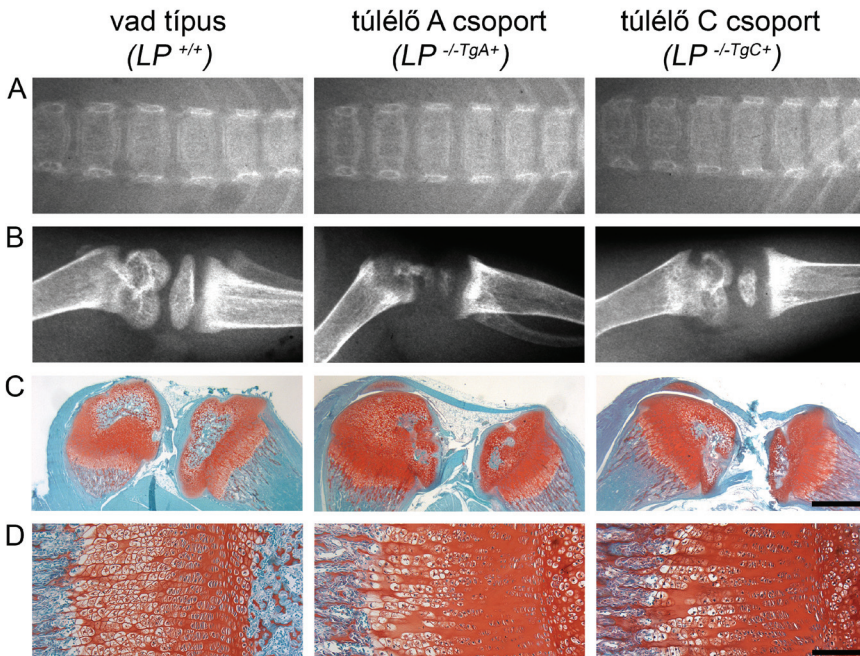
ennél kevesebb, csupán $14\pm 3\%$ volt mérhető (1. C ábra, 6. oszlop). A fehérjetermelés változásai minden csoportban szignifikánsak voltak ($p < 0,01$) a vad típusú kontrollhoz képest. Szignifikáns volt ($p < 0,01$) a különbség a két transzgenikus törzs és a két túlélő csoport között is (1. C ábra, 4–5. és 6–7. oszlop).

A túlélő csoportok fenotípusa

A két különböző túlélő csoportban (A és C) a transzgenek (TgA és TgC) által biztosított fehérje produkció eltérő szintjének megfelelően szignifikáns különbségek voltak megfigyelhetők. Azon túlmenően, hogy az alacsonyabb LP szintézist mutató A csoport túlélési aránya elmaradt az erősebb C csoport túlélése mögött, ezeket az állatokat szignifikánsan súlyosabb osteochondrodysplasiás elváltozások jellemezték. A túlélő A csoport egyedei születéskor jóval kisebbek voltak társaiknál. Mind a törzs, mind a végtagok rövidebbek voltak, és jelentős különbségek voltak a fej nagyságában és alakjában. Az állatok orra megrövidült, a fej anteroposterior átmérője kisebb volt, az agykoponya kupolaszerű megjelenést mutatott.

A törpe növés az egyedek fejlődése során egyre kifejezettebbé vált. A hosszú csöves csontok epiphysis magjai késve jelentek meg, de a csontok meta-, és diaphysisén nem voltak morfológiai eltérések (2. B–C ábra), eltekintve az átlagosan 15%-os rövidüléstől. A gerinc csigolyatestei ellapultak (2. A ábra), és jelentős sagittalis síkú görbületek alakultak ki, amelyek az életkor előrehaladtával fokozódtak. A felső thoracalis szakaszon hyperlordosis, az alsó thoracalis szakaszon hyperkyphosis alakult ki. A túlélő C csoportban ezzel szemben csak nagyon enyhe skeletális elváltozások voltak megfigyelhetők (2. A–C ábra).

A növekedési porc felépítésében is jelentős eltérések voltak, elsősorban a túlélő A csoportban (2. D ábra). A növekedési porc kiszélesedett és jóval sejtsegyebb volt a kontrollnál, de a C csoport osteochondrodysplasiásaihoz viszonyítva is. A porcsejtek számának csökkenése megfigyelhető volt a proliferációs, a prehypertrophiás, és a hypertrophiás zónában egyaránt. A sejtek oszlopokba rendeződése a hypertrophiás zónában megmaradt, de a másik két zónában



2. ábra Kéthetes egerek gerinc (A) és térd (B) röntgenfelvételei, valamint térdízületek (C) és proximalis tibia növekedési porcból készült metszetek (D) safranin O/ fast green festéssel. Vonalak: C. 1mm, D. 200µm.

többé-kevésbé fellazult, amely a növekedési porc struktúrájának felbomlását eredményezte. A szükségszerűen megnövekedett mennyiségű ECM proteoglikánokhoz kötődő safranin O festődése megmaradt mindkét túlélő csoportban. A kalcifikációs zónában kialakuló csontgerendák is elsősorban a túlélő A csoportban voltak vékonyabbak.

MEGBESZÉLÉS

A humán osteochondrodysplasiák azon csoportját, amelyek háttérben a porc extracelluláris mátrixának strukturális fehérjéit kódoló gének mutációja áll, meglehetősen jól ismerjük. Ezek döntő többségét a porcspecifikus kollagének génmutációi okozzák (17). A porcban legnagyobb mennyiségben jelen lévő II-es típusú kollagént kódoló gén mutációi okozzák a spondyloepiphysealis dysplasia (SED) csoport kórképeit. Ide tartoznak a spektrum súlyosabb végét képviselő II-es típusú achondroplasia és hypochondrogenesis, a közepes súlyosságú SED congenita valamint a Stickler és Kniest dysplasiák. A spektrum enyhébb végén a SED tarda áll (6). A IX-es típusú kollagén defektusai multiplex epiphysealis dysplasiák (MED) két vagy több variánsát is okozzák (6). A XI-es típusú kollagén mutációja okozza például az oto-spondylo-megaepiphysealis dysplasiát, míg a X-es típusú kollagén mutációja Schmid-féle metaphysealis dysplasiát eredményez (6, 8, 13). A porc ECM glikoproteinjeit érintő ismert mutációk egyike a cartilage oligomeric matrix proteint (COMP), a másik a matrilin-3 fehérjét kódoló géneket érinti. A COMP mutáció felelős a pseudoachondroplasia és a Fairbanks típusú MED kialakulásáért, a matrilin-3 gén mutációja is egy MED variáns okoz (8, 13, 17). Sokáig az egyetlen ismert proteoglikán mutáció a perlekánt érintette (dyssegmentális dysplasia, Schwarz–Jampel szindróma) (13), és csak az utóbbi időben derült fény a porc legfőbb proteoglikánjának, az aggregánnak a mutációira. Két kórkép tartozik ide: egy autoszomális domináns öröklődésű, enyhe arányos alacsonynövést és korai arthrosist okozó Kimberly-féle SED, és egy súlyos törpeséggel és facialis dysmorphissal (arckoponya hypoplasia) járó recesszíven öröklődő, úgynevezett aggregán típusú

spondyloepimetaphysealis dysplasia (8). Ismerve az aggregán, mint strukturális építőelem jelentőségét a porc ECM óriás aggregátumainak felépítésében és a porc mechanikai tulajdonságainak kialakításában, valamint ismerve hogy ezen funkcióhoz szükség van egy másik strukturális glikoproteinre a HA szálhoz való kötődés stabilizálásához, joggal feltételezhetjük, hogy ezen stabilizáló molekula, az LP defektusa is okozhat porc strukturális eltéréseket és humán osteochondrodysplasiát. Megjegyzendő, hogy a molekula szerepét humán osteochondrodysplasiák háttérben korábban, az akkori tudásnak megfelelően, kizárták (11).

A humán kórképekkel párhuzamba állíthatók állatokon (jelen esetben egereken) kialakuló osteochondrodysplasiák, amelyek vagy természetesen előforduló spontán mutációkon, vagy mesterségesen előidézett mutációkon alapulnak. Egereken ismert a XI-es típusú kollagén mutációja által okozott autoszomális recesszív öröklődésű osteochondrodysplasia (cho egerek). Az érintett egyedek végtagjai aránytalanul megrövidültek, szápadhasadék és pulmonalis hypoplasia jellemzi őket. Születéskor a trachea kollapszusa halált okoz (10). Egy másik ismert autoszomális recesszíven öröklődő mutáció az egér aggregán gént érinti, és szintén letális osteochondrodysplasiát okoz (cmd egerek). Az érintett egyedek aránytalan törpék rövidült végtagokkal, szápadhasadékkal, rövidült orral és a születéskor légzési elégtelenség miatti halállal (14). A heterozigótákon hosszú távon gerincdeformitások alakulnak ki enyhe törpeség mellett (15). A II-es típusú kollagén célzott mutációja a fenti-ekhez hasonló osteochondrodysplasiás fenotípust és perinatális letalitást okoz (9). Az LP mesterségesen előidézett célzott mutációja a homozigóta egyedeken súlyos letális osteochondrodysplasiát okoz, de a heterozigóták normálisan fejlődnek (egy ilyen heterozigóta szerepelt a jelen tanulmány kísérleteinek egyik kiindulási pontjaként). Az érintett állatok törzse és végtagjai megrövidültek, a fej jellegzetesen kupolyszerű megjelenést mutat megrövidült orral. A perinatális letalitásért itt is a légzési elégtelenség felelős, amit a respiratorikus rendszer porcos eleminek fejletlensége okoz (16). Látható tehát, hogy minden egyes strukturális molekula teljes

hiánya súlyos letális osteochondrodysplasiát okoz, ami nem ad lehetőséget a csontrendszer fejlődésének további tanulmányozására újszülött kor után. A mutációra heterozigóták fenotípusa ugyanakkor fiziológias.

A jelen tanulmányban ismertetett állatmodellen az LP szintézis különböző mennyiségben történő helyreállítása képes volt megváltoztatni a súlyos kimenetelű osteochondrodysplasiát. A transzgének által diktált LP fehérjetermelés biztosította a homozigóta knockout egerek túlélését, és azok felnőtt kort érték meg. Ezen túlmenően, a termelt LP mennyiségétől függően enyhültek az osteochondrodystrophiás elváltozások. A túlélő A csoportban, ahol a fehérjetermelés a normális szint 14%-a volt, az egyedek ugyan túléltek, de markáns osteochondrodysplasiás elváltozásokat mutattak. A törpenövés a végtagok és a törzs jelentős rövidülésével, platyspondyliával és gerincdeformitásokkal járt, az arckoponya hypoplasiajával együtt. Ez a fenotípus a legtöbb hasonlóságot a humán SED csoportba tartozó kórképekkel mutat, amelyeknek jellegzetességei a rövidült törzs és végtagok okozta törpenövés, valamint maxillofacialis hypoplasia, szápadhasadék, szem és belső fül eltérések (1). A legjobb analógiát a közepesen súlyos humán SED congenita nyújtja, ahol a törzs és végtagok jelentősen rövidültek, az ossificatio megkészt (egérben: lásd 2. B ábra), platyspondylia alakul ki (egérben: lásd 2. A ábra), dorsolumbalis kyphosis és kyphoscoliosis (egérben: thoracalis hyperlordosis és hyperkyphosis) van jelen. A túlélő C csoportban, ahol a normális fehérjetermelés 56%-a volt mérhető, rendkívül enyhe skeletális elváltozások maradtak vissza, amely az LP hiánya által kiváltott osteochondrodysplasia sikeres génterápiáját jelenti.

Modellünket összevetve az irodalomban fellelhető, és korábban említett, spontán vagy mesterségesen előidézett porc ECM protein mutáción alapuló osteochondrodysplasia modellekkel, az alapvető különbség a kiváltó fehérje hiány „szabályozott” volta. Látható, hogy minden egyes strukturális molekula (XI-es és II-es típusú kollegén, aggregán, LP) teljes hiánya súlyos letális osteochondrodysplasiát okoz (9, 10, 15, 16), ami nem ad lehetőséget a csontrendszer fejlődésének további tanulmányozására újszülött kor után. A mutációra heterozigóták fenotípusa ugyanakkor fiziológias. A szerzők tudomása szerint az itt bemutatott modell egyedülálló abban a tekintetben, hogy lehetőséget ad az osteochondrodysplasia jellegzetességeinek nyomon követésére születés után, valamint támpontot ad arra vonatkozóan, hogy egy adott strukturális molekula milyen mértékű hiánya vezet letalitáshoz, vagy csontrendszeri eltérések megjelenéséhez.

Eredményeink bizonyítják egyetlen strukturális protein jelentőségét a porc ECM szerkezetének fenntartásában, a chondrogenézisben és a skeletális fejlődésben. Annak ellenére, hogy az LP szerepére humán osteochondrodysplasiák kialakulásában mindmáig nincs bizonyíték, nem kizárható, hogy létezik olyan osteochondrodysplasia, amelynek okozója az LP gén mutációja. Modellünk alapján spondyloepiphysealis megjelenés jósolható, és valószínűleg recesszív öröklésment. Az is lehetséges azonban, hogy az LP szerepe túlmutat egy egyszerű strukturális ECM molekulán, és kiesése már az intrauterin élet során súlyos következményekkel járva magzati halálhoz vezet, ami az osteochondrodysplasiás fenotípus klinikai megfigyelését lehetetlenné teszi.

IRODALOM

1. Bálint G., Szebenyi B.: *Hereditary disorders mimicking and/or causing premature osteoarthritis. Bailliere's Clinical Rheumatology.* 2000. 14: 219-250.
2. Czipri M., Otto J. M., Cs-Szabó G., Kamath R. V., Vermes C., Firneisz G., Kolman K. J., Watanabe H., Li Y., Roughley P. J., Yamada Y., Olsen B. R., Glant T. T.: *Genetic rescue of chondrodysplasia and the perinatal lethal effect of cartilage link protein deficiency. J. Biol. Chem.* 2003. 278: 39214-39233.
3. Gannon J., Walker G., Fischer M., Carpenter R., Thompson Jr. R. C., Oegema Jr. T. R.: *Localization of type X collagen in canine growth plate and adult canine articular cartilage. J. Orthop. Res.* 1991. 1: 485-494.
4. Hardingham T. E.: *The role of link-protein in the structure of cartilage proteoglycan aggregates. Biochem. J.* 1979. 177: 237-247.
5. Horton W. A.: *In vitro chondrogenesis in human chondrodysplasias. Am. J. Med. Genet.* 1993. 45: 179-182.
6. Horton W. A.: *Progress in human chondrodysplasias: molecular genetics. Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1996. 785: 150-159.
7. Kannu P., Bateman J. F., Belluoccio D., Fosang A. J., Savarirayan R.: *Employing molecular genetics of chondrodysplasias to inform the study of osteoarthritis. Arthritis Rheum.* 2009. 60: 325-334.
8. Krakow D., Rimoin D.L.: *The skeletal dysplasias. Genetics in Medicine.* 2010. 12: 327-341.
9. Li S. W., Prockop D. J., Helminen H., Fassler R., Lapveteläinen T., Kiraly K., Peltari A., Arokoski J., Lui H., Arita M. et al.: *Transgenic mice with targeted inactivation of the Col2a1 gene for collagen II develop a skeleton with membranous and periosteal bone but no endochondral bone. Genes Dev.* 1995. 9: 2821-2830.
10. Li Y., Lacerda D. A., Warman M. L., Beier D. R., Yoshioka H., Ninomiya Y., Oxford J. T., Morris N. P., Andrikopoulos K, Ramirez F. et al.: *A fibrillar collagen gene, Col11a1, is essential for skeletal morphogenesis. Cell.* 1995. 80: 423-430.
11. Loughlin J., Irvén C., Sykes B.: *Exclusion of the cartilage link protein and the cartilage matrix protein genes as the mutant loci in several heritable chondrodysplasias. Hum. Genet.* 1994. 94: 698-700.
12. Morgelin M., Paulsson M., Hardingham T. E., Heinegård D., Engel J.: *Cartilage proteoglycans. Assembly with hyaluronate and link protein as studied by electron microscopy. Biochem. J.* 1988. 253: 175-185.
13. Superti-Furga A., Bonafe L., Rimoin D. L.: *Molecular-pathogenetic classification of genetic disorders of the skeleton. Am. J. Med. Genet.* 2001. 106: 282-293.
14. Watanabe H., Kimata K., Line S., Strong D., Gao L. Y., Kozak C. A., Yamada Y.: *Mouse cartilage matrix deficiency (cmd) caused by a 7 bp deletion in the aggrecan gene. Nature Genet.* 1994. 7: 154-157.
15. Watanabe H., Nakata K., Kimata K., Nakanishi I., Yamada Y.: *Dwarfism and age-associated spinal degeneration of heterozygote cmd mice defective in aggrecan. Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997. 94: 6943-6947.
16. Watanabe H., Yamada Y.: *Mice lacking link protein develop dwarfism and craniofacial abnormalities. Nature Genet.* 1999. 21: 225-229.
17. Warman M. L., Cormier-Daire V., Hall C., Krakow D., Lachman R., LeMerrer M., Mortier G., Mundlos S., Nishimura G., Rimoin D. L., Robertson S., Savarirayan R., Silience D., Spranger J., Unger S., Zabel B., Superti-Furga A.: *Nosology and classification of genetic skeletal disorders 2010 revision. Am. J. Med. Genet. Part A.* 2011. 155: 943-968.

Dr. Czipri Máttyás

Royal Devon and Exeter Hospital, Princess Elizabeth Orthopaedic Centre
Barrack Road, Exeter, UK, EX2 5DW
E-mail: matyas.czipri@nhs.net