

A propionsav metabolizmus veleszületett rendellenességei,
molekuláris genetikai háttere és a génterápia lehetőségei

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Dr Stankovics József

Programvezető:

Dr Sümegi Balázs egyetemi tanár

Témavezető:

Dr Melegh Béla egyetemi tanár

Pécsi Orvostudományi Egyetem, Pécs, 1999

Bevezetés

1. A propionsav metabolizmusa

Az emberi szervezetben a propionsav döntő többségében a különböző elágazó láncú aminosavak és a páratlan szénláncú zsírsavak lebontása során keletkezik, valamint kevésbé számottevő mértékben a táplálék emésztése során a béltraktusból szívódik fel. A propionsav derivatizációját követően a lebontás fő lépéseit a propionil-CoA karboxiláz, metilmalonil-CoA racemáz és metilmalonil-CoA mutáz enzimek katalizálják, melyet követően a keletkező szukcinil-CoA a Krebs ciklusba lépve metabolizálódik tovább.

2. A propionsav anyagcsere zavar veleszületett rendellenességei:

a.: propionil-CoA karboxiláz (PCC) deficiencia (propionsav acidaemia):

A PCC enzim - mely 6 α és 6 β alegységből álló dodekamer, és működéséhez biotin kofaktor szükséges. Klasszikusan két formáját ismerjük: *pccA* (McKusick 232000), mely az enzim α alegységének, illetve a *pccB* (McKusick 232050) mely az enzim β alegységének genetikai defektusából származik.

b.: metilmalonil-CoA racemáz deficiencia:

Az enzim a D-metilmalonil-CoA - L metilmalonil-CoA átalakulást katalizálja, működéséhez kofaktort nem igényel. Veleszületett hiányáról irodalmi közlés nincs.

c.: metilmalonil-CoA mutáz (MCM) deficiencia (metilmalonsav acidaemia):

Az apoenzim - mely két azonos alegységből felépülő homodimer - defektusai (McKusick: 251000) két nagy csoportba sorolhatók: **mut⁰**, mely esetben a defektív fehérjéből származó enzimaktivitás kevesebb, mint a normál aktivitás 0.1%-a. A **mut⁺** jelzésű csoportban az apoenzim kofaktoral szembeni megváltozott affinitásából eredően az enzimaktivitás a normál érték 2-75 %-a között változik.

A propionsav anyagcsere veleszületett rendellenességeire a gyakran már újszülött korban fellépő etetési nehézség, letargia, hányás, dehidráció, izomgyengeség, kóma jellemző. A túlélőkben számolni kell a periódusosan megjelenő metabolikus krízisekkel, melyek a növekedés elmaradásához, súlyos psychomotoros retardációhoz vezetnek. A betegség lefolyását és progresszióját a jelenleg rendelkezésünkre álló terápiás lehetőségek lényegileg nem befolyásolják.

Kísérleti célkitűzések:

1.: PCC deficiencia :

- megkíséreltük a funkcionális humán PCC α alegység cDNS-ének klónozását, miután feltételezhettük, hogy az irodalomból ismert génszekvencia hibás
- a klónozott cDNS expressziós vektorba történő beültetését és pccA defektusos humán fibroblaszt vonalakba történő bejuttatását követően vizsgáltuk a helyreállított enzimaktivitás mértékét
- vizsgáltuk a propionsav metabolizmus változását géntranszfert követően, a szomatikus génterápia lehetősége szempontjából

2.: MCM deficiencia:

- vizsgáltuk a propionsav metabolizmus változását az MCM enzim cDNS-ét tartalmazó expressziós vektor bejuttatását követően különböző humán sejtvonalakon (*mut*⁰ fibroblaszt, normál fibroblaszt, hepatoma, lymphoma sejtvonalak)
- vizsgáltuk a propionsav metabolizmus változását kevert sejtkultúrák tenyészetekben direkt sejtkontaktus mellett, vagy folyadékfázissal szeparáltan
- ezen kísérletek milyen adatokat szolgáltatnak az esetleges "metabolikus kooperáció" kimutatására, és ezen jelenség vonzata a génterápia szempontjából

3.: tranziens génátvitel és génexpresszió in vivo egér modellben:

Az asialoglycoprotein/polylysin/DNS komplexről igazolták ennek specifikus, a szisztémás keringésből a májsejt felszíni receptoron keresztül történő felvételét. Olyan komplexet használva, melynek DNS komponense a metilmalonil-CoA mutáz enzim cDNS-ének expressziós vektorát tartalmazta (ASO/PL/MCM-cDNS) vizsgáltuk a komplex szisztémás (egér färokvénán keresztüli) beadását követően:

- a szerv specifikitást különböző szövetek analízisével
- a máj által felvett expressziós vektor eliminációját
- az expressziós vektorról átitrt mRNS dinamikáját
- az expressziós vektor által létrehozott enzimaktivitást és annak dinamikáját
- az immunreakciót a komplex alkotóelemeivel szemben, ismételt intravénás bevitelt

Eredmények:

1. A propioil-Coa karboxilázal kapcsolatos kísérletek:

- a PCC enzim α alegységét két részletben sikerült klónozni. A cDNS 39-970 bp-ig terjedő szakaszához a PCR reakció alapjául humán máj tRNS-t használtunk, a 971-2150 bp-ig terjedő szakaszt humán máj fág cDNS könyvtárból sikerült izolálni. Ezen cDNS megfelelt a gén korábban feltételezett transzkripciós iniciációs és stop kodonjának.
- jelentős különbséget találtunk az általunk klónozott gén és a korábban közölt szekvencia között: ez a 1066-1141 bp-ig terjedő szakaszon 9 nukleotida inzercióját illetve delécióját jelenti, mely 26 aminosav szekvenciájának megváltozását eredményezi. Az így kapott aminosav szekvencia csaknem teljes homológiát mutat a patkány PCC α alegységével.
- a cDNS 5' végénél lévő "upstream" szekvenciák klónozására tett erőfeszítéseink nem jártak sikerrel.
- a kapott klón funkcionális vizsgálataihoz különböző expressziós vektorokat szerkesztettünk, a vektorok promotereként a CMV (cytomegalo vírus) korai promoter szerepelt.
- az expressziós vektorokat különböző fibroblaszt vonalakba juttatva a [14C]propionsav metabolizmus változását két módon vizsgáltuk: I.: a fehérjébe történő beépülést, mely a teljes degradációs sorról ad képet, és II.: PCC holoenzim aktivitást. Az incorporációs vizsgálatok bebizonyították, hogy mind az általunk klónozott PCCA gén a fehérjébe történő beépülést normál szintre korrigálta, nem változott a mért érték normál, pccB és *mut*⁰ sejtekbe történő bejuttatáskor, a DNS mennyiség növelésével a metabolikus aktivitásban további emelkedést elérni nem lehetett.
- az enzimaktivitás (melyet a propionát-szukcinát átalakulás mérésével végeztünk) a pccA sejtkultúrában a normál érték csupán 10-20%-a volt, mely a bevitt DNS mennyiségének növelésével sem változott, ugyancsak nem lehetett az enzimaktivitás növekedését észlelni normál sejtekben.

2. A metilmalonil-CoA mutázzal kapcsolatos kísérletek:

A propionsav metabolizmus változását vizsgáltuk különböző sejtkultúrákban MCM cDNS-t tartalmazó expressziós vektor elektroporációval történő bejuttatását követően. A kísérletekben a már korábban leírt pCMV-MCM expressziós vektort alkalmaztuk.

- a. az MCM enzimaktivitás változását mértük normál, *mut⁰* és hepatoma sejtvonalakon. Az expressziós vektor bejuttatását követően az enzimaktivitás értéke a normál sejtekben ötszörös, *mut⁰* (MCM deficiens) sejtekben a normál sejtek alapaktivitását meghaladó, illetve hepatoma sejtekben az alapaktivitás kétszeres növekedést mutatott
- b. már alacsony (10-20% normál) enzimaktivitásnál is a propionsav metabolizmusa normális értéket ért el
- c. az enzimaktivitás növekedése dózisfüggőnek bizonyult, a bevitt DNS mennyiségével párhuzamosan, szemben a PCC α alegységével végzett kísérletekkel
- d. a teljes propionsav metabolizmus változását vizsgálva a fenti körülmények között azt tapasztaltuk, hogy míg a *mut⁰* sejtekben a normál metabolizmus helyreállt, addig normál sejtekben, illetve hepatoma sejtekben az inkorporáció mértéke nem változott

3. Kevert sejt kultúrák a "metabolikus kooperáció" igazolására:

Fenti kísérleti eredményeink alapján felmerült az adott sejt kultúrákon belüli, sejt-sejt közti metabolikus kooperáció lehetősége. A jelenség modellezésére a különféle sejtek stabil, meghatározott arányú kevert tenyészeiben történő mérések szolgáltak.

- a. diszproporcionálisan magasabb volt a propionsav fehérjébe történő beépülése, ha normál sejteket kevertünk 10% illetve 30 % arányban *mut⁰* sejtekhez, ekkor a normál metabolikus aktivitás 30%-át illetve 70%-át tudtuk mérni
- b. ugyancsak megemelkedett a propionát beépülés (mintegy a normál 40-50% -ára), ha *pccA* és *mut⁰* sejteket kevertünk össze, holott ezek külön-külön jelentős beépítésre nem képesek
- c. aktivitásnövekedést detektálni egymástól membránnal elválasztott sejtek esetében nem tudtunk

4. In vivo génátvitel ASO/PL/DNS(MCM-CMV expressziós vektor) komplexel:

Az ASO/PL/DNS komplexet, melynek DNS tartalmát a MCM-cDNS CMV expressziós vektor jelentette, egér farokvénájába fecskendeztük, az antigén képződéssel kapcsolatos kísérletekben több alkalommal, mintegy 8 hónapos periódus alatt.

- a. a beadást követően szérumból sorozat-meghatározások alapján a komplex $t_{1/2}=2.5$ min féléletidővel eliminálódott, 30 percen túl kimutatni nem lehetett

- b. a beadás után egy órával vizsgáltuk a szöveti disztribúciót, a felvett DNS a legmagasabb koncentrációt a májban érte el, sokkal kisebb mértékben kimutatható volt még lépéből, tüdőből, alig detektálható volt egyéb szövetekben
- c. a komplex eliminációját vizsgálva a DNS mintegy 24 óra múlva már csak nyomokban volt kimutatható a májban, féléletidő $t_{1/2}=1-1.3$ óra volt.
- d. ez a nyomokban kimutatható mennyiség még 30 nap után is detektálható volt, metilációs vizsgálatok alapján ez a DNS a komplexből származott, a genomba történő integrálódást kimutatni nem lehetett.
- e. májszövetből RT-PCR alkalmazásával vizsgálva az expressziós vektorból a 6-24 óra időtartam között transzkripciót tudtunk igazolni
- f. ugyancsak májszövetből vizsgálva, a beadást követő 24-48 óra időtartamban az enzimaktivitás az alapaktivitás fölé emelkedett mintegy 30-40%-kal

az antigenitási kísérletek eredménye:

- g. akut reakció első beadást követően egy alkalommal sem volt
- h. négy, többször injektált egerből egy a negyedik beadást követően 10 percen belül kimúlt, feltehetően anaphylaxiás reakciót követően
- i. a túlélő egerekben, ezeket 8 hónap után feláldozva, rutin szövettani vizsgálatokkal krónikus toxicitásra utaló jeleket nem észleltünk
- j. a keringő ellenanyagok vizsgálatához [125I]-jelzett komplexet használva, ezzel mindhárom állat széruma reagált
- k. komplementációs vizsgálatokkal igazoltuk, hogy az ellenanyagok a komplex ASO illetve PL komponensei ellen képződtek, a DNS ellen képződött antitest jelenlétét kimutatni nem tudtunk
- l. a klinikai gyakorlatban használatos antinukleáris antitest (ANA) reakció is minden esetben negatív volt

A kísérleti eredményekből levonható következtetések, és a gyakorlati alkalmazás lehetőségei:

1. Sikeres volt a propionil-CoA karboxiláz enzim α alegység cDNS-ének klónozása, melyről más fajjal összehasonlítva kimutattuk a szoros homológiát és konzervatívizmust.
2. Igazoltuk ezen gén funkcionális aktivitását pccA hiányos humán fibroblaszt tenyészetben, mely diagnosztikus céllal is alkalmazható.
3. Mind a propionil-CoA karboxiláz, mind a metilmalonil-CoA mutáz enzim génjét tartalmazó expressziós vektorral igazoltuk a propionsav metabolizmus helyreállítását defektusos sejtvonalakon.
4. A sejtekbe juttatott DNS dózis-metabolizmus összefüggés vizsgálattal felvetettük a sejtek közötti metabolikus kooperáció lehetőségét.
5. Kevert sejt kultúrák kísérletekkel igazoltuk a fenti jelenség létezését: kimutattuk, hogy ehhez sejt-sejt direkt kapcsolatra van szükség, ebből a génterápia tervezését illetően (célszövet, transzfekciós határfok, expresszió mértéke) vonhatók le következtetések.
6. *In vivo* egér modellen szisztémás bevitt követően kimutattuk az aszialogoroszomukoid/polilizin/MCM-cDNS komplex alkalmazhatóságát: demonstráltuk az expressziós vektor specifikus felvételét májszövetben, leírtuk a kapott génexpresszió, transzláció, elimináció dinamikáját.
7. Vizsgáltuk a komplex elleni immunreakciót: kimutattuk, hogy az ellenanyag képződés a komplex fehérje komponensei ellen irányul, a bejuttatott DNS komponens ellenanyag reakciót nem vált ki.
8. Az alkalmazott molekuláris genetikai módszereket sikerült bevezetni a POTE Orvosi Genetikai Intézet Laboratóriumában.
9. Ennek köszönhetően ezen módszerekkel tisztázható a propionsav metabolizmus zavarában szenvedő betegek diagnózisa. Ez jelentős előrelépés a veleszületett anyagcsere betegségek kivizsgálásában.
10. Bár az értekezés alapjául szolgáló közleményekben tárgyalt kísérletek külföldön kerültek elvégzésre, a módszerek pécsi alkalmazása lehetővé tette hazai molekuláris genetikai diagnosztikus és epidemiológiai vizsgálatok kivitelezését.

Köszönetnyilvánítás

A PhD munkám során jelentős elméleti és gyakorlati segítséget kaptam a houstoni és pécsi vezetőimtől és munkatársaimtól, akik névsorát egyéni hozzájárulásuk nélkül az alábbiakban közlöm:

Prof. Fred D. Ledley
 Prof. Kosztolányi György
 Prof. Melegh Béla
 Prof. Méhes Károly
 Prof. Soltész Gyula
 Anna Maria Crane
 Elizabeth Andrews
 Michael Sikes
 Michael Wilkemeyer
 Takako Sawada
 Niklai Orsolya
 Oksai Judit
 Papp Edit
 Polyák Éva

Segítségüket ezúton is még egyszer köszönöm.

Saját közlemények jegyzéke

Folyóiratok:

1. F. Gallyas, J. Stankovics:
Oxidation catalyzed by H⁺ ions improves the silver intensification of 3,3'-diaminobenzidine staining by strongly suppressing tissue argyrophilia. *Histochemistry* (1987) 87: 615-618
2. I. Merckenthaler, J. Stankovics, F. Gallyas:
A highly sensitive one-step method for the intensification of the nickel-diaminobenzidine end-product of peroxidase reaction.
Journal of Histochemistry and Cytochemistry (1989) 37(10) 1563-65
3. M.F. Wilkemeyer, J. Stankovics, T. Foy, F. Ledley:
Propionate metabolism in cultured human cells after overexpression of recombinant methylmalonyl CoA mutase: implications for somatic gene therapy.
Somatic Cell and Molecular Genetics (1992) 18 (6) 493-505
4. J. Stankovics, F. Ledley :
Cloning of functional alpha propionyl CoA carboxylase and correction of enzyme deficiency in pccA fibroblasts.
American Journal of Human Genetics (1993) 52 (1) 144-51
5. J. Stankovics, A.M. Crane, E. Andrews, C.H. Wu, G.Y. Wu, F.D. Ledley:
Overexpression of human methylmalonyl CoA mutase in mice after in vivo gene transfer with asialoglycoprotein/polylysine/DNA complexes
Human Gene Therapy (1994) 5:1095-1104
6. J. Stankovics: Géntherápia- valóság vagy fantázia
Gyermekgyógyászat (1995) 46:54-58
7. J. Stankovics: Kabuki-syndroma
Orvosi Hetilap (1995) 34:1841-43
8. J. Stankovics, B. Melegh, Gy. Kosztolányi:
 Δ F508 szűrés Perinatális Intenzív Centrumban ápolt újszülöttekben
Orvosi Hetilap (1996) 44:2451-2453
9. Á. Nagy, I. Bock, J. Stankovics, H. Losonczy, B. Melegh:
Egyszerű, új módszer a thrombophilia vizsgálatában. Aktivált protein C rezisztenciát okozó V-ös faktor Leiden (G 1,691) mutáció kimutatása beszárított vércseppből
Cli. Exp. Lab. Med (1996) 23 (4):185-187
10. J. Stankovics, D.Molnár, I. Burus, Z. Pintér:
Infantile sialic acid storage disease diagnosed by gas chromatography - mass spectroscopy analyses of urine sample
J.Inher. Metab. Dis (1997) 20:728-729

11. B. Melegh, J. Stankovics, A. Kiss, J. Storcz, Á. Nagy, H. Losonczy, K. Méhes:
Increased prevalence of factor V Leiden mutation in neonatal intracranial haemorrhage.
Eur J Pediatr(1998) 157:261
 12. J. Stankovics, Á. Nagy, K. Méhes, B. Melegh:
Umbilical venous catheterization and development of Banti syndrome: the possible role of factor V Leiden mutation.
Eur J Pediatr(1998) 157:696
 13. J. Stankovics, B. Melegh, Á. Nagy, A. Kis, J. Molnár, H. Losonczy, Á. Schuler, Gy. Kosztolányi:
A faktor V G1691A (Leiden) mutáció gyakorisága magyar népességmintákban.
Orv. Hetil. 1998,139 (19), 1161-1163.
 14. G. Kopcsányi, J. Stankovics:
Otoliquorrhéával társult meningitis gyermekkorban.
Fül-, Orr-, Gégyógyászat. 1999, 45(2), 94-99.
 15. G. Kopcsányi, L. Horváth, Gy. Masszi, J. Stankovics., G. Mohay:
Kisdedkori postpulmonectomia syndroma kezelése endotrachealis Palmaz stenttel.
Fül-, Orr-, Gégyógyászat. 1999 (in press)
- Citálható absztraktok :**
1. J. Stankovics, F.Ledley:
Correction of PCCA deficiency in mutant fibroblasts by gene transfer of propionyl-Coa alpha subunit cDNA; approaches to somatic gene therapy.
Pediatric Research 34:135A, 1992(abstract)
 2. J. Stankovics, M Wilkemeyer, AM Crane, K Klish, FD Ledley :
Dynamics of propionate incorporation in cultured cells: Implications for selection of target tissues for somatic gene therapy of organic acidemias.
Pediatric Research 29:199A, 1991(abstract)
 3. M Wilkemeyer, E Andrews, AM Crane, R Jansen, T Sawada, J. Stankovics, F.Ledley:
Gene transfer of recombinant methylmalonyl-Coa mutase (MCM) for characterization, diagnosis, and therapy of "mut" methylmalonic aciduria (MMA).
Am J Hum Genet. 49 (suppl.):109, 1991(abstract)
 4. F. Ledley, J. Stankovics, T. Savada, M. Wilkemeyer, M. R. Adams, H. Soriano:
Towards somatic gene therapy for *mut* methylmalonic acidemia (MMA) and propionic acidemia (PA).
J Cell Biochem. 16F:24, 1992 (abstract)
 5. J. Stankovics, E Andrews, G Wu, FD Ledley:
Overexpression of human methylmalonyl CoA mutase (MCM) in mouse liver after *in vivo* gene delivery using asialoglycoprotein complexes.
Am J Hum Genet. (suppl.) 51(4), p A177 # 695, 1992 (abstract)

6. FD Ledley, H Soriano, RM Adams, T Sawada, M Wilkemeyer, J Stankovics, B Brown, D Steffen, G Darlington, R Lanford, D Carey, M Brandt, M Finegold:
Methods for *ex vivo* hepatic gene therapy: preclinical data towards gene therapy for *mut* methylmalonic acidemia.
Am J Hum Genet. (suppl) 51(4), p A220 # 866, 1992 (abstract)
7. J. Stankovics, I. Burus, B. Melegh:
Screening for $\Delta F508$ mutation in newborn infants.
Cli. Exp. Lab. Med. (1995) 22(4), p167#150 (abstract)
8. Gy. Mestyán, J. Stankovics:
Problémák a Pneumococcusok III. generációs cephalosporin érzékenységének korongdiffúziós módszerrel történő detektálásával.
Cli. Exp. Lab. Med. (1997) 24(3), p101#E24 (abstract)
9. B. Melegh, J. Stankovics, A. Kiss, J. Storcz, Á. Nagy, H. Losonczy, K. Méhes:
Increased prevalence of factor V G1,691A (Leiden) mutation in neonates with intracranial hemorrhage.
Pediatric Research (1997) 42(3):p397#71(abstract)
10. J. Stankovics, Á. Nagy, A. Kiss, H. Losonczy, B. Melegh:
Leiden mutáció szűrése pathológiás újszülött anyagban.
Cli. Exp. Lab. Med. (1997) 24(3), p96#E9 (abstract)
11. M. Kardos, J. Stankovics, B. Melegh:
The role of the factor V Leiden mutation in thromboembolic events in children treated for acute lymphoblastic leukaemia (ALL).
11th meeting of the Danubian League against thrombosis and haemorrhagic disorders
1998 October 1-3, Frankfurt am Main (abstract)