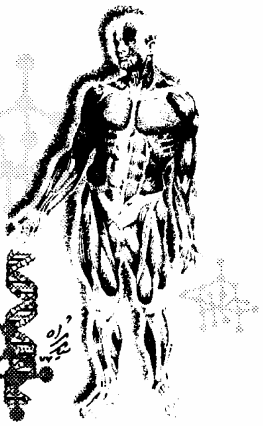
ژنتیک مولکولی و ژن درمانی در مبتلایان به دیستروفی ماهیچه‌ای دوشن



دکتر محمد رضا نوری دلویی : گروه بیو شیمی ، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تهران
شیرین فرپور : کارشناس ارشد ژنتیک

خلاصه

تردیدی وجود ندارد در تاریخ ژنتیک پزشکی پیشرفت‌های حاصله به ویژه در خلال دو دهه اخیر نه تنها در این قلمرو بلکه در دیگر شاخه‌های فراوان پزشکی، اثرات برجسته‌ای بر جای نهاده است. فنون مهندسی ژنتیک هم در ژنتیک پایه و هم در ژنتیک بالینی مانند تجزیه و تحلیل و مطالعه محل و ساختار ژن، مطالعه بیان،

عمل و فرآورده پروتئینی ژن، جهش‌زایی جهت‌گیری شده در محل، تشخیص بیماریهای غیر ژنتیکی و.... دارای کاربردهای بسیار گسترده است.

دستاوردهای اخیر در ژنتیک مولکولی بیمارهای ماهیچه‌ای به نحو قابل ملاحظه‌ای توجه افکار عمومی و دانشمندان را به خود جلب کرده است. استفاده از ابزارهای زیست‌شناسی مولکولی و سلولی و مطالعات جاری در بیماریهای ماهیچه‌ای انسان، مکانیسم‌های ژنتیک مسئول را آشکار ساخته و درک ما را از ساختار و عمل ماهیچه تقویت بخشیده است و در نتیجه، چشم اندازی نوید بخش را برای روشهای جدید جهت تشخیص و معالجه این بیماریها گشوده است.

دیستروفی ماهیچه‌ای دوشن (DMD) و شکل خفیف‌تر آن، دیستروفی بکر عضلانی (BMD)، برروی‌هم، از جمله معمولی‌ترین و مهمترین بیماریهای ارثی مغلوب وابسته به کروموزوم جنسی X در انسان به حساب می‌آیند. DMD به طور معمول جنس نر را مبتلا کرده و علایم شروع بیماری در نخستین سال زندگی ظاهر می‌گردد. مبتلایان قادر به تولید دیستروفین طبیعی نیستند. فراوانی این بیماری در مردان حدود $\frac{۱}{۳۵۰۰}$ می‌باشد، که $\frac{۱}{۳}$ این میزان در مردانی بدون هیچ سابقه خویشاوندی دیده شده است. فراوانی BMD، در مردان حدود $\frac{۱}{۴۰۰۰۰}$ است. DMD موجب تحلیل رفتن ماهیچه‌های انسان، بزرگ شدن ماهیچه‌های ساق پا و سرانجام - در اواخر ۱۰ تا ۲۰ سالگی - مرگِ فرد مبتلا را به سبب اختلال در عملکرد ماهیچه‌های قلبی و تنفسی در پی دارد. میانگین سن مرگ در مبتلایان حدود ۱۷ سالگی است.

ژن دیستروفین انسانی یکی از چند نمونه از بزرگترین ژنهایی است که تا کنون استخراج گردیده است. این ژن دارای ۱۷۹۱گزون است که در گستره‌ای حدود ۲۳۰۰ کیلو باز از مولکول DNA و در ناحیهٔ معینی روی بازوی کوتاه کروموزوم X ($Xp_{۲۱}$) واقع است. از این ژن، مولکول بالغِ mRNAای با طول ۱۴ کیلو باز ایجاد می‌شود که پروتئینی با وزن ۴۲۷ کیلو دالتون را شکل می‌دهد.

هم DMD و هم BMD به دلیل رخداد جهش در ژن مربوط به دیستروفین ایجاد می‌شوند. کمبود ژنتیکی با سطح و میزان و یا فعالیت پروتئین دیستروفین مرتبط است. نواقص متعدد و متفاوتِ ژنتیکی سبب پیدایش DMD می‌گردند. این نواقص توسط تکنولوژی DNA، با اندازه‌گیری و تعیین فراوانیِ بالای جهش‌های حذفی در فرد مبتلا یا با استفاده از نشانگرهای DNAی چند ریختی مربوط به ژن یا پیرامون

ژن، قابل شناسایی است.

ژن DMDیکی از معدود ژنهایی می‌باشد که بدون آگاهی از فراوردهٔ معیوب پروتئینی آن، برای نخستین بار کلون گردیده است. استخراج و کلون سازی ژنِ DMD، علاوه بر ارایه بصیرتهایی در مبانی بیوشیمیایی فنوتیپ بیماری، روشهای تشخیص و امرِ مهم مشاوره ژنتیکی را به طرزی اساسی متحول ساخته است و این احتمال را فراهم آورده است که با بهره‌گیری از استراتژیهای مکمل سازی ژنتیکی، بتوان از روند بیماری جلوگیری بعمل آورد.

در این مقالهٔ (پژوهشی - مروری) جدیدترین اطلاعات مولکولی پیرامون DMD، نحوهٔ بیان ژن دیستروفین، انواع متفاوت جهش‌ها، ساختار، محل و عملکرد ژن دیستروفین و فراورده پروتئینی آن مورد بررسی قرار گرفته است. به علاوه روشهای تشخیص مولکولی مبتلایان و افراد حامل، معرفی شده است. ژن درمانی که به اصلاح نقص ژنتیکی توسط تغییر ژنوتیپ جهش یافته استوار است و روشهای متعدد ژن درمانی سوماتیکی - در مورد DMD - نیز تشریح گردیده است. از آنجا که روشهای ژن درمانی مستلزم دانشِ اساسی و قابل توجه از طبیعت مولکولی ژن غیر طبیعی و عملکرد آن است، در مورد DMD، کاربرد بالینی ژن درمانی سوماتیکی در حال حاضر در مرحله ابتدایی است. با این وجود، به طور واقع بینانه انتظار می‌رود که در آینده‌ای نزدیک شاهد پیشرفتهای اساسی در این زمینه باشیم.

مقدمه

بدون شک بخش عمدهٔ پیشرفتهای علمی و تجربی انسانها در زمینه علوم پزشکی نیز مرهون دستاوردهای چند دهه اخیر است. با ابداع و توسعه روشها و فنون بسیار جدید، قدرتمند و متنوع مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی مولکولی و پیشرفتهای به دست آمده در دو دهه اخیر در دانش زیست‌شناسی به ویژه در زمینه پزشکی مولکولی، در مسیر شناسائی و تشخیص مولکولی و دقیق بسیاری از بیماریهای ارثی - و از جمله بیماری دیستروفی ماهیچه‌ای دوشن - قدمهای بلندی را برداشته شده است.

دیستروفی ماهیچه‌ای دوشن (Duchenne Muscular dystrophy) که به اختصار DMD نامیده می‌شود از جمله بیماریهای مهم ارثی می‌باشد که موجب

تحلیل رفتن ماهیچه‌های انسان می‌گردد. این بیماری، معمولی‌ترین و در عین حال خطرناک‌ترین نوع دیستروفی ماهیچه‌ای است. فراوانی این بیماری در مردان $\frac{۱}{۳۵۰۰}$ بوده که یک سوم این میزان در مردانی دیده شده که هیچ سابقه خویشاوندی ندارند.در واقع در یک سوم تمام بیماران، جهشهای خود به خودی رخ می‌دهد.

این بیماری با ضعف ماهیچه‌های ابتدائی هر اندام (بیشتر ماهیچه ران) آغاز شده و در حدود سن یازده سالگی موجب از دست رفتن توانایی فرد برای ایستادن می‌شودو بدین صورت شخص فلج می‌گردد. در کنار تخریب بافت، پدیده دیگری در مرحلهٔ اصلی بیماری در نقاطی از بدن فرد مبتلا به DMD که آسیب شدید دیده است، وجود دارد که سبب رسوب بافت همبند فیبروتیک گشته و خود منجر به تشدید فلج فرد می‌گردد. بنابراین، قربانیان معمولاً در دوره نوجوانی و حداکثر در دهه سوم زندگی به دلیل اختلال عملکرد عضلات سینه در امر تنفس و در نتیجه ناتوانی تنفسی به دلیل از کار افتادن ماهیچه‌های تنفسی و یا اختلال ماهیچه قلب از پا در می‌آیند. [11,2].

در کودک خردسال، اسپاسم یا گرفتگی ماهیچه‌های ساق پا قبل از راه رفتن اولین نشانهٔ بیماری است و پس از آن بیماری به تدریج مراحل خود را طی می‌کند. بر خلاف الگوی کلی آسیب‌شناسی، گاهی در برخی از پسربچه‌های مبتلا، قبل از سنین ۵ تا ۸ سالگی هیچگونه نشانه‌ای مشاهده نمی‌شود و پس از آن مراحل بیماری بسیار سریع طی می‌شود، به نحوی که حدود سه سال بعد یعنی در سن حدود ۱۲ سالگی، فرد مبتلا قادر به راه رفتن نیست. نشانه بارز دیگری که در DMD وجود دارد بزرگ شدن ماهیچه‌های ساق پا و نیز بالا رفتن فعالیت آنزیم کراتین کیناز (Creatine Kinase) می‌باشد [13].

بیماری دیگری با نام دیستروفی ماهیچه‌ای بکر (Becker Muscular Dystrophy) با علامت اختصاری BMD وجود دارد که مشابه بیماری DMD است، با این تفاوت که از آن خفیف‌تر می‌باشد. البته هردو بیماری از الگوی توارثی مغلوب وابسته به جنس (X-Linked Recessive) پیروی می‌کنند و ژن معیوب توسط مادر منتقل شده ولی بیماری اکثراً پسران را مبتلا می‌کند. در واقع هر دو بیماری بر اثر جهش در ژن رمز کنندهٔ دیستروفین پدید می‌آیند، هر چند که بسیاری از مبتلایان به BMD هرگز قدرت راه رفتن خود را از دست نمی‌دهند و در نتیجه زندگی طبیعی

دارند [20,13].

مطالعات ابتدائی بر روی ژن دیستروفین به علت بزرگی این ژن و بدون هیچ اطلاع قبلی از نقص احتمالی بیوشیمیایی در آن، با روشهای کلون سازی ژن مشخص گردید.

روشهای مطالعاتی ژن دیستروفین:

همانگونه که بیان شد به علت بزرگی ژن دیستروفین، مطالعات ابتدایی بر روی این ژن در سال ۱۹۹۲، بر استفاده از روشهای مناسب مولکولی متکی بوده است، از جمله آنکه ابتدا با روش PFGE (که نوعی الکترو فورز می‌باشد - Pulse Field Gel Electrophoris)، ژن انسانی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته و سپس با استفاده از آنزیم‌های برش دهنده خاص و محدودگر (Restriction Enzymes) قطعات محدودی از ژن تهیه شده و به دنبال آن نقشه ژنی و ساختار کامل ژن بررسی گردیده است [13].

برای مطالعه و بررسی ژن دیستروفین و ناهنجاریهای آن به طور کلی از روشهای گوناگونی می‌توان استفاده نمود، به طور مثال با استفاده از کروموزوم صناعی مخمر (Yac = Yeast Artificial Chromosome) می‌توان قطعات بزرگ DNA (مانند DNAی دیستروفین) را که بیش از ۱۰۰۰ کیلو باز هستند، کلون کرد.

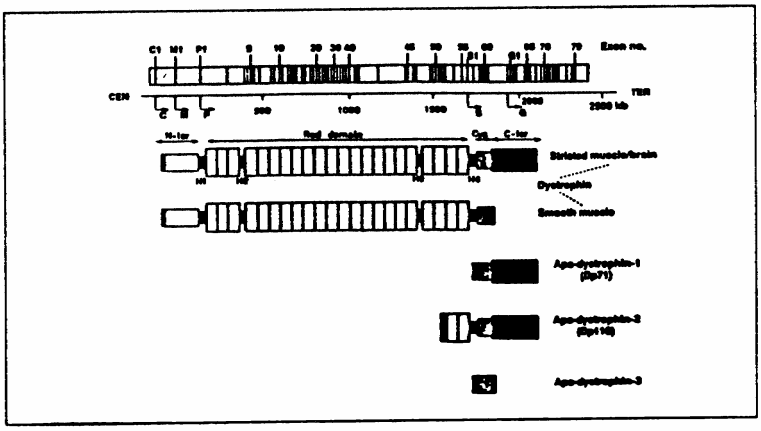
برای بررسی کروموزوم‌های حامل ژن ناقص از روشهای متعددی استفاده می‌شود. چنانچه قبلاً اشاره شد ژن دیستروفین بر روی کروموزوم جنسی X واقع است، در نتیجه یکی از روشهای مطالعاتی آن، استفاده از روش FISH (Fluorescence - Insitu Hybridization) می‌باشد. باید توجه داشت در زنانی که دارای DMD، می‌باشند هم حذف یک کروموزوم X دیده شده است و هم جابجایی قطعه‌ای از این کروموزوم با سایر کروموزوم‌ها گزارش گردیده است که در این جابجایی در واقع بخشی از کروموزوم X که XP_{21} می‌باشد و ژن دیستروفین بر روی آن واقع است از کروموزوم حذف می‌شود.

به هر صورت، به طور روشن معلوم شده است که بیشترین نقاطی که حذف در آنها رخ داده و سبب پیدایش بیماری گردیده است اگزونهای ۵۱، ۵۲، ۵۳، از ژن DMD بوده‌اند [20, 16, 13].

ساختار ژن دیستروفین و انواع جهشهای آن

ژن دیستروفین انسانی ژنی بزرگ بوده و برروی بازوی کوتاه کروموزوم جنسی قراردارد که با علامت اختصاری XP_{21} نمایش داده می‌شود [20]. اندازه جایگاه این ژن ۲۴۰۰ کیلو باز است(هر کیلو باز برابر با هزار جفت باز است) که شامل ۷۹ قطعه آگزون می‌باشد و در مجموع ۱۴ کیلو باز بخش ترجمه شدنی (Open Reading Frdme = ORF) را در بر می‌گیرند. پس از رونویسی این ۱۴ کیلو باز از ژن در mRNA نهائی، پروتئینی شامل ۳۶۸۵ اسید امینه و با وزن مولکولی ۴۲۷ کیلو دالتون پدید می‌آید. این پروتئین که دیستروفین نام دارد در عضلات مخطط یافت می‌گردد [13, 8].

ژن دیستروفین شامل ۵ پروموتر (Promoter) می‌باشد (پروموتر ناحیه آغاز رونویسی است). سه پروموتر که هر کدام به طور پشت سرهم به سه اگزون ابتدایی ژن متصل هستند، مسئول سنتز پروتئین کامل دیستروفین می‌باشند در حالیکه دو پروموتر دیگر در انتهای ´۳ ژن گزارش شده‌اند و این دو، جور شکلها (Isofrms) یا پروتئین‌های ناکامل دیستروفین را رمز دهی می‌کنند. (شکل ۱) [10].



شکل ۱ - نمایش شماتیک ژن DMD و فراورده‌های آن.

از سه پروموتر ابتدائی که در بخش ´۵ ژن قرار دارند یکی با قدرت بیان بالا در سلولهای عضلانی و دو مورد دیگر با قدرت بیان زیاد در سلولهای مغزی فعال

می‌باشد.

در حالیکه دو پروموتر ناحیهٔ ۳´ بیشتر در اعصاب محیطی فعال هستند. یادآوری می‌گردد که پروموتر یا پیش برنده ناحیه‌ای از DNA است که معمولاً در قسمت بالا سری (Upstream) ردیفهای رمز دهندگی یک ژن یا اوپرون قرار دارد. این ناحیه به آنزیم RNA پلی مراز متصل می‌شود و آنزیم را به نقطه دقیق شروع نسخه برداری هدایت می‌کند [22, 3].

ژن DMD شامل ۷۹ اگزون با ۲/۴ میلیون باز می‌باشد به‌علاوه دارای دست‌کم ۵ پروموتر به نامهای C (Cortical)، M (Muscle)، P (Purkinje Cell) S, X (Schawnn Cell) و بالاخره G (General or Glial) می‌باشد. C و M و P پروموترهایی می‌باشند که دیستروفین کامل را تولید می‌کنند در صورتیکه پروموترهای S و G آپودیستروفین DP116 و DP71 را ایجاد می‌نمایند.

تاکنون مشخص گشته که تقریباً ۷۰درصد از بیماران DMD و حدود ۸۰درصد از بیماران BMD بر اثر حذف ژنی (Gene Deletion) بوجود آمده‌اند. مطالعات انجام یافته نشان داده است که امکان روی دادن جهش حذفی در هر کجا از ژن دیستروفین وجود دارد، هرچند که در ژن دو منطقه حساس‌تر و اصطلاحاً داغ (Hot Spot) برای رخداد جهش وجود دارد. این دو منطقه عبارتند از محدوده اگزون ۴۵ تا اگزون ۵۵ (با فاصله ۱۲۰۰ کیلو باز از انتهای ´۵ ژن) و منطقه نزدیک به ۲۰ اگزون اولیه ژن (با فاصله ۵۰۰ کیلو باز از انتهای ´۵ ژن). طبیعتاً، در این مناطق حذف بیشتری مشاهده شده است. شایان ذکر است که اندازه افتادگی یا حذف ژنی با پدید آمدن شدت بیماری یا به عبارت دقیق‌تر پدید آمدن نوع دوشن یا بکر ارتباطی نداردبلکه محل رخداد حذف ژنی در نوع دیستروفی ایجاد شده نقش مهمی را ایفا می‌کند [13].

در ۵ تا ۱۰ درصد موارد در بیماری DMD، ناهنجاری ممکن است بر اثر دو تا-شدگی (Duplication) ژن یا نو ترکیبی پدید آمده باشد. جهشهای نقطه‌ای که موجب گردد در m RNA لغت رمزی ایست یا خاتمه دهنده (Stop Codon) یا لغت رمزی با معنیِ متفاوت (یا جانشینی اسید آمینه) (missense Codon) ایجاد گردد، اغلب موجب پیدایش نوع شدید بیماری می‌گردد.

در مواردی که جهش منجر به جانشینی یک اسید آمینه به جای اسید آمینه اصلی پروتئین می‌گردد (Missense Mutation)، چنانچه اسید آمینه جانشین شده

متعلق به زیر واحدهائی از پروتئین باشد که در محلهای تداخلی پروتئین دیستروفین با سایر پروتئینهای اسکلتی قرار گرفته است و یا به طور کلی اسید آمینه جانشین شده در زیر واحدهائی از پروتئین که در شکل فضائی دیستروفین نقش دارند قرار داشته باشد، ناهنجاری و در نتیجه نوع شدید بیماری ایجاد می‌شود. چنانچه ذکر شد رخدادهای حذف و دوتا شدگی در هر جای ژن ممکن است روی دهد اما آنچه مسلم گشته در اطراف اینترونهای ۷ و ۴۴ این وقایع بیشتر مشاهده شده است[13, 19].

ساختار پروتئین دیستروفین

تجزیه و تحلیل ردیف اسیدهای آمینه پروتئین دیستروفین، چهار ناحیه (Domain) نزدیک به هم را نشان می‌دهد [1]. این نواحی عبارتند از:

۱ - ناحیه انتهائی N (N - Terminal): شامل ۲۴۰ اسید آمینه بوده و مسئول اتصال به رشته اکتین می‌باشد.

۲ - ناحیه‌ای بزرگ شامل مارپیچ سه‌تایی با ۲۴ ردیف که الاستیک (کشایند) می‌باشد.

۳ - ناحیه‌ای غنی از سیستئین که بین اسیدهای آمینه ۳۰۸۰ تا ۳۳۶۰ واقع است و احتمالاً شامل دو محل اتصال به یون کلسیم می‌باشد.

۴ - ردیفی با ۴۲۰ اسید آمینه در انتهای کربن (C - Terminal) که بخش واحدی می‌باشد و به پروتئین وابسته به دیستروفین (Dystrophin Related Protein) یا به اختصار DRP بنام یوتروفین (Utrophin) شباهت زیادی دارد [1 و 9].

نواحی بالا در شکل (۱) مشخص شده‌اند.

عمل پروتئین دیستروفین

دیستروفین یکی از پروتئینهای اساسی و بزرگ سیتو اسکلتی می‌باشد که دارای نقشی بنیادی بوده و با دسته‌ای از پروتئینهای دیگر تجمع یافته و بدین ترتیب به سارکولما متصل می‌گردد. دیستروفین، توسط تغذیه غشاء سلولی، یکپارچگی و سلامت یک سلول عضلانی را تقویت می‌کند. یکی از پروتئینهایی که دیستروفین با آن مجتمع می‌شود، آدهیلین (Adhilin) نام دارد.

کمبود این پروتئین موجب نوعی دیستروفی ماهیچه‌ای شدید مغلوب اتوزومی

کودکان (Severe Child - hood- autosomal recessive muscular dystrophy) یا به اختصار SCARM می‌گردد [14].

پروتئین دیستروفین در سمت سیتوپلاسمی غشاء سلول در سلولهای عضلانی بالغ طبیعی جای گرفته است. این پروتئین حدود ۵درصد سیتو اسکلتون غشاء را شامل می‌شود. دیستروفین در طول سارکولم در چند ناحیه مشخص به وفور یافت می‌گردد، این نواحی عبارتند از ساختارهای نواری شکل معکوس بین نوارهای I و M سارکومرهای جانبی و نیز در رشته‌های طولی محور اصلی فیبرها.

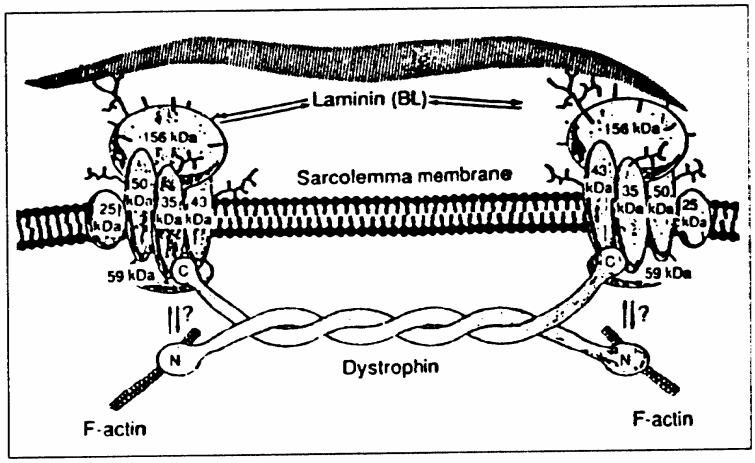
از نقطه نظر بیوشیمیائی، علاوه بر اینکه دیستروفین از یک سمت به F - actin متصل می‌گردد از سوی دیگر با مجموعه‌های خاری شکل غشاء (مشتمل بر شش پروتئین سارکومری که ۴ تای آن گلیلو پروتئینی است)، مجتمع می‌شوند. این شش پروتئین تشکیل مجموعه‌ای به نام ترکیبات گیلکو پروتئینی مجتمع با دیستروفین (Dystrophin associated glycoprotein complex) یا به اختصار DAGC را می‌دهند (شکل ۲) [9]. این ترکیب با نواحی غنی از سیستئین و نواحی انتهای کربن دیستروفین اتصال می‌یابد در حالیکه انتهای آمین دیستروفین به رشته‌های اکتین متصل می‌شود. جزء دیگر ترکیب DAGC، بخشی ۱۵۶ کیلو دالتونی است که در واقع یک پروتئوگلیکان است که به ماتریکس خارج سلولی متصل می‌گردد، بنابراین DAGC سیتواسکلتونی از سارکولما را که بر پایه اکتین استوار است به ماتریکس خارج سلولی متصل می‌نماید (شکل ۲) [9 , 12].

دیستروفی در جانوران

علاوه بر مبتلایان انسانی، در بسیاری از حیوانات نیز کمبودهای پروتئین دیستروفین مشاهده شده است. برای مثال در موش، بیماری دیستروفی وجود دارد. موش مبتلا به اختصار mdx نامیده می‌شود. که حروف m و d و x به ترتیب نمایانگر موش، دیستروفی و نحوهٔ توارث که وابسته به x است، می‌باشد [18]. علائم بیماری در موش mdx بسیار خفیف‌تر از علائم بیماران DMD می‌باشد. همچنین سگ xmd یا گربه‌های دارای دیستروفی نیز مشاهده و مطالعه شده‌اند.

البته ناهنجاریهای مربوط به ژن دیستروفین در هر یک از حیوانات عارضه‌ای متفاوت از دیگری را نشان می‌دهد. برای نمونه در موش mdx علائم، مشابه علائم

بیماران انسانی ولی خفیفتر از آنهاست یعنی در بسیاری از عضلات اسکلتی انسان آسیب شدید دیده می‌شود ولی این آسیب تنها گاهی در دیافراگم و عضلات بین دنده‌ای موش مشاهده شده است. در سگ مبتلا (xmd) نیز به عنوان مثالی دیگر، مراحلی مشابه مراحل DMD انسانی دنبال می‌گردد و ضعف عضلانی پیشرونده و هیپرتروفی عضلات (بزرگ شدن عضلات) مشخص است. در سگهای مبتلا (xmd)، مرگ زودرس ناشی از نارسایی نیز گزارش شده است [13].



شکل ۲ الگوی پیشنهادی برای اتصال پروتئین دیستروفین به غشاء پلاسمائی

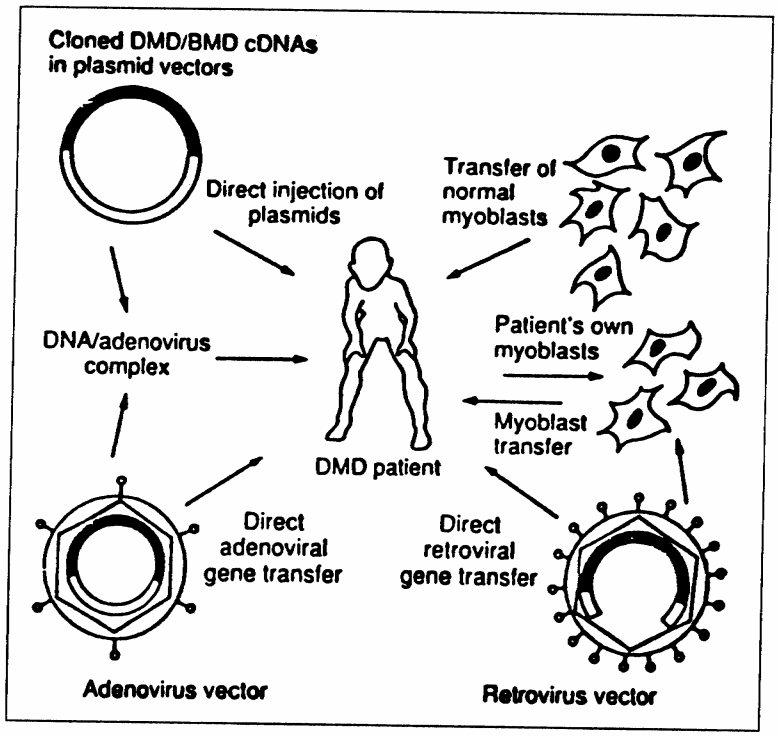
دیستروفی در گربه با بقیه جانورانِ اشاره شده در بالا تفاوت دارد. بدین ترتیب که در این حیوان دیستروفی غالباً با هیپرتروفی زبان (بزرگ شدن بافت زبان) و هیپر تروفی دیافراگم همراه است ولی هیچ تحلیل رفتگی فیبرها یا ضعف عضلانی در آن مشاهده نشده است [13].

به طور کلی می‌توان گفت که علت پیدایش دیستروفی چه در انسان و چه در حیوانات آسیب دیدن ژن دیستروفین می‌باشد که این عمل خود موجب ایجاد پروتئینی معیوب می‌گردد [13]. پروتئین دیستروفینی که ساختار و شکل فضایی طبیعی خود را ندارد. نمی‌تواند در ساختار سیتواسکلتون سلولی نقش طبیعی و پیوندهای معمول خود را حفظ کند، بنابراین پیوستگی بین سیتواسکلتون اکتین و ماتریکس خارج سلولی از دست می‌رود. و این خود موجب لطمه وارد شدن به

سارکولما می‌گردد. از این رو، فیبرهای عضلانی در طول فعالیت انقباضی خود نسبت به آسیب‌های مکانیکی حساس می‌گردند [13].

ژن درمانی در DMD و اهداف آن

کلون سازی و تعیین خصوصیات ژن DMD، تهیه cDNA (DNAی مکمّل) از ژن دیستروفین، شناخت دقیق ساختار و رابطه وسیعی که بین دیستروفین و یوتروفین وجود دارد و مانند آن، پژوهشگران را در جهت تهیه پیشنهادی برای فعالیت در زمینهٔ ژن درمانی و امکان دستیابی به درمان و معالجه اصلی بیماران رهنمون کرده است (شکل ۳) [13].



توضیح: ژن درمانی انتقال مواد ژنتیکی به درون سلولهای یک موجود برای مقاصد درمانی است. این امر به روشهای مختلف و متنوع از جمله انتقال ژن سالم به درون سلول یا اصلاح ژن معیوب توسط رفع نقص و تغییر ژنوتیپ آن یا مهار کردن بیان ژن معیوب، صورت می‌گیرد.

شکل ۳ - خلاصه‌ای از روشهای ژن درمانی

همانگونه که مشخص گشته است دیستروفین یا مولکولهای بسیار شبیه به دیستروفین هم در سلولهای عضلانی مخطط و هم در سلول‌های عضلانی صاف و همچنین در تجمعات نرونی سیستم عصبی مرکزی (CNS) مشاهده می‌شود. در این بافتها تظاهرات آپودیستروفین (شکل اولیه مولکول دیستروفین) به گونه‌های مختلف می‌باشد. اگر چه پاتوفیزیولوژی یا آسیب اصلی در DMD، پیشرفت آسیب عضلانی بر اثر کمبود مولکول دیستروفین طبیعی است اما علت مرگ بیماران از کار افتادن عضلات تنفسی می‌باشد. همچنین اِشکال مختلف کاردیومیوپاتی (آسیب عضله قلبی) نیز در مراحلی موجب مرگ و میر بیماران می‌گردد. بنابراین، یکی از اهداف ژن درمانی در مبتلایان به DMD، انتقال ژن دیستروفین سالم به عضلات اسکلتی مهم مانند قلب یا دیافراگم در بیماران DMD می‌باشد [17].

روشهای ژن درمانی

الف - پیوند میوبلاستی

از آنجا که سلولهای عضلات اسکلتی به صورت چند هسته‌ای هستند، یک مکانیسم خاص برای معرفی اطلاعات ژنتیکی جدید به این بافت می‌تواند توسط پیوند میو بلاستی صورت گیرد. از شکسته شدن میو بلاستهای تک هسته‌ای، میوفیبرهایی با هزاران هسته به وجود می‌آید و به این ترتیب عضلات کامل شکل می‌گیرند. تمام هسته‌های فیبرها بر اثر تقسیم میتوز پدید آمده‌اند و در نتیجه کلیه ژنهائی که در هر هسته این سلولها یافت می‌شوند به سلول‌های حاصل از آنها منتقل شده و هیچ هسته‌ای در فیبر کامل شده وجود ندارد که نسبت به هسته اولیه ژن کمتری داشته باشد [13].

اگرچه ناحیهٔ هسته‌ای (ناحیه‌ای از فیبر که فراورده‌های پروتئینی یک هسته در آن یافت می‌گردد) بیشتر تمایل به تجمع پروتئینهای ساختاری و غشایی مانند دیستروفین را دارد اما این مسئله منحصر نبوده و امکان حضور مواد دیگر سیتوپلاسمی نیز در ناحیه هسته‌ای هست. به هر حال تعداد زیادی از سلوهای هسته‌ای عضله برای بالا بردن ظرفیت عملی خود دارای تجمع زیادی از پروتئینهای دیستروفین در نواحی هسته‌ای خود بوده و از این رو دارای شمار زیادی نسخه ژن دیستروفین در هسته خود می‌باشند.

برای دستیابی به پیوند میوبلاستی و معرفی اطلاعات ژنتیکی جدید به بافت ناقص به یک دهندهٔ طبیعی یا سلولهای میوبلاستی که از لحاظ ژنتیکی تصحیح شده باشند نیاز است، بدین منظور با استفاده از سلولهای ستاره‌ای سالم و تزریق آن به عضله بیمار (گیرنده) می‌توان به شکل موضعی نقصان ژنتیکی را اصلاح کرد [13].

از لحاظ نظری تزریق میوبلاستی منجر به پیدایش فیبرهای موزائیک می‌گردد که در آن، دست کم برخی از هسته‌ها دیستروفین را تولید می‌کنند. بهتر است برای پیوند از منبع سلولهای خود بیمار یا انتقال میوبلاست خودی مانند: (Autologous Myoblast transfer) که پس از استخراج، توسط روشهای نوترکیبی ژنهای دیستروفین آن اصلاح و تصحیح شده است، استفاده کرد. هر چند که در برخی اوقات از میو بلاستهای طبیعی یک فرد دهنده بیگانه استفاده شود (Heterologous myoblast transfer).

مزیتی که انتقال میو بلاست‌های خودی (Autolog) دارد این است که از جهات ایمنی‌شناسی هیچگونه رد پیوندی توسط سلولهای فرد پدید نمی‌آید [13].

سلولهای ستاره‌ای که برای انتقال ژنی به کار می‌روند در لایه بین سارکولما و لایه بازال (Basal Lamin) میو فیبرها وجود دارند و از طریق تقسیم میتوز در عضلاتی که در حال رشد یا ترمیم می‌باشند، فعالیت زیادی دارند. انتقال میوبلاستی در انسان تاکنون دارای بازدهی بسیار اندک بوده است. در یکی از آزمایشگاههای بالینی، پژوهشگران، مولکول mRNA دیستروفین را جدا کرده و با تکثیر آن توسط روش PCR (Polymerase chain reaction) و کشت میو بلاست‌ها قدرت تولید آنها را برای هفته‌های مدیدی دنبال کرده‌اند و در پی پیوند آن مشکلات موجود را مورد بررسی قرار داده‌اند [2 , 13].

نواقص موجود در روش انتقال میو بلاستی

بازدهی اندک انتقال میوبلاستی در انسان دست‌کم به سه عامل زیر بستگی دارد:

۱ - قدرت اندک حرکت سلولهای تزریق شده در بین سد بافت پیوندی عضلات.

۲ - ناتوانی میوبلاست‌ها برای اتصال به فیبرهای عضلانی تخریب شده.

۳ - آسیب احتمالی میزان رشد و نمو میوبلاست‌های دهنده.

در مطالعاتی که اخیراً با استفاده از میوبلاستهای مناسبی که فاقد اِشکالات بالا بوده‌اند صورت گرفته است مشخص شده که در فیبرهای عضلانی مورد تزریق قرار گرفته افزایش آنتی ژنهای HLA رده I مشاهده می‌شود. بنابراین احتمال دارد که علی رغم درمان با سرکوبگرهای ایمنی - فرونشان (Immuno Suppressor) در برخی از سلولهای دهنده یا فیبرهای دورگه، آلو آنتی ژن HLA رده I وجود داشته باشد و در عرض چند ساعت یا چند روز اولیه بوسیله سلولهای سیتوتوکسیک (سلول زهر آگین) خودی و یا سلولهای کشندهٔ طبیعی، دفاع پیوند صورت می‌گیرد [13].

ب - ژنهای نوترکیب دیستروفین

چنانچه قبلاً اشاره شد ژن DMD واحد پیچیده شامل ساختارهای پروموتری اختصاصی عضلات مخطط و سلولهای عصبی می‌باشد. اندازهٔ بسیار بزرگ این ژن مانع از کلون کردن مستقیم آن توسط روشها و فنون مهندسی ژنتیک و از جمله قرار دادن در پلا سمید، فاژ یا سایر ناقلین ویروسیی یا یوکاریوتی (موجودات پیشرفته) می‌گردد. اگرچه امروزه مشخص شده است که می‌توان ژن کامل DMD را با کروموزوم صناعی مخمر (YAC) ترکیب کرد. در واقع خُرد تزریقی (Microinjection) لیپوزومهای حاوی YAC در سلولهای یوکاریوتی محتمل می‌باشد، اما به طور مسلم در مسیر انتقال ژن به این شکل بسیاری از ژنها غیر فعال می‌گردند [16].

آنچه بنظر می‌رسد این است که در آینده نزدیک بر روی انتقالِ ژن کامل یا دستِ کم، قطعه بزرگی از جایگاه ژن DMD طبیعی به سلولهائی با کمبود دیستروفین، پژوهش‌های بسیاری انجام خواهد گرفت. امروزه عمدهٔ تلاش پژوهشگران برای ساختن و بیان ژنهای نو ترکیب دیستروفین بر استفاده از کلونهای DNAی مکمل یا cDNA استوار می‌باشد [13].

DNAهای مکمل نو ترکیب، دیستروفین ماهیچه‌های اسکلتی موش و انسان را رمز دهی می‌کنند. برای cDNA انسانی ابتدا از پنج کلونی cDNA ای که با یکدیگر همپوشانی داشتند و توسط فنون فراکلون سازی ژن (Subcloning) در کنار یکدیگر قرار گرفتند، به منظور ایجاد فراورده‌های ۱۲ کیلو بازی شامل تمام اطلاعات اگزونی که در ماهیچه افراد بالغ بیان می‌شود، استفاده کردند. برای

موش cDNA ای توسط پرایمر مخصوص با استفاده از ردیف بازی mRNA دیستروفین موش به‌دست آوردند که این cDNA مستقیماً دو قطعه بزرگ cDNA را که شامل دو بخش ´۳ و ´۵ از مولکول mRNA می‌باشد، تولید کرده و سپس از قسمت مرکز به هم متصل می‌شوند. هر دو نوع DNAهای مکمل ابتدا در پلاسمیدهای یوکاریوتی (به عنوان ناقلی که قدرت بالای بیان ژن را داراست) کلون می‌شوند و سپس فیبرو بلاست‌های 3T3 و سلولهای COS را کشت داده و این DNAهای مکمل را در آنها وارد می‌کنند بدین ترتیب پلی پپتیدهای نو ترکیب دیستروفین با اندازه‌ای مناسب (۴۲۷ کیلو دالتون) تولید می‌شوند. (باید توجه داشت اندازه دیستروفین نو ترکیب باید متناسب با اندازه دیستروفین در عضله بالغین باشد.) [5].

بر اساس آزمایشهای انجام شده علاوه بر دیستروفین موش، دیستروفین انسانی که با روشهای مهندسی ژنتیک تهیه شده است، نیز قادر به پاسخگوئی به آسیب‌های فیبروتیک ثانویه و اولیه در عضله اسکلتی موش mdx بوده و آنها را اصلاح می‌کند. با روشی که ذکر شد ژنهای فعالی که دیستروفین طبیعی را رمز دهی می‌کنند در دسترس می‌باشند اما به علت اندازهٔ بزرگ این ژنها (بزرگتر از ۱۲ کیلو باز) در مرحله انتقالِ ژن مشکلاتی را به همراه می‌آورند. به طور نمونه مشکلاتی که بزرگی اندازه این ژنها موجب می‌گردد این است که برای امر بسته بندی (Packaging) در هر ناقل، مناسب نبوده و به نظر می‌رسد که تنها در ناقلین آدنو ویروسی (که البته هنوز مورد آزمایش قرار نگرفته‌اند)، مناسب می‌باشند [5 , 13].

مبتلایان به BMD نیز نوعی دیستروفین را که دارای وزن مولکولی کمتری نسبت به دیستروفین طبیعی می‌باشد، تولید می‌کنند. این دیستروفین عملکرد نسبتاً کافی را برای سلول دارد به طوری که بیمار تحت آسیب شدید قرار نمی‌گیرد. حتی در یکی از این بیماران، حذف ژنی به تعداد ۵۱۰۶ نوکلئوتید دیده شده است، اما با آنکه حدود ۶۳درصد از ناحیه رمز دهنده حذف شده است، فرد مبتلا تنها فنوتیپ خفیفی از بیماری را نشان می‌دهد، بر اساس گزارش سال ۱۹۹۵ این فرد در سن ۶۹ سالگی در قید حیات می‌باشد [13].

بنابراین تعیین ساختار ژنهای cDNAی نو ترکیب بر اساس ژنوتیپ چنین بیمارانی و همچنین پتانسیل کافی برای بیان عملکرد بالایی توسط مولکول به

مراتب کوچکتر از دیستروفین طبیعی، به طور قوی پیشنهاد کرده است که این مولکولهای cDNA را سنتز و آنها را توسط ناقلین آدنو ویروسی یا رتروویروسی منتقل کنند و از این ژنهای کوچک (در ژن درمانی) برای تولید یک فراورده با عملکرد کافی استفاده نمایند. پژوهشگران توانسته‌اند DNAی مکملی را که از الگوی DNAی بیماران BMD تهیه شده است دوباره سنتزکرده و در شرایط In vitro توسط پلاسمید رتروویروسی یا آدنوویروسی به عضله موش mdx منتقل کنند و سپس توسط فن خرد تزریقی به تخم لقاح‌یافته موش انتقال دهند. با این پژوهشها، موشهای mdx با ژن نوترکیب (trangenic) را به‌دست آورده‌اند [21].

ج - فعال شدن بیان مولکول یوتروفین

از جمله روشهای دیگر درمانی برای بیماران DMD باز فعالی یوتروفین یا شکل جنینی دیستروفین است که موجب جبران نقصان ژن جهش یافته بالغ می‌گردد [13].

یوتروفین یا DRP محصولی پروتئینی از یک ژن طویل با طولی تقریباً معادل یک مگا باز می‌باشد که بر روی بازوی بلند کروموزوم شماره ۶ انسان یا کروموزوم شمارهٔ ۱۰ موش قرار دارد و تصور می‌رود که دست کم در عضلات اسکلتی به شکل جنینی خود یافت گردد. یوتروفین از لحاظ ساختاری به ویژه در بخش انتهای آمین (N) و بخش غنی از سیستئین و نیز ناحیهٔ انتهای کربن (C) شباهت زیادی با دیستروفین دارد و در نتیجه چنین بنظر می‌رسد که در پیوند با اکتین و تشکیل مجموعهٔ DAGC، مشابه دیستروفین عمل کند. یوتروفین در واقع در بافتهای بالغ، تظاهرات وسیعی ندارد اما در غشای پشت (فضای) سیناپس (Post Synaptic) در اتصالات عصبی - ماهیچه‌ای (Neuro Muscular) و همچنین در جایی که عضله به تاندون متصل شده است (Myotendios) در اعصاب محیطی تمرکز یافته است.

نظر به اینکه سطح تولید mRNAی ژن یوتروفین در بافت جنینی موش و انسان زیاد بوده اما در عضلات اسکلتی بافت بالغ، سطح پائینی دارد، بنظر می‌رسد که تولید mRNA و بیان این ژن باید تحت نظارت و تنظیم دقیقی باشد. همساختی (homology) گسترده‌ای که بین ردیفهای بازی ژن یوتروفین و ژن

دیستروفین وجود دارد، توجه دانشمندان را برای استفاده از یوتروفین به جای دیستروفین ناقص در بیماران، به خود جلب کرده است [13].

ظاهراً در موشهایی با نقصانِ ژن دیستروفین (موشهای mdx) که نشانه‌های خفیفی از بیماری را نشان می‌دهند تمایلی برای تولید سطح بالایی از یوتروفین وجود دارد. البته موشهای سالم چنین حالتی را ندارند. بنابراین به نظر می‌رسد که اگر یوتروفین در میو فیبرهایی با نقصان دیستروفین بیان شود، می‌تواند به شکل مؤثری از آسیب عضلانی جلوگیری کرده و یا دست کم آنرا کاهش دهد [13].

استراتژی انتقال فیزیکی ژن

برای انتقال ژن درمانگر به سلول هدف روشهای مختلفِ فیزیکی، شیمیایی و زیستی وجود دارد که هر یک از این روشها، مزایا و معایب و در مجموع کارآیی مربوط به خود را دارد. تا کنون روشهای گوناگونی برای استفاده از سلولهای پستانداران برای بیان ژن و استخراج ژنهای نوترکیب مورد استفاده قرار گرفته است که یکی از این روشها انتقال فیزیکی DNA است. این روش متضمن تزریق مستقیم داخل ماهیچه‌ای DNAی پلاسمیدی یا قطعات آدنو ویروسی یا غشاهای لیپوزومهای کاتیونی می باشد که با DNAی ترکیب شده با لیگاندهای گیرندهٔ سطحی به سلولِ هدف داخل می شود. انتقال ژن توسط در معرض قرار دادن سریع سلولها با ولتاژ بالا برای القاء موقت نفوذ پذیری غشاء (electroporation) نیز مورد توجه می باشد. در این روش در واقع با ایجاد منافذ به وسیله الکتریسیته، سوراخهای کوچکی در غشای سلولی به طور موقت ایجاد می‌شود [22].

انتقال مستقیم ساختارهای ژن DNAی مکملِ دیستروفین هم در کشت سلولی فیبروبلاست و هم در کشت سلولی میو بلاست انجام می‌یابد. قدرت دیستروفین نوترکیب که می تواند به سارکولما عضله اسکلتی موش mdx متصل شده و توسط تزریق داخل عضلانی DNA دنبال شود، بهترین گواه متقاعد کننده برای اثبات جایگیری دیستروفین نوترکیب در فیبرهای عضلانی است [13, 15]. مهمتر از آن مقایسه میزان بازسازی میوفیبرهائی که واجد دیستروفین نوترکیب هستند با میو فیبرهائی که فاقد آن می باشند، نشان می‌دهد که پروتئین دیستروفین نوترکیب از لحاظ زیستی فعال می‌باشد [15]. شروعِ عملی تزریق مستقیم

DNAی نوترکیب به عضله اسکلتی ناشی از مشاهدات دانشمندی به نام Wolff و همکارانش در سالهای ۱۹۹۰ و ۱۹۹۱ است که در سالهای پس از آن توسط دیگر دانشمندان توسعه یافت. این دانشمندان مشاهده کردند که تزریق ژنِ بتاگالاکتوزید از کلی باسیل یا ژنهای لوسیفراز کرم شب تاب به واسطه یک پلاسمید مناسب، به عضله موش منجر به بیان نسبتاً طولانی ژن در میو بلاستهای منفرد شده است. وجود هورمون رشد انسان مربوط به یافته‌های ماهیچه‌ای، در سرم حیوانات میزبان اثبات شده است. البته اساسِ سلولی و مولکولی این شکل از انتقالِ ژن هنوز کاملاً مشخص نشده است. اگرچه در مورد ژنِ لوسیفراز DNAی دست کم در جایگاه خارج کروموزومی باقی می‌ماند. و بیان آن در سطوح نسبتاً پایداری برای دست کم ۱۲ ماه ادامه پیدا می‌کند. آزمایشهای تقریباً مشابهی با ساختارهای ژن دیستروفین تزریق شده در عضله اسکلتی موش mdx انجام شده که منجر به باقی ماندن ژن نو ترکیب و بیان آن در سارکولمای فیبرهای عضلانی در محوطه‌ای خوشه‌ای اطراف محل تزریق برای مدتی بیش از سه ماه گشته است. با توجه به بیان انواع مختلف ژنهای تزریق شده در عضلات، حتی بدون ادغام آنها در کروموزوم، امید فراوان است که تزریق یک ژن درمانگر که مسئول تولید دیستروفین است به سلولهای عضلانی موش، موثر واقع خواهد شد. به طور نمونه، در یک تجربه، میوبلاستهای طبیعی هشت بیمار مبتلا به DMD به طور مستقیم تحت تزریق با ژن درمانگر قرار گرفته و پس از نمونه برداری از عضله، بیان ژن دیستروفین در سه بیمار به اثبات رسید [15].

با این همه، روشهای تزریق شدهٔ مستقیم پلاسمید برای انتقال ژنهای سوماتیکی به عضله اسکلتی آزمایش گردیده و متأسفانه مشاهده شده است که این روشها کم اثرتر از آن است که بتوان از آنها برای استفاده‌های بالینی در بیماران DMD بهره‌برداری کرد. باید توجه داشت که عوامل بسیاری در تأثیر و میزان درمان توسط این فنون دخالت دارند به عنوان مثال یکی از عوامل موثر حالت فیزیولوژیک و گسترش آسیب عضلانی می‌باشد [15].

هـ- استراتژیهای انتقال ژن با واسطه ویروس

با در نظر گرفتن بازدهی اندک انتقال مستقیم ژن، سیستم‌های ویروسی بسیاری را می‌توان به عنوان ناقلین انتقال ژن سوماتیکی با

کارآیی بیشتر به کار برد. این ناقلین شامل ویروسهای تبخال، واکسینا، آدنو ویروسهای دستکاری شده، سیستم‌های همانند سازی ناقص آدنوویروسی (Replication defictive Adenoviral)، سیستم‌های رترو ویروسی و مانند آن می باشند [22, 17, 13].

بررسی دورهٔ زندگی رترو ویروسها بیانگر شکلهای گوناگونی برای انتقال ژن سوماتیکی به صورت پایدار و موثر می‌باشد. قطعات نو ترکیب رترو ویروسی که به صورت یک سیستم همانند سازی عمل کرده و قادر است محدوده وسیعی از سلولهای انسانی را آلوده سازد یکی از بهترین ناقلین می‌باشد (برای اطلاعات بیشتر می توان به منابع ۴ و ۲۲ تا ۲۴ مراجعه کرد).انتقال ژن توسط ناقلین رترو-ویروسی در اوایل دهه ۱۹۸۰ ابداع گردید. این روش که طبیعتاً محدودیت‌هایی هم دارد از مزایای متعددی برخوردار است و به جهت کارآیی نسبتاً بالایی که دارد در انتقال ژن، به طور گسترده استفاده می‌شود [24, 22, 4].

انتقالِ ژن توسط ناقلین رترو ویروسی نسبت به سایر ناقلین مانند روش برداشت مولکول DNA با واسطه فسفات کلسیم به دلایلی مانند اندازه کوچک، آگاهی وسیع از چرخهٔ زندگی، شناختِ کامل ساختار ژنوم، امکان تهیه تیترهای بالای ویروسی، بهره‌گیری از طیف وسیع میزبانی (و از جمله سلولهای عضلانی)، دقیق بودن فرآیند داخل شدن ژنوم ویروسی به درون ژنوم میزان و ... از مزایای متعددی برخوردار است. طبیعتاً، استفاده از ناقلین رترو ویروسی معایب و خطرات احتمالی هم دارد که مشکل نسبی تخلیص آنها، ظرفیت بارگیری محدود، احتمال غیر فعال ساختن یا انهدام ژنی فعال و ضروری سلولی در محل ورود به کروموزوم میزبان از آن جمله است [24, 23].

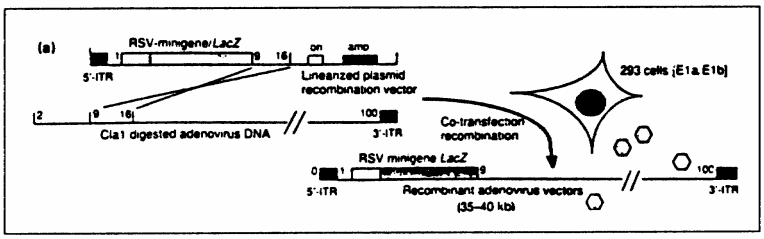
با توجه به محدودیت‌های نسبی که در استفاده از ناقلین رترو ویروسی نیز وجود دارد، پژوهشگران به فکر ابداع روشهائی از انتقال ژن هستند که این کار بدون نیاز ویروس‌ها صورت می‌گیرد و به علاوه، به هنگام ضرورت که آثار سویی مشاهده شد،به توان آن را با روش دیگر تعویض کرد. با این همه، در مقایسه با دیگر ناقلین، کماکان استفاده از ناقلین رترو ویروسی مناسب، بیشتر معمول است [24, 23].

در هنگام استفاده از ناقلین رترو ویروسی به دنبال عفونت (آلوده شدن سلول بارترو ویروس) توسط آنزیم نسخه برداری معکوس، RNAی ژنوم ویروسی

نسخه برداری شده و DNA تولید می‌گردد. این DNA به شکل پایداری وارد کروموزوم‌های سلولهای میزبان می‌شود و در آنجا در سطح بالایی بیان می‌گردد. این امر، البته نیاز به تقسیم سلولی میزبان داشته و ناقل رترو ویروسی تنها می‌تواند ژنهای عضله اسکلتی را در سلولهای اصلی فعال و واقع شده در کنار محل بازسازی، هدف قرار دهد [24, 13, 22, 4].

ناقلینی که اساسِ ویروسی نوع لوسمی (Murine Leukemia) را دارند در روشهای ژن درمانی انسان به کار گرفته شده‌اند. اگر چه سیستم‌های دورگه سازی با ویروسهای آبدانکی مخاط دهان (Vesicular Stomatatis) و قطعات ویروسی که پایداری بیشتری دارند نیز مورد بررسی قرار گرفته‌اند [4].

همچنین، ناقلین بر اساس ویروس HIV در دست مطالعه و بررسی می باشند. شایان ذکر است که در چند سال اخیر ناقلین ویروسی از سروتیپ‌های ۲ و ۵ آدنوویروسها برای انتقال داخل سلولی ژن به ریه، کبد، قلب و عضله اسکلتی نیز در نظر گرفته شده‌اند [21, 18] (شکل ۴).



شکل ۴ - قطعات آدنو ویروسی تهیه شده توسط روشهای مهندسی ژنتیک برای بیان ژن کوچک دیستروفین

گزارشهای منتشره تا سال ۱۹۹۵ بیانگر کلون کردن یک ژن کوچک دیستروفین با اندازه‌ای حدود ۶/۳ کیلو باز در ناقلین رترو ویروسی است که انتقال سلولهای ستاره‌ای کشت داده شده واجد ژن فوق به موش mdx موفقیت آمیز بوده است. تزریق مستقیم درون عضله‌ای قطعات کوچک ژنوم حاوی ژن BMD، توسط ناقل رترو ویروسی به عضله قدامی تیبلی (استخوان درشت نی) موش mdx بالغ منجر به بیان ژن دیستروفین در سارکولما در تقریباً ۶ تا ۱۰ درصد فیبرها گشته است.

شایان ذکر است که ژنِ کلون شده دیستروفین در بیماران BMD بیش از ۹ ماه بیان شده است و پروتئین حاصل در این مدت با دست کم یک جزء ۴۳ کیلو بازی از DAGC پیوند برقرار می کند. به علاوه، پژوهشگران به صورت تجربی بازسازی فیبرها را توسط انتقال رترو ویروسها تا میزان ۱۰ تا ۱۳ درصد افزایش داده‌اند. این مطلب بیانگر این است که در محیط بدن موجود زنده، سلولهای ستاره‌ای فعال شده، مسیر ثابتی برای انتقال مستقیم و پایدار ژنِ دیستروفین به عضلات به حساب می‌آیند [13].

برای انتقال ژن DNAی مکمل مربوط به BMD به عضله اسکلتی موشِ mdx، اخیراً از ناقلین آدنو ویروسی با نقصان در همانندسازی استفاده نموده‌اند. در این پژوهش، گزارش شده است که ۵ تا ۵۰ درصد فیبرهای واجد دیستروفین در موشِ نوزاد، تحت تزریق درون عضله‌ای تعداد زیادی قطعات آدنو ویروسی (حدود 10^9) قرار گرفته‌اند. به علاوه، پایداری ژنتیکی فیبرهای اصلاح شده نیز مشاهده شده است. در حالیکه کنترل میو فیبرهای موش mdx که تنها با ویروس بیان کننده بتاگالاکتوزیداز آلوده شده بودند، نشان داد که سلولهای ستاره‌ای عمل القایی خود را انجام نداده‌اند [16].

چشم انداز

تا کنون دستِ کم سه روش عمده زیر برای معرفی ژنهای دیستروفین به عضله اسکلتی مورد استفاده قرار گرفته است:

۱ - پیوند میو بلاست طبیعی.

۲ - تزریق مستقیم پلاسمیدهایی که DNAهای مکمل دیستروفین را حمل می‌کنند.

۳ - انتقال ژنهای نوترکیب توسط سیستم‌های ناقل ویروسی.

هر سه روش بالا هم در محیط موجود زنده (In vivo) و هم در محیط خارج از موجود زنده (In vitro) با درجات مختلف از موفقیت به کار گرفته می‌شوند. البته در سلولهای قلبی تنها نوع ژن درمانی که در دراز مدت موثر بوده است، تزریقِ ساده DNA در ناحیه بطنی است. تجربه‌های به عمل آمده تا کنون نمایانگر آن است که بازدهی اندک این روشها، متأسفانه استفاده از آنها را برای هر گونه درمان بالینی با مشکل جدی مواجه می‌کند. از لحاظ بالینی، تزریق داخل عضلانی ناقلین واجد ژن درمانگر، تنها برای گروه‌های محدودی از عضلات اسکلتی کارآیی

دارد. بنابراین در آینده، آزمودن راههای داخل وریدی یا داخل صفاقی ضروری به نظر می‌رسد. گرچه که این احتمال وجود دارد که با پیوند به لیگاندهای متصل شونده به سلول خاص مانند ایمونوگلوبین‌ها، پروتئین پوشش با خصوصیات تغییر داده شده تولید شود [13]. همچنین روش دیگری که اخیراً ابداع شده است، استفاده از ناقلی است که قادر است در شرایط In vivo ژنهای بزرگ را به تارهای عضلانی که تقسیم نمی‌گردد رسانیده و بیان دراز مدت ژن را میسر کند[2].

از جهت نظری در مورد ناقلین آدنو ویروسی نیز این امکان وجود دارد که با استفاده از روشهای مهندسی ژنتیک جهت تغییر پروتئین‌های پوشش ویروس، گرایش ویروس را به میزبانی خاص، اختصاصی نمود. برای تغییر گرایش ویروسی می‌توان از ژنهای درمانگر که بیان آنها توسط استفاده از پروموترها یا افزایش دهنده‌های (enhancers) خاص ماهیچه‌ای به طور محدود کنترل شده است، استفاده کرد. تا کنون از قطعات بزرگ ۲ تا ۶ کیلوبازی کراتین کیناز عضلانی و ژنهای اکتین اسکلتی برای هدایت بیان دیستروفین ویژهٔ عضله موش mdx استفاده شده است. نواحی کوچکتری از اینگونه عوامل تنظیمی و در واقع ساختارهای پروموتر / افزایش دهنده مربوط به ژن DMD امکان نگه‌داشتن ویژگیهای بافتی را داشته است. کوچک بودن این نواحی اجازه اتصال آنها را به ساختارهای cDNA دیستروفین آدنو ویروسی و رترو ویروسی می‌دهد. طراحی و ایجاد ناقلینِ ویروسی انتقال دهنده ژن درمانگر اجازه انتشار کامل ژنهای درمانگر را می دهد اما اینکه کدامیک از ناقلین، گرایش اختصاصی به آن دسته از سلولهایی را که مدنظر می‌باشد، دارند و یا کدامیک فعالیت نسخه پردازی ژن را به طور کامل دارا می‌باشند - که خود یکی از مسایل مهم در حیطه ژن درمانی می‌باشد -، از جمله سئوالات کلیدی و حیاتی به حساب می‌آیند که برای استراتژیهای ژن درمانی در مسیر درمان اساسی DMD، بایستی در آینده پاسخ داده شوند.

منابع:

1. Ahn AH. kunkle LM. The structure and functional diversity of dystrophin. ***Nature Genetics***. 1993; ***3***: 283 - 291.

2. Blau HM. Springer ML. Muscle-mediated gene therapy. ***New Engl J Med***. 1995; ***333***: 1554 - 1556

3. Boyee FM. Dystrophin is transcribed in brain from a distant upstream promoter.

Proc Natl Acad Sci. 1991; ***88***: 1276 - 1280.
4. Burns JC. Vesicular stomatatis virus glycoprotein pseudatyped retroviral vectors: Concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and from mammalian cells. ***Proc Natl Acad Sci***. 1993; ***90***, 8033 - 8037.
5. Dickson G. Human dvstrophin gene transfer: Production and expression of a functional recomlinant DNA-based gene. ***Hum Genet***. 1991; ***88***: 53 - 58.
6. Dunckley MG. Direct retroviral mediated transfer of a dystrophin minigene into mdx mouse muscle in vivo. ***Hum Mol Gene***t. 1993; ***2***: 717 - 723.
7. Dunne PW. Epstein F. Molecular biology of human muscle disease. ***Biotechnology***. 1991; ***9***: 41 - 46.
8. Emery AEH. Some unanswered questions in Duchenne muscular dystrophy introduction. ***Neur Disorders***. 1994; ***4***: 301 - 303.
9. Ervast JM. Camplell KP. Membrane organization of the dystrophinglycoprotein complexes. ***Cell***. 1991; ***66***: 1121 - 1131.
10. Feener CA. Koenig M. Kunkel LM. Alternative spilicing of human dystrophin mRNA generates isoforms at the cartoxy terminus. ***Nature***. 1989; ***338***: 509 - 511.
11. Hoffman EP. Brwon RH. Kunkel LM. Dystrophin: the protein product of the Dunchenne muscular dystrophy locus. ***Cell***. 1987; ***51***: 919 - 928.
12. Beskrovsnaya I. Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extra cellular matrix. ***Nature***. 1992; ***355***: 969 - 702.
13. Latchman DS. From genetics to gene therapy.London: Chapman & Hall; 1995: 334 - 345.
14. McNally EM. Human adhilin is alternatively spliced and the gene is located on chromosome 17921. ***Proc.Natl.Acad.Sci***. 1994; ***91***: 9690 - 9694.
15. Morgan JE. Cell and gene therapy in Duchenne muscular dystrophy. ***Human Gene Therapy***. 1994; ***5***: 165 - 173.
16. Nalil C. Marchi J. A refined restriction map of YAC clones spanning the entire human dystrophin gene. ***Mammalian Genome***. 1994; ***5***: 566 - 571.
17. Partridge T. Molecular and cell biology of muscular dystropy. London: Chapman & Hall; 1993
18. Ragot T. Efficient adenovirus mediated transfer of a human minidystrophin gene to skeletal muscle of mdx mice. ***Nature***. 1993; ***361***: 647 - 650.
19. Roberts RG. Point mutations in the dystrophin gene. ***Proc Natl Acad Sci***. 1992; ***89***, 2331 - 2335.
20. Tihy F. Skewed inactivnation of an X chromosome deleted at the dystrophin gene in an asymptomatic mother and her affectd daughter. ***Hum Gen***. 1994; 93: 563 - 567.
21. Wells DJ. Human dystrophin expression corrects the myopathic phenotype in transgenic mdx mice. ***Hum Mol Genet***. 1992; ***1***: 35 - 40.
۲۲ – نوری دلویی م ر نظری و همکاران. فرهنگ مهندسی ژنتیک. تهران : مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی؛ ۱۳۷۳.
۲۳ – نوری دلویی م ر. نظری بر ژن درمانی و چشم‌انداز آن مجله اورولوژی ایران. ۱۳۷۳؛ ۱: ۷۵ – ۶۵
۲۴ – نوری دلویی م ر. نظری بر ژن درمانی و چشم‌انداز آن، مجله اورولوژی ایران، ۱۳۷۴؛ ۲: ۲۱ – ۱۳.