

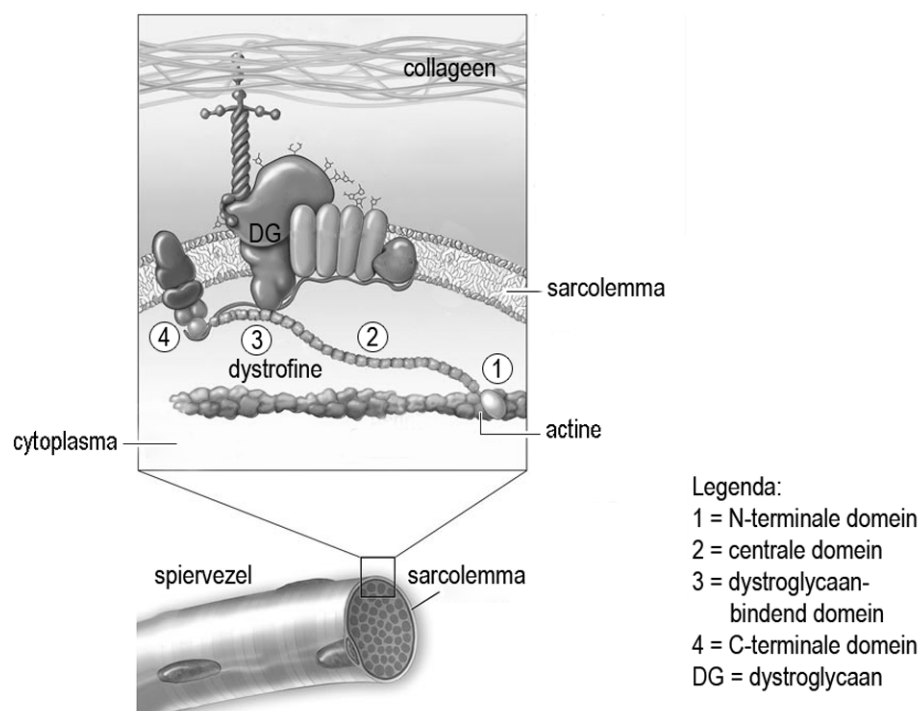
## Exon skip therapie bij Duchenne spierdystrofie

Bij de afdeling Humane Genetica van het Leids Universitair Medisch Centrum wordt gewerkt aan een therapie voor patiënten met de spierdystrofie van Duchenne. Duchenne spierdystrofie is een ernstige, erfelijke spierziekte die wordt veroorzaakt door mutaties in het DMD-gen. Als gevolg van deze mutaties wordt in de spiervezels van de patiënten geen functioneel dystrofine-eiwit gemaakt. Momenteel is er geen therapie beschikbaar voor Duchenne-patiënten en als gevolg van de toenemende spierzwakte belanden ze vaak voor hun twaalfde in een rolstoel en overlijden ze veelal voor hun dertigste. De veelbelovende 'exon skip' therapie zou de spieraafbraak bij Duchenne-patiënten kunnen vertragen en mogelijk zelfs kunnen stoppen.

Dystrofine is een groot eiwit met vier domeinen: het N-terminale domein (1), centrale domein (2), het dystroglycaan bindende domein (3) en het C-terminale domein (4). Inmiddels is bekend dat dystrofine nog redelijk kan functioneren wanneer tot 75% van het centrale domein van het eiwit is verdwenen, zolang de andere domeinen maar intact zijn.

Dystrofine vormt een belangrijk onderdeel van de verbinding tussen het celskelet in de spiervezel (actine) en het collageen in het bindweefsel buiten de spiervezel, zoals te zien is in afbeelding 1. Door deze verbinding hebben de spieren veerkracht en stevigheid.

afbeelding 1



Bij Duchenne-patiënten gaat de dystrofinefunctie verloren.

Tijdens spiercontractie beschadigen hierdoor de spiervezels. Deze worden op den duur vervangen door vet- en bindweefselcellen, wat gepaard gaat met verlies van spierfunctie.

Naast aantasting van de hartspier is ook de aantasting van bepaalde skeletspieren een belangrijke oorzaak van het op jonge leeftijd overlijden van Duchenne-patiënten.

1p **24** Welke skeletspieren zijn dit?

Gedurende het leven vermindert de massa van bepaalde eiwitten in de spieren van Duchenne-patiënten.

Drie functionele eiwitten in de spieren zijn actine, dystrofine en myosine.

2p **25** Van welk type of welke typen van deze functionele eiwitten vermindert de massa bij Duchenne-patiënten?

**A** alleen dystrofine

**B** vooral actine en myosine

**C** van zowel actine, als dystrofine als myosine

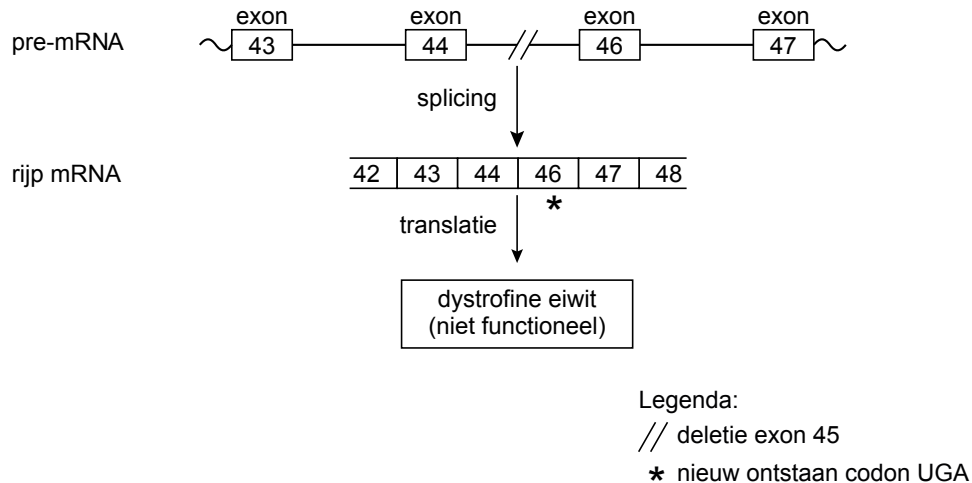
Om Duchenne-patiënten te helpen, is met behulp van gentherapie geprobeerd om de spiervezels dystrofine te laten produceren. Vanwege de zeer grote omvang van het gen (2,4 miljoen nucleotidenparen) is het onmogelijk om het in zijn geheel toe te voegen aan kernen van dystrofe spiercellen. Daarom is geprobeerd om alleen het coderende deel van het dystrofinegen, verpakt in een membraanstructuur (liposoom), plaatselijk in een spier in te brengen. Ook wordt gewerkt met speciale adenovirussen. Deze virussen kunnen genetisch materiaal transporteren dat niet groter is dan een derde van het totale coderende deel van het dystrofinegen.

Wanneer een dergelijk mini DMD-gen in de spiervezel terechtkomt, wordt er een verkort dystrofine-eiwit gemaakt. Het inbrengen van een mini DMD-gen in spiervezels van patiënten blijkt tot hoopgevende resultaten te leiden.

1p **26** Wat is een voordeel van het gebruiken van een virus ten opzichte van het gebruik van liposomen bij gentherapie?

Het DMD-gen is het grootste gen van de mens dat tot nu toe bekend is. Het coderende deel van het gen is onderverdeeld in 79 exonen. Rijp mRNA wordt gemaakt door splicing van het pre-mRNA. Dit is een proces waarbij de 79 exonen tegen elkaar aan worden gezet door de intronen te verwijderen. Duchenne spierdystrofie wordt hoofdzakelijk veroorzaakt door drie typen mutaties in het DMD-gen: verdwijnen van exonen (deleties), verdubbelingen van exonen (duplicaties), en puntmutaties. Bij sommige Duchenne-patiënten is exon 45 van het DMD-gen verdwenen, zoals schematisch in afbeelding 2 is weergegeven.

### afbeelding 2



1p 27 In of aan welk celorganel vindt de splicing van het pre-mRNA plaats?

Tijdens de translatie worden telkens setjes van drie nucleotiden (tripletten) vertaald in een aminozuur. We noemen dit het leesraam. Als bij een deletie het aantal verdwenen nucleotiden niet deelbaar is door drie, zoals bij exon 45, verspringt het leesraam. Dit heeft meestal grote gevolgen voor het bij de translatie geproduceerde eiwit.

Zo heeft de deletie van exon 45 grote gevolgen voor het dystrofine dat door de Duchenne-patiënt wordt gemaakt.

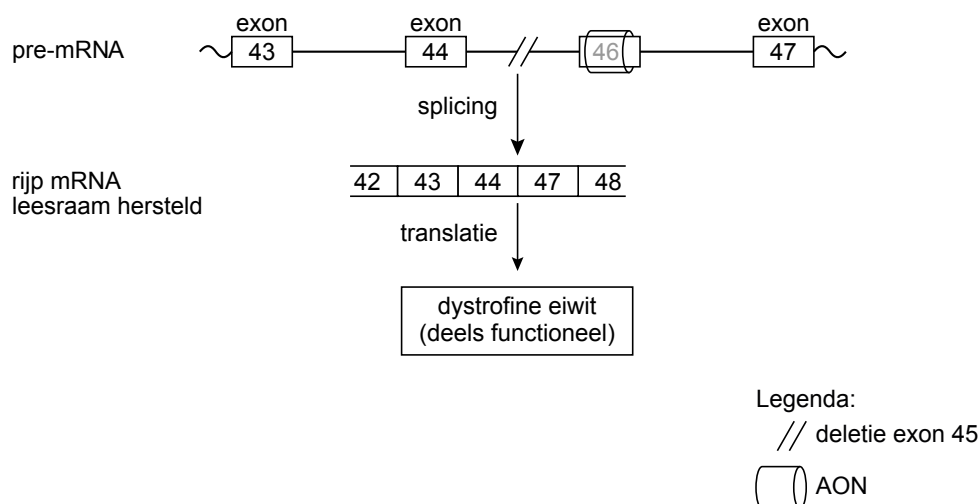
3p 28 Beschrijf met gebruik van afbeelding 2 hoe de deletie van alleen het exon 45 kan leiden tot de vorming van een kort, niet functioneel dystrofine.

Bij het ontwikkelen van de 'exon skip' therapie gebruiken de Leidse onderzoekers antisense oligoribonucleotiden (AON). Doel is herstellen van het genetische defect op mRNA-niveau, zodat een kleiner, maar deels functioneel dystrofine-eiwit gemaakt kan worden.

Sommige Duchenne-patiënten met een deletie van exon 45 blijken toch een klein beetje functioneel dystrofine te maken. Onderzoekers denken dat dit komt door het overslaan (skippen) van één of meerdere exonen tijdens de splicing van het dystrofine pre-mRNA. Hierdoor mist het rijpe mRNA, naast exon 45, nog één of meer exonen. Wanneer door deze alternatieve splicing het leesraam (dat door deletie van exon 45 verstoord is) wordt hersteld, kunnen kortere, gedeeltelijk functionerende dystrofine eiwitten gemaakt worden. Hierop is de exon skip therapie gebaseerd.

Bij exon skip therapie voor patiënten met een exon 45 deletie wordt exon 46 tijdens de splicing afgeschermd met een stukje complementair RNA (AON). Hierdoor komt ook exon 46 niet in het uiteindelijke mRNA terecht, maar wordt overgeslagen (zoals te zien is in afbeelding 3). Deze behandeling leidt tot een herstel van het leesraam.

### afbeelding 3



Het intacte exon 45 bestaat uit 176 nucleotidenparen en exon 46 uit 148, 149 of 150 nucleotidenparen. In combinatie met bovenstaande gegevens is af te leiden uit hoeveel nucleotidenparen exon 46 exact bestaat.

- 2p **29** Hoeveel nucleotidenparen bevat exon 46?
- A** 148  
**B** 149  
**C** 150

Bij de exon skip therapie werd door de onderzoekers het verpakte DMD-gen in de bloedbaan van de patiënt geïnjecteerd en niet direct in de spieren.

- 1p **30** Leg uit waarom dit effectiever is.

De exon skip therapie werkt niet wanneer bij een patiënt de ziekte van Duchenne wordt veroorzaakt door een mutatie in een van de eerste exons van het DMD-gen, het deel dat codeert voor het N-terminale domein.

- 2p **31** Geef hiervoor een verklaring.

#### Bronvermelding

Een opsomming van de in dit examen gebruikte bronnen, zoals teksten en afbeeldingen, is te vinden in het bij dit examen behorende correctievoorschrift, dat na afloop van het examen wordt gepubliceerd.