

Transgene mus som sygdomsmodeller

STATUSARTIKEL

*Cand.scient. Mikkel Bruhn Schuster &
cand.scient. Bo Torben Porse*

Gode dyremodeller for humane sygdomme har længe været anerkendt som nyttige redskaber til at studere sygdomsårsager og til udvikling af nye behandlingsformer. Fremkomsten af teknikker til præcist at kunne introducere ændringer i det murine genom har sammen med dens korte generationstid gjort musen til den mest anvendte mammale eksperimentelle organisme. Bestemmelsen af det humane genoms DNA-sekvens og den nylige sekventering af det murine ditto har lettet identifikationen af sygdomsgener betydeligt og vil i den nære fremtid resultere i et væld af nye musemodeller for humane sygdomme. I nærværende statusartikel vil vi kort beskrive muligheder og begrænsninger ved anvendelsen af både inducerede samt genetisk modificerede (transgene) mus som sygdomsmodeller illustreret ved nogle få eksempler.

For at tage begrænsningerne først så er musemodeller for humane sygdomme netop kun modeller. Åbenlyse forskelle på murin og human biologi, såsom levetid, adfærd, miljøpåvirkninger osv. er vigtige at holde sig for øje, når man ønsker at bruge resultater fra dyreforsøg til forståelse af en human sygdomstilstand. Med dette in mente er langt størstedelen af den basale biologi dog bevaret mellem mus og mand, og der er talrige eksempler på, at sygdomsfremkaldende genetiske ændringer i mennesker har resulteret i en lignende fænotype i mus (**Tabel 1**).

Et af de områder, hvor transgene mus har gjort størst nytte, er inden for stamcelleforskningen, der som bekendt er inde i en rivende udvikling i disse år. Her har man f.eks. anvendt »markør«-mus, som udtrykker det fluorescerende protein *green fluorescent protein* (GFP), til at vise, at knoglemarvsceller er i stand til at repopulere ikke alene det hæmatopoetiske system, men også andet væv såsom, hjerne, lever og muskler, når de bliver transplanteret til en letalt bestrålet recipient (1, 2). Selv om det inden for stamcellefeltet diskuteres indædt, om det specifikt er hæmatopoetiske stamceller eller »forurenende« cellepopulationer i knoglemarven, som giver ophav til denne repopulation, er de potentielle kliniske implikationer af denne observation enorme.

Om end ovennævnte GFP-mus har været overordentlig nyttige redskaber, åbner mere raffinerede »designede« mus et helt andet niveau af muligheder for at studere genetisk betingede sygdomme og samspillet mellem forskellige genprodukter. Med den nuværende teknologi er man i stand til at manipulere det murine genom essentielt som man ønsker, således at man præcist kan efterligne de genetiske forandringer, som forekommer i en lang række humane sygdomme. Som et yderligere raffinement tillader teknologien også, at de introducerede forandringer kun kommer til udtryk i de væv, man måtte ønske. Der eksisterer principielt to metoder til at ændre det murine genom (**Fig. 1**). I den

mest simple injiceres DNA, der koder for det ønskede gen, og diverse regulatoriske sekvenser, som styrer vævsspecifik ekspression, direkte ind i pronucleus af en befrugtet oocyt, som efterfølgende implanteres i en pseudogavid mus (**Fig. 1A**). Ved denne procedure integrerer det injicerede DNA i et tilfældigt locus i genomet, og alt efter integrationsstedet kan man opnå et højt eller et lavt og et mere eller mindre vævsspecifikt udtryk af transgenet. Mere subtile og præcise genetiske forandringer såsom punktmutationer, deletioner, reciprokke translokationer osv., bliver introduceret vha. såkaldt homolog rekombination i murine embryonale stamceller (ES-celler). Ved denne metode integrerer DNA'et i et på forhånd udvalgt locus. Disse manipulerede ES-celler bliver derpå injiceret i museembryoner på blastocyststadiet, som efter implantation i en pseudogavid hun giver ophav til kimære mus (**Fig. 1B**). Disse mus består af en blanding af celler, der er afledt fra det oprindelige museembryo og fra de injicerede celler. Selektiv avl identificerer derpå de mus, hvor den genetiske ændring bliver nedarvet, og disse mus avles derpå med henblik på vævsspecifik ekspression af den genetiske forandring og/eller homozygositet.

Leukæmifeltet er et af de områder, hvor man har draget utrolig stor nytte af murine modeller med henblik på at opnå en bedre forståelse af sygdommens ætiologi og i forbindelse med udviklingen af de første rationelt designede lægemidler mod nogle af disse leukæmier. Musen er særligt velegnet til transplantsforsøg af knoglemarvsceller pga. forekomsten af en stribe indavlede muselinjer, hvilket minimerer problemer med frastødning af de transplanterede celler. Et ofte ramt mål i myeloide leukæmier er tyrosinkinaser, som er en gruppe proteiner, der er involveret i at mediere proliferative signaler til cellekernen. En af de klassiske genetiske forandringer, der forekommer i forbindelse med leukæmi, er det såkaldte Philadelphia-kromosom, som er resultatet af en reciprok translokation mellem kromosom 9 og 22 (3, 4). Denne translokation findes i ca. 90% af patienterne med kronisk myeloid leukæmi (CML) og i 5% af patienterne med akut lymfoblastisk leukæmi (ALL). Alt efter det præcise fusionspunkt giver disse translokationer ophav til enten p185- eller p210-formen af fusionsproteinet Bcr-Abl, hvor Abl er en konstitutivt aktiv form af tyrosinkinase c-Abl. Ved hjælp af en stribe transplantationsforsøg på mus blev det vist, at Bcr-Abl forårsager den leukæmiske fænotype (3, 4). Ved anvendelse af en transgen musemodel, som muliggør inducerbart udtryk af Bcr-Abl, blev det desuden vist, at en stadig ekspression af Bcr-Abl var nødvendig for opretholdelsen af den maligne fænotype (5). Ved hjælp af dette snedige system var man faktisk i stand til at give den samme mus ALL tre på hinanden følgende gange ved at aktivere Bcr-Abl-ekspression afbrudt af perioder, hvor ekspressionen af Bcr-Abl var lukket ned, hvilket resulterede i fuld remission. Disse studier identificerede entydigt Bcr-Abl som et farmakologisk mål i behandlingen af ALL og CML, og ved hjælp af rationelt drugdesign udvikledes tyrosinkinasehæmmeren STI-571 (også kendt som CGP 57148 eller Glivec) Dette stof

bruges nu i behandling af CML og er en af de større medicinske succeshistorier inden for det sidste tiår.

FLT3 er en anden tyrosinkinase, som er muteret i omkring 25% af patienterne med akut myeloid leukæmi (AML) og i 37% af patienter med akut promyelocytisk leukæmi (APL). De hyppigst forekommende mutationer i FLT3 er de såkaldte *internal tandem duplications* (FLT3-ITD), som analogt med Bcr-Abl resulterer i en konstitutiv aktivering af tyrosinkinasen. I modsætning til situationen med Bcr-Abl er

ekspresion af FLT3-ITD-formen dog ikke i sig selv tilstrækkelig til at inducere en malign fænotype i mus (6). Derimod inducerer transplantation af knoglemarvsceller, der indeholder både FLT3-ITD-varianten og PML-RAR α (resultatet af en anden reciprok translokation, der forekommer med høj frekvens i APL), APL med kort latenstid og 100% penetrans (6). Denne observation er et klassisk eksempel på kooperende gener, hvor PML-RAR α stopper differentieringen af myeloide celler på progenitorstadiet, og FLT3-ITD stimu-

Tabel 1. *Eksempler på murine transgene sygdomsmodeller.*

Gen	Fænotype
<i>Common cytokine Receptor γ Chain</i> (γ_c)	Knockout <i>X-linked severe combined immunodeficiency disease</i> (XSCID)
Rag1 (rekombinase involveret i rearrangement af Ig- og TCR-generne)	Rag1 knockout Mangler V(D)J rearrangement. Ingen B- eller T-celler Anvendes i komplementationsforsøg
Rag2 (rekombinase involveret i rearrangement af Ig- og TCR-generne)	Rag2 knockout Mangler V(D)J rearrangement. Ingen B- eller T-celler Anvendes i komplementationsforsøg
PU-1 (transkriptionsfaktor)	PU-1 knockout Embryonal letal (E18) Ingen myeloide eller lymfoide celler Knockout-mus dør af infektioner kort tid efter fødslen Ingen myeloide eller lymfoide celler
GATA-3 (transkriptionsfaktor)	GATA-3 knockout Embryonal letal (E12) I kimære mus bidrager GATA-3 ^{-/-} -celler ikke til population af T-celler
Amyloid precursorprotein (APP)	Alzheimer-model f.eks. TgAPP (swe or 717) A β -peptid-aflejringer og plaques i hippocampus samt cortex
Superoxiddismutase (SOD1)	Amyotrofisk lateral sclerosis f.eks. TgSOD1 (G73R) Nedbrydning af spinale og kortikospinale motor-neuroner
NMDA (glutamatreceptor)	NMDA-knockout Øget bevægelse, stereotypi samt manglende sociale og seksuelle interaktioner
Retinoblastoma protein (tumorsuppressor, celle cyklusregulator)	RB knockout Hypofyse adenokarcinomer, feokromocytomer, thyroidekarcinomer
p53 (tumorsuppressor, apoptose)	p53 knockout Lymfomer, sarkomer og andre
Ink4A-locus: p16 ^{INK} (CDK-inhibitor) og p19 ^{ARF} (p53-stabilisator)	Ink4A-locusdeletion: Lymphomer, sarkomer, karcinomer og gliomer
MSH2 (<i>mismatch repair</i>)	MSH2 knockout Lymphomer, colon/hudkarcinomer
BCR-Abl (produkt af translokation t [9;22]) (5)	Inducibel Tg-BCR-ABL BCR-ABL-ekspresion medfører ALL
FLT3-ITD (konstitutivt aktiv version af tyrosinkinase FLT3) (6)	Udtryk af FLT3-ITD efter knoglemarvstransplantation medfører myeloproliferativ fænotype
PML-RAR α (produkt af translokation t [15;17], dominant negativ retinolsyreceptor)	Kooperativ effekt af FLT3 og PML-RAR α (Tg) medfører AML-M3
α -myosin heavy chain (myofibril komponent)	Tg- α MyHC(R403Q) og Tg- α MyHC(R403Q + Δ 468-529) Forskellige symptomer på hypertrofi, bla. fibrose, myocellulær <i>disarray</i> samt hypertrofi

Der foreligger en referenceliste til tabellen. Listen kan fås ved henvendelse til forfatterne.

lerer ekspansionen af disse. Den nylige udvikling af hæmmere der er rettet mod FLT3-kinasen, og som har vist sig effektive i cellekultur og transplantationsforsøg i mus, er forhåbentligt startskuddet til en Glivec-lignende succeshistorie (7, 8).

Transgene mus bliver naturligvis også anvendt til mere grundvidenskabeligt relaterede eksperimenter. Disse eksperimenter har ofte ikke direkte klinisk relevans, men sætter af og til en helt ny standard for biologisk tænkning. Et eksempel på dette kom for nylig fra *Rudolf Jaenisch* og kolleger, som demonstrerede de essentielt ubegrænsede

anvendelsesmuligheder af transgene dyremodeller og de teknikker, der er forbundet hermed (9). I en sand tour de force brugte denne gruppe en kombination af nukleær kloning, homolog rekombination i ES-celler efterfulgt af kontrolleret differentiation af disse til at rette en genetisk defekt i en transgen dyremodel. Den anvendte dyremodel bærer en mutation i genet, som koder for Rag2-rekombinasen, hvilket resulterer i en SCID-fænotype grundet en komplet mangel på modne B- og T-lymfocytter. Fibroblastceller, der blev isoleret fra halen af denne mus, blev ekspanderet in vitro, hvorpå kernen fra disse celler blev injiceret i kernefrie

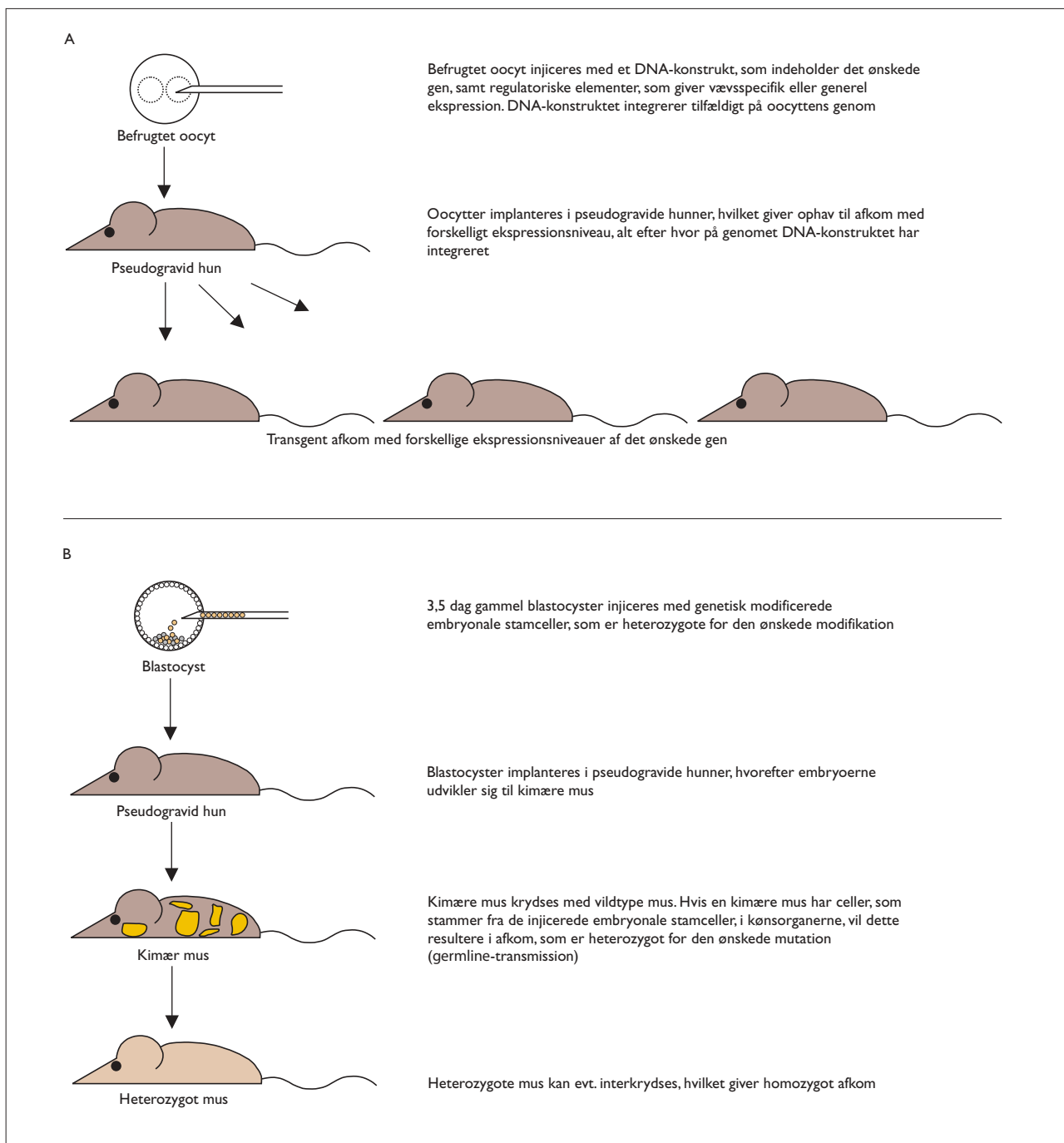


Fig. 1. Generering af transgene mus ved henholdsvis (A) oocytinjektion af DNA og (B) blastocytinjektion af genetisk modificerede embryonale stamceller.

oocytter – dvs. hvad man forstår ved nukleær kloning. Disse oocytter blev efterfølgende ekspanderet *in vitro* til blastocyststadiet, hvorpå de blev anvendt til at derivere ES-celler. Den genetiske mutation i Rag2 blev efterfølgende rettet vha. homolog rekombination, og de resulterende ES-kloner (nu med et funktionelt Rag2gen) blev differentieret til såkaldte *embryoid bodies*, hvilket er en klump celler, som deler en lang række egenskaber med et tidligt embryo. Disse *embryoid bodies* blev efterfølgende transduceret med et gen (HoxB4), hvis produkt for nylig er blevet brugt til voldsomt at forøge repopulationspotentialet af hæmatopoetiske stamceller (HSC), og differentieret *in vitro* til HSC-lignende celler. Da disse celler blev transplanteret ind i en Rag2-mutant mus, gav de ophav til både modne B- og T-celle-lymfocytter, dog i relativt beskedne mængder. Denne teknologiske kraftpræstation leverer et formelt bevis for konceptet om terapeutisk kloning. Det er altså nu i praksis muligt at kurere en patient (foreløbig dog kun mus), med dens eget cellemateriale. Om man så vælger at gå denne vej kræver naturligvis grundige etiske og økonomiske overvejelser.

Vi har i denne artikel kort beskrevet nogle få systemer, hvor mus har tjent som nyttige eksperimentelle modeller til studiet af humane sygdomstilstande.

Sekvensbestemmelsen af det humane genom, den stadig stigende korrelation mellem genotype og fænotype for et hav af maligne tilstande samt muligheden for præcist at kunne skræddersy mus med de ønskede genetiske forandringer, vil i fremtiden kun øge anvendelsen af mus som en eksperimentel sygdomsmodel.

Summary

Mikkel Bruhn Schuster & Bo Torben Porse: Transgenic mice as disease models.

Ugeskr Læger 2003;165:793-6.

Transgenic animal models have proven to be useful tools in understanding both basic biology and the events associated

with disease. Recent technical advances in the area of genomic manipulation in combination with the availability of the human and murine genomic sequences now allow the precise tailoring of the mouse genome. In this review we describe a few systems in which transgenic animal models have been employed for the purpose of studying the etiology of human diseases.

Reprints: Bo Porse, Laboratorium for Genterapiforskning, H:S Rigshospitalet, DK-2100 København Ø. E-mail: porse@rh.dk

Antaget den 15. januar 2003.

H:S Rigshospitalet, Laboratorium for Genterapiforskning.

Litteratur

1. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001;410:701-5.
2. Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function. *Cell* 2001;105:829-41.
3. Druker BJ. STI571 (Gleevec) as a paradigm for cancer therapy. *Trends Mol Med* 2002;8:S14-8.
4. Capdeville R, Buchdunger E, Zimmermann J et al. Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug. *Nat Rev Drug Discov* 2002;1:493-502.
5. Huettner CS, Zhang P, van Etten RA et al. Reversibility of acute B-cell leukaemia induced by BCR-ABL1. *Nature Genetics* 2000;24:57-60.
6. Kelly LM, Kutok JL, Williams IR et al. PML/RARalpha and FLT3-ITD induce an APL-like disease in a mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:8283-8.
7. Kelly LM, Yu JC, Boulton CL et al. CT53518, a novel selective FLT3 antagonist for the treatment of acute myelogenous leukemia (AML). *Cancer Cell* 2002;1:421-32.
8. Weisberg E, Boulton C, Kelly LM et al. Inhibition of mutant FLT3 receptors in leukemia cells by the small molecule tyrosine kinase inhibitor PKC412. *Cancer Cell* 2002;1:433-43.
9. Rideout III WM, Hochedlinger K, Kyba M et al. Correction of a genetic defect by nuclear transplantation and combined cell and gene therapy. *Cell* 2002;109:17-27.

Molekylærbiologisk fokus på stamcelleforskningen

STATUSARTIKEL

Peter Ebbesen

Stamceller defineres som celler, der kan 1) reproducere sig selv og 2) differentiere til mange celletyper. Begge processer må naturligvis være strengt regulerede for at sikre organismens overlevelse. Det er først inden for de seneste år, at stamcellerne er blevet »taget under behandling« af molekylærbiologerne. Årsagen er den simple, at man har haft svært ved at isolere stamcellerne. Deres fænotype var ofte ukendt, og de forekommer oftest som en endog meget lille minoritet blandt de andre celletyper i vævene.

Der er nu kendskab til en række markører for både embryonale (1) og adulte stamceller og andre udifferentierede celler, således at de kan frasorteres ved en cellesuspension, f.eks. ved at lade dem fange af antistoffer, der selv er forankret til et fast underlag. Det er endog med konfokal laserdissektion muligt at »fiske« enkeltceller ud af et væv.

Stamcellernes molekylære processer er nu under hastig udredning

En stamcelles molekylære fænotype kan bestemmes med *array*-hybridiseringsteknikken, hvor et meget stort antal geners aktivitet på et givet tidspunkt kan aflæses. Dette sker ved at påvise tilstedeværelse i cellerne af de specifikke med-