

Mutace jako příčina geneticky podmíněných onemocnění u člověka - příklady

**Mutace u člověka – primární podstata genetických patologických stavů
(chorobné stavy s mutací genetické informace různého druhu, rozsahu a lokalizace)**

1/50 novorozenců – VVV

1/100 – monogenní choroba

1/200 – chromozomová aberace

Geneticky podmíněná onemocnění u člověka - typy

1. **Monogenní choroby (AD, AR, vázané na pohl. chromozomy)**
2. **Chromozomální aberace**
3. **Patologické stavy s multifaktoriálním typem dědičnosti (cukrovka, arterioskleróza)**
4. **Genetické poruchy somatických buněk (nádory)**
5. **Mitochondriální genetické poruchy**

Mutace lidských genů v populaci

Co ovlivňuje rozšíření škodlivé mutantní alely v populaci ?

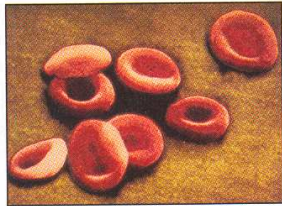
$$(p^2 + 2pq + q^2 = 1) \quad p + q = 1$$

Př. fenylketonurie 1/10 000 $q^2 = 0,0001$ $q = 0,01$ $2pq = 0,02$, tj. 1 na 50

- A. Heterozygotní výhoda – selekční výhoda oproti oběma homozygotům (např. srpkovitá anémie, cystická fibróza)
- B. Vysoká mutační rychlost (např. Duchennova muskulární dystrofie)

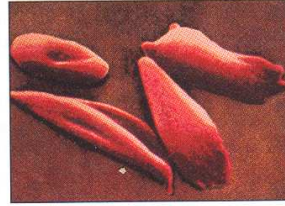
Srpkovitá anémie – strukturní varianta hemoglobinu - heterozygotní výhoda

Normal red blood cells



a.

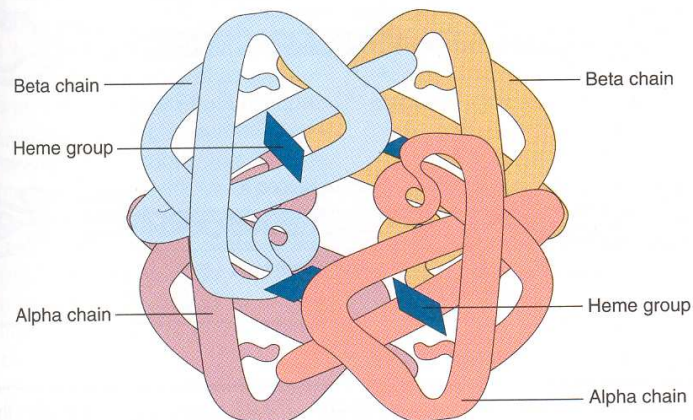
Sickled red blood cells



b.

figure 11.2

Sickle cell disease results from a single base change. Hemoglobin carries oxygen throughout the body. When normal (a), the globular molecules do not aggregate, enabling the cell to assume a rounded shape. In sickle cell disease (b), a single DNA base change replaces one amino acid in the protein with a different one (valine replaces glutamic acid). The result is a change in the surface of the molecule that causes hemoglobins to aggregate into long, curved rods that deform the red blood cell. Sets of 14 rods twist together.



HbA/HbA - homozygoti

HbA/HbS – heterozygoti

HbS/HbS - srpkovitá anémie

(poruchy mikrocirkulace, infarkt kostní dřeně, poškození tkáně)

Onemocnění malárií

(infekce plazmodiem)

HbA/HbA : HbA/HbS

1, 46 : 1

table 11.3**Mutation Rates of Some Genes That Cause Inherited Disease**

	Mutations per Million Gametes	Signs and Symptoms
X-linked		
Duchenne muscular dystrophy	40–105	Muscle atrophy
Hemophilia A	30–60	Severe impairment of blood clotting
Hemophilia B	0.5–10	Mild impairment of blood clotting
Autosomal Dominant		
Achondroplasia	10	Very short stature
Aniridia	2.6	Absence of iris
Huntington disease	<1	Uncontrollable movements, personality changes
Marfan syndrome	4–6	Long limbs, weakened blood vessels
Neurofibromatosis type 1	40–100	Brown skin spots, benign tumors under skin
Osteogenesis imperfecta	10	Easily broken bones
Polycystic kidney disease	60–120	Benign growths in kidneys
Retinoblastoma	5–12	Malignant tumor of retina

Důsledky genových mutací u dědičných onemocnění člověka

Substituce nukleotidů (bodové mutace)

Mutace měnící smysl kodónu (substituce aminokyselin)

Nesmyslné mutace (předčasné stop kodóny)

Mutace zpracování RNA (ničící sestřihová místa, místa připojení čepičky, polyadenylační místa nebo tvoří kryptická místa sestřihu). Abnormální sestřih vede často k posunům čtecího rámce a vzniku předčasných stop kodónů.

Mutace regulace ovlivňující vazbu transkripčních faktorů, kontrolu transkripce nebo další aspekty genové exprese

Delece a inserce

Adice nebo delece malého počtu bází

- Není-li počet bází, jichž se týká, násobkem 3, způsobují posun čtecího rámce
- Je-li počet bází, jichž se týká, násobkem 3, způsobují ztrátu nebo zisk kodónů a následně i aminokyselin ve výsledných produktech

Větší genové delece, inverze, fúze a duplikace (mohou být zprostředkovány homologii sekvencí v rámci jednoho vlákna nebo mezi vlákny DNA)

Inserce elementu L1 nebo *Alu* (naruší transkripci nebo přerušuje kódující sekvenci)

Expanze trinukleotidových repetitiv

Důsledky genových mutací

Mutace:

- a) mění smysl kodónu
- b) nesmyslné
- c) neutrální
- d) mlčí

a) **Transition mutation** (AT to GC in this example)

5' TCTCAA**A**AAATTTACG 3' 5' TCTCAA**G**AAATTTACG 3'
3' AGAGTT**T**TTAAATGC 5' 3' AGAGTT**C**TTAAATGC 5'

b) **Transversion mutation** (CG to GC in this example)

5' TCT**C**AAAAATTTACG 3' 5' TCT**G**AAAAATTTACG 3'
3' AGAG**G**TTTTTAAATGC 5' 3' AGAG**C**TTTTTAAATGC 5'

c) **Missense mutation** (change from one amino acid to another; here a transition mutation from AT to GC changes the codon from lysine to glutamic acid)

5' TCTCAA**A**AAATTTACG 3' 5' TCTCAA**G**AAATTTACG 3'
3' AGAGTT**T**TTAAATGC 5' 3' AGAGTT**C**TTAAATGC 5'
... Ser | Gln | **Lys** | Phe | Thr Ser | Gln | **Glu** | Phe | Thr ...

d) **Nonsense mutation** (change from an amino acid to a stop codon; here a transversion mutation from AT to TA changes the codon from lysine to UAA stop codon)

5' TCTCAA**A**AAATTTACG 3' 5' TCTCAA**T**AAATTTACG 3'
3' AGAGTT**T**TTAAATGC 5' 3' AGAGTT**A**TTAAATGC 5'
... Ser | Gln | **Lys** | Phe | Thr Ser | Gln | **Stop** ...

e) **Neutral mutation** (change from an amino acid to another amino acid with similar chemical properties; here an AT to GC transition mutation changes the codon from lysine to arginine)

5' TCTCAA**A**AAATTTACG 3' 5' TCTCAA**G**AAATTTACG 3'
3' AGAGTT**T**TTAAATGC 5' 3' AGAGTT**C**TTAAATGC 5'
... Ser | Gln | **Lys** | Phe | Thr Ser | Gln | **Arg** | Phe | Thr ...

f) **Silent mutation** (change in codon such that the same amino acid is specified; here an AT to GC transition in the third position of the codon gives a codon that still encodes lysine)

5' TCTCAA**A**AAATTTACG 3' 5' TCTCAA**G**AAATTTACG 3'
3' AGAGTT**T**TTAAATGC 5' 3' AGAGTT**C**TTAAATGC 5'
... Ser | Gln | **Lys** | Phe | Thr Ser | Gln | **Lys** | Phe | Thr ...

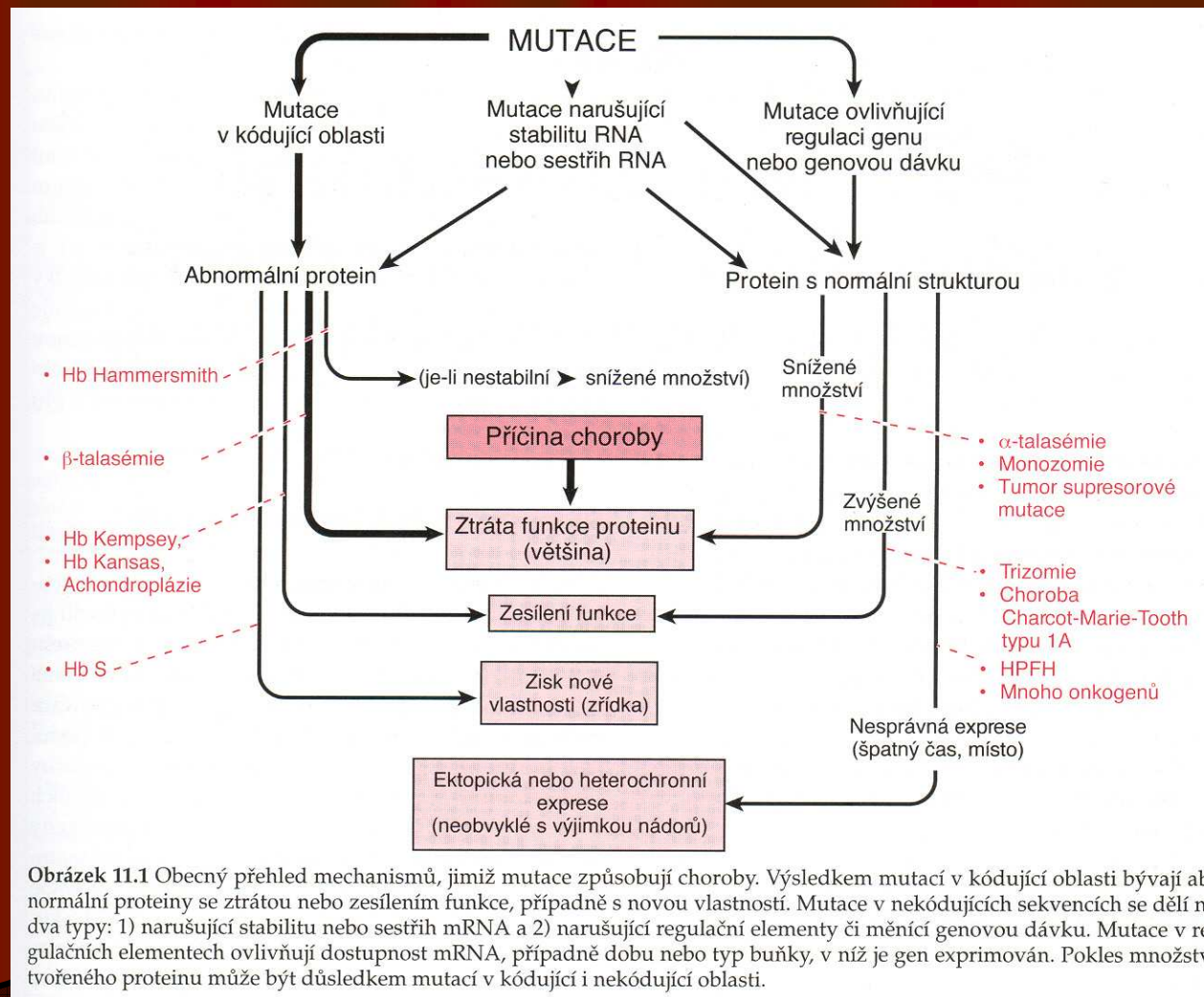
g) **Frameshift mutation** (addition or deletion of one or a few base pairs leads to a change in reading frame; here the insertion of a GC base pair scrambles the message after glutamine)

5' TCTCAA**A**AAATTTACG 3' 5' TCTCAA**G**AAATTTACG 3'
3' AGAGTT**T**TTAAATGC 5' 3' AGAGTT**C**TTTAAATGC 5'
... Ser | Gln | **Lys** | Phe | Thr Ser | Gln | **Glu** | **Ile** | **Tyr** ...

Existují „horká místa“ pro vznik genových mutací ?

- **transice** – substituce purinu purinem či pyrimidinu pyrimidinem (A – G) (T – C)
- **transverse** – substituce pyrimidinu purinem a naopak
- transverse by měla být teoreticky častější (každá báze 2 transverse a 1 transice) ale v praxi nalezena převaha transicí
- CG pár bývá často metylován (5-metylcytosin – deaminací vzniká thymin)
- transice C – T nebo G – A
- **GC pár představuje horké místo (hotspot) tvorby mutací v lidském genomu !!!**
(asi 25 x častěji než v jiném místě)

Vliv mutací v kódujících a nekódujících sekvencích na funkci proteinu



Monogenně podmíněná onemocnění u člověka – převaha AD dědičnost

Tabulka 3. Mendelistické znaky rozeznávané u člověka

	Pravděpodobné	Možné
autozomálně dominantní	2 470	1 241
autozomálně recesivní	647	984
X-vázané recesivní	190	178
celkem	3 307	2 403
	5 710	

**Mutace jako příčina geneticky
podmíněných onemocnění u člověka
- onemocnění hemoglobinu -
(hemoglobinopatie)**

Globinová onemocnění

- **poruchy lidských hemoglobinů (hemoglobinopatie) – nejrozšířenější monogenní onemocnění ve světě**
- **asi 5 % světové populace tvoří nosiči genů pro klinicky významné poruchy hemoglobinu**
- **globinové choroby – vzor pro studium dalších genetických onemocnění**
- **první milník – defekt u srpkovité anémie (1949 – *Pauling* prokázal že hemoglobin u pacientů se srpkovitou anémií - HbS - migruje odlišně od hemoglobinu normálních jedinců) – substituce neutrálního valinu za kyselou kys. glutámovou v poloze 6 β -globinového řetězce)**
- **porodní frekvence 1 : 20, heterozygoti 1 : 3**

Struktura hemoglobinu, uspořádání globinových genů a pseudogenů v rámci genových rodin na chromozomech 16 a 11

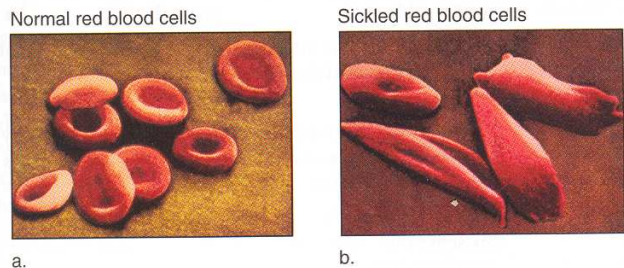
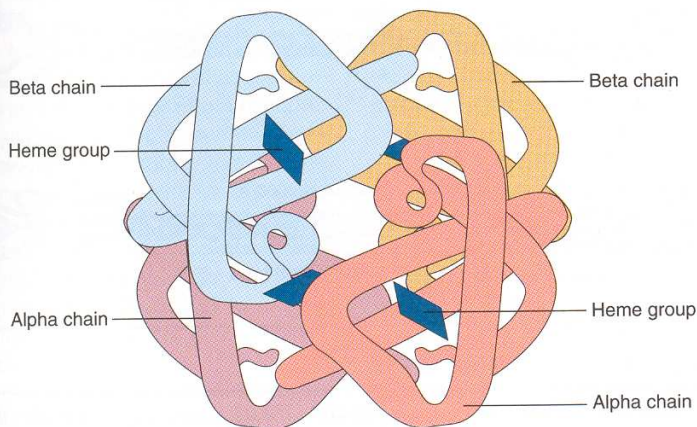


figure 11.2

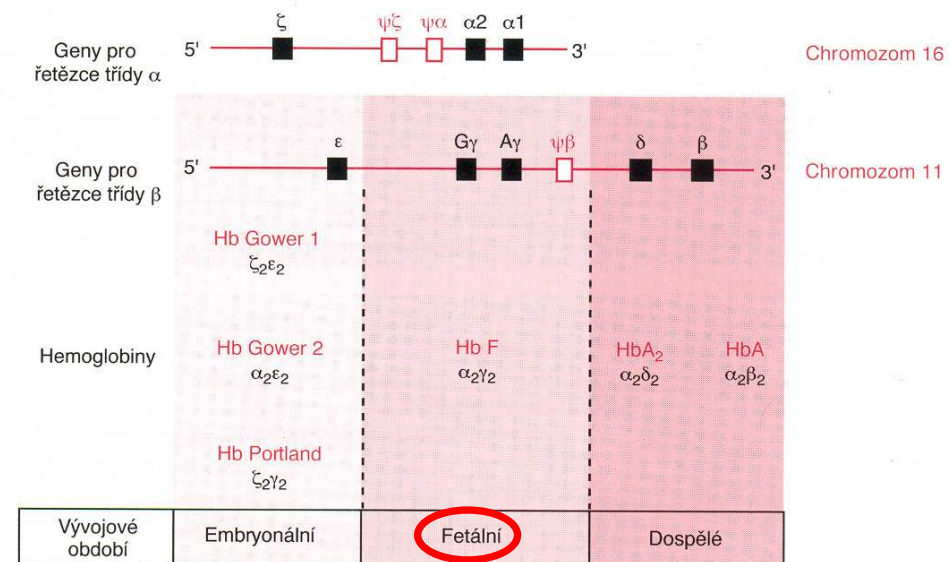
Sickle cell disease results from a single base change. Hemoglobin carries oxygen throughout the body. When normal (a), the globular molecules do not aggregate, enabling the cell to assume a rounded shape. In sickle cell disease (b), a single DNA base change replaces one amino acid in the protein with a different one (valine replaces glutamic acid). The result is a change in the surface of the molecule that causes hemoglobins to aggregate into long, curved rods that deform the red blood cell. Sets of 14 rods twist together.



HbA – $\alpha_2\beta_2$ globulární tetramer

Genová dávka: 4 geny pro α globin

2 geny pro β globin



Obrázek 11.2 Uspořádání lidských globinových genů a hemoglobinů tvořené v různých obdobích vývoje člověka. (Překresleno podle Stamatoyannopoulos G, Nienhuis AW Hemoglobin switching. In Stamatoyannopoulos G, Nienhuis AW, Leder P, Majerus PW (ed.) The Molecular Basis of Blood Diseases. Philadelphia, WB Saunders 1987, 66–105.)

Změny v expresi globinových genů během vývoje – „přepínání globinů“

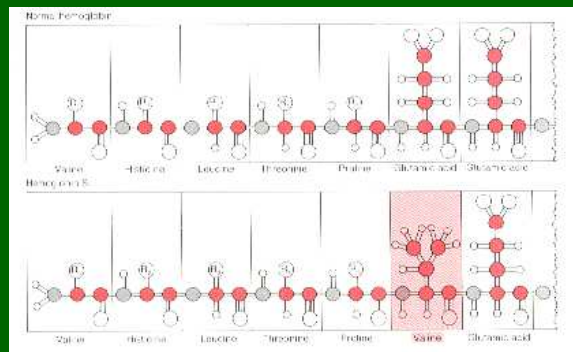
Dědičné poruchy hemoglobinu

- Strukturální varianty – spojené se změnou globinového polypeptidu bez ovlivnění rychlosti jeho syntézy
- Talasémie – u kterých se snížena syntéza jednoho nebo více globinových řetězců způsobující nerovnováhu v relativních množstvích řetězců β a α
- Hereditární perzistence fetálního hemoglobinu

Strukturální varianty hemoglobinů

- příčina – bodové mutace (400 abnormálních hemoglobinů)
- klinicky způsobují: a) hemolytické anémie
 - b) varianty s narušeným transportem O_2
 - c) talasemie – nedostatek globinových polypeptidů

Srpkovitá anémie autozomálně recesivní dědičnost



Nahore: normální hemoglobin

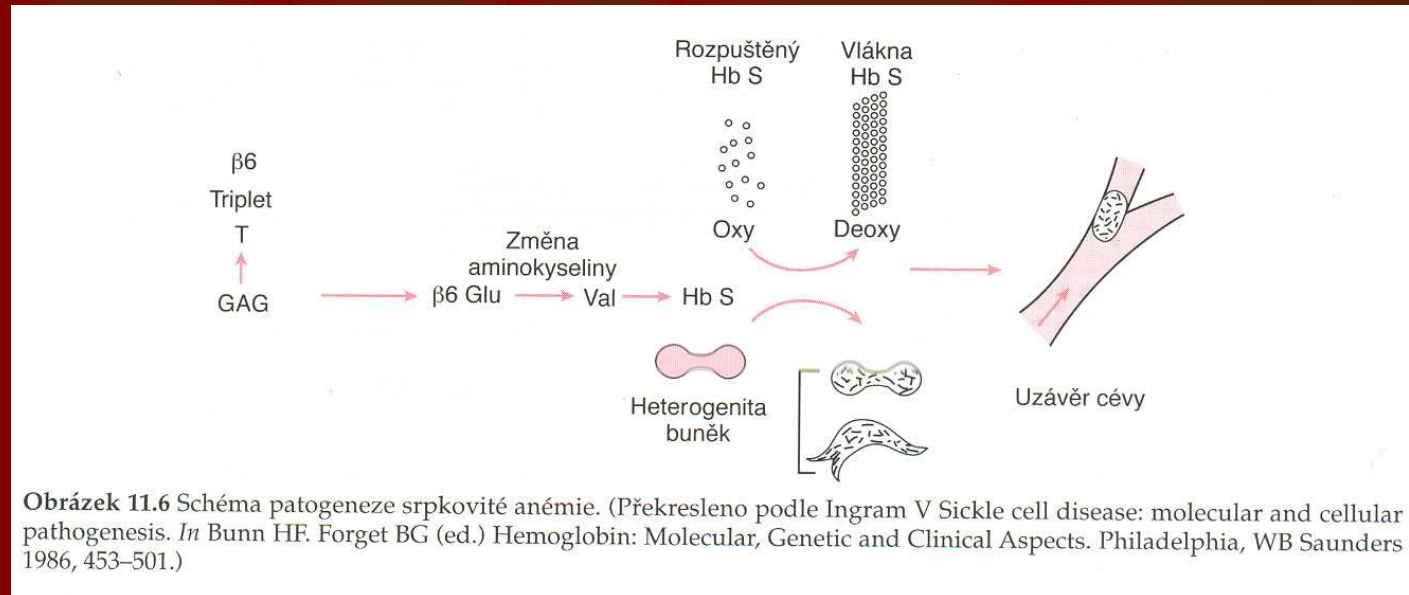
Dole: hemoglobin S

(záměna kys. glutamové za valin)

Je zobrazeno pouze prvních sedm aminokyselin

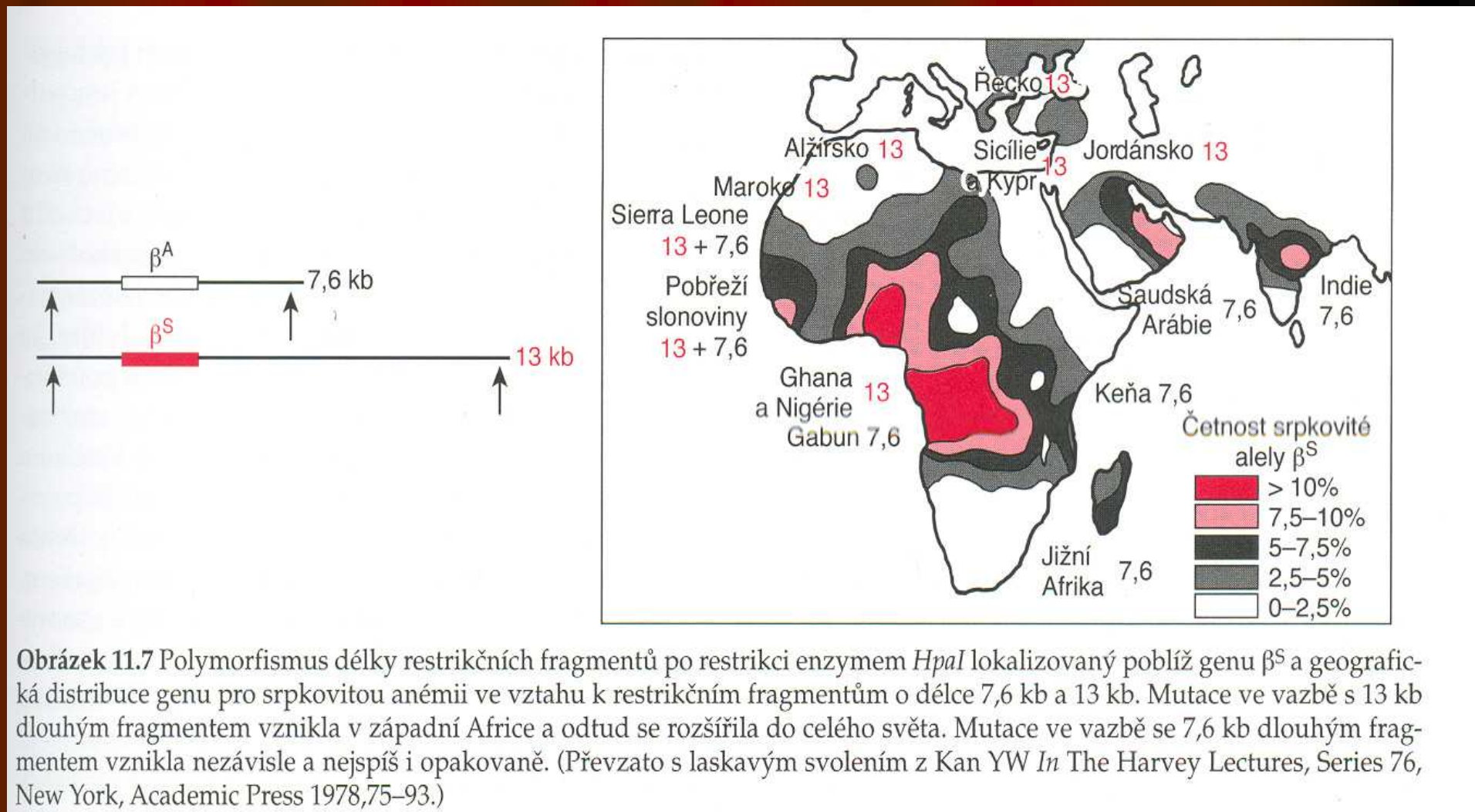


Srpkovitá anémie – příklad balancovaného polymorfizmu – heterozygotní nositelé patologické alely mají selekční výhodu oproti oběma homozygotům – odolnost oproti endemické malárii



Klinický stav	Hemoglobin	Složení hemoglobinu	Genotyp
Normální	Hb A	$\alpha^A_2 \beta^A_2$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$ β/β
„Náznak“ srpkovité anémie	Hb A, Hb S	$\alpha^A_2 \beta^A_2$ $\alpha^A_2 \beta^S_2$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$ β/β^S
Srpkovitá anémie	Hb S	$\alpha^A_2 \beta^S_2$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$ β^S/β^S

Geografická distribuce genu pro srpkovitou anémií

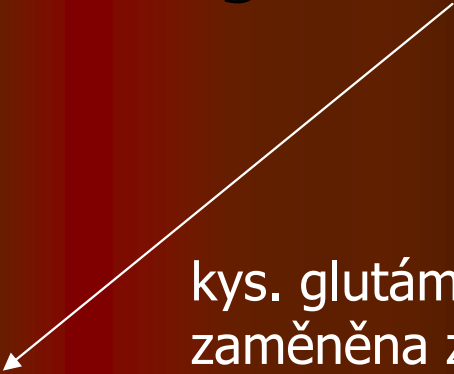


Složení heterozygoti

- pacienti s recesivně dědičným onemocněním jsou nositelem dvou různých defektních alel
- Příklad: HbS/HbC heterozygoti pro hemoglobin C a S – mírnější postižení

nižší rozpustnost, mírná hemolytická anémie

kys. glutámová
zaměněna za lysin



Tabulka 11.2 Hlavní třídy strukturálních variant hemoglobinu*

Varianta	Molekulární podstata mutace	Změna polypeptidu	Patofyziologický efekt mutace	Dědičnost
Varianty způsobující hemolytickou anémii:				
1) Hemoglobiny s novými fyzikálními vlastnostmi				
Hb S	Jednonukleotidová substituce	β-řetězec: Glu6Val	Polymerizace deoxygenovaného Hb S → srpkovitost krvinek → uzávěry cév a hemolýza	AR
Hb C	Jednonukleotidová substituce	β-řetězec: Glu6Lys	Sklon oxygenovaného Hb ke krystalizaci → snížení deformability krvinek → mírná hemolýza. U složených heterozygotů Hb S / Hb C se projevuje jako mírnější srpkovitá anémie	AR
Varianty způsobující hemolytickou anémii:				
2) Nestabilní hemoglobiny				
Hb Hammersmith	Jednonukleotidová substituce	β-řetězec: Phe42Ser	Nestabilní Hb → precipitace Hb → hemolýza, navíc snížená afinita k O ₂	AD
Hb Gun Hill	Jednonukleotidová substituce	β-řetězec: delece 5 aminokyselin	Nestabilní Hb se zvýšenou afinitou k O ₂	AD
Hemoglobiny s narušeným transportem O₂				
Hb Hyde Park (a Hb M)	Jednonukleotidová substituce	β-řetězec: His92Tyr	Substituce způsobuje rezistenci oxidovaného železa v hemu k působení methemoglobin reduktázy → Hb M neschopný přenášet O ₂ → cyanóza (asymptomatická)	AD
Hb Kempsey	Jednonukleotidová substituce	β-řetězec: Asp99Asn	Substituce udržuje Hb ve stavu s vysokou afinitou k O ₂ → méně O ₂ tkáním → polycytémie	AD
Hb Kansas	Jednonukleotidová substituce	β-řetězec: Asn102Thr	Substituce udržuje Hb ve stavu s nízkou afinitou k O ₂ → asymptomatická cyanóza	AD
Hb Tak	Posun čtecího rámce poblíž konce řetězce → translace pokračuje až k nejbližšímu stop kodónu v novém čtecím rámci	β-řetězec: navíc 11 zbytků	Silně zvýšená afinita k O ₂ způsobená přidáním C-terminálního hydrofobního „ocasů“, který brání molekule zaujmout stabilní „deoxy“ tvar	AR
Varianty s talasemickými fenotypy**				
Hb E	Jednonukleotidová substituce	β-řetězec: Glu26Lys	Mutace → abnormální Hb a současně snížená syntéza (abnormální sestřih RNA) → mírná talasémie (viz obr. 11.14)	AR
Hb Lepore a Hb Miyada (anti-Lepore)	Chybné párování homologních sekvencí a nerovnoměrný crossing-over mezi dvěma různými geny → delece 7 kb (Lepore) → inserce 7 kb (Miyada) (viz obr. 11.10)	Hb Lepore: fúzní řetězec δβ Hb Miyada: fúzní řetězec βδ	Oba: neúčinná syntéza fúzních řetězců → závažná δβ-talasémie u homozygotů nebo složených heterozygotů s β-talasemickými alelami	Oba: AR
Hb Constant Spring	Substituce ve stop kodónu: změna UAA nebo UAG na CAA nebo CAG → translace pokračuje až k nejbližšímu dalšímu stop kodónu	α-řetězec: navíc 31 aminokyselin	Narušená syntéza a nestabilita prodlouženého α-řetězce → hemolýza. α-talasémie u složených heterozygotů s α-talasemickými mutacemi (–/α ^{CS} α)	AR

* Hemoglobinové varianty jsou nazývány podle místa bydliště prvního objeveného pacienta.

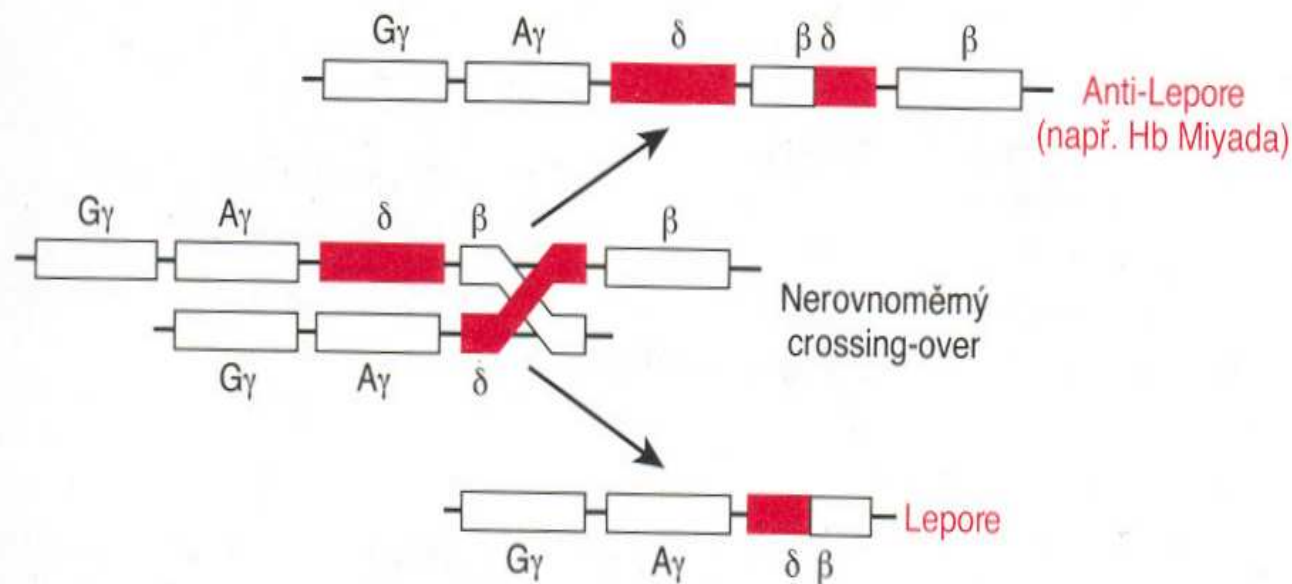
** Výčet dalších strukturálních variant β-řetězce způsobujících β-talasémii je v tabulce 11.4.

Další genetické mechanismy vedoucí ke globinopatiím – mutace způsobující posun čtecího rámce

MUTATION											
Codon no.	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149
α^A -Codons	A A G	U A C	G U L	A A G	C U G	G A G	C C U	C G L	U A G	C A G	U U
α^A -Globin	lys	tyr	arg	STOP							
Wayne codons	A A	U A C	C G U	U A A	G C U	G A G	C C U	C G L	U A G	C A G	
Wayne globin	asn	thr	val	lys	leu	gln	pro	arg	STOP		

Fig. 4.14. A frameshift mutation leading to **haemoglobin Wayne**. Deletion of the third base in codon 139 of the α -globin gene means that the first base of the original codon 140 now becomes the third base of the new codon 139. This frameshift alters the termination codon at position 142 and there is read-through to a new termination codon at position 147. Hb Wayne thus has five extra amino acid residues and three new residues at positions 139–141.

Fúzní gen Hb Lepore



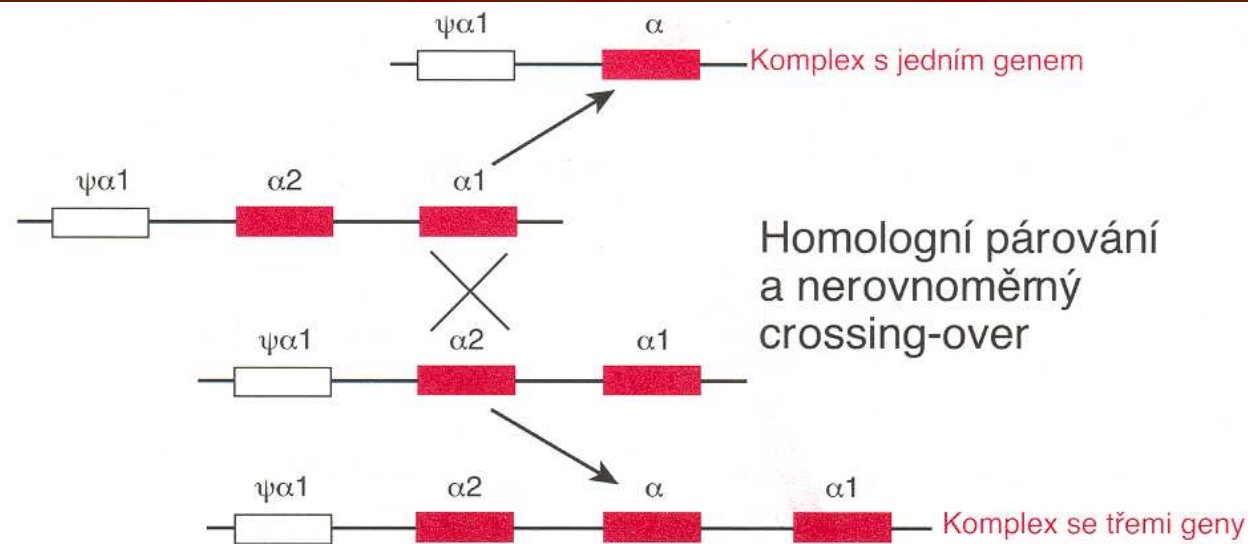
Obrázek 11.10 Model vzniku genů Lepore a anti-Lepore (např. Hb Miyada) nerovnoměrným crossing-overem. Vedle sebe se nacházející geny γ a β se liší pouze 10 z celkového počtu 146 aminokyselin. Dojde-li k chybnému párování následovanému intragenovým crossing-overem, vznikají dva hybridní geny: jeden s delecí části obou lokusů (Lepore gen), druhý s odpovídající duplikací (anti-Lepore). (Překresleno podle Weatherall DJ, Clegg JB *The Thalassemia Syndromes*, 3. vyd., Oxford, Blackwell Scientific Publications 1981.)

Talasémie: nerovnováha syntézy globinových řetězců

- rozšířena po celé Africe, na Středním východě, v Indii, JV Asii, Polynésii
- výhoda přenašečů vůči malárii
- mutace způsobuje narušení syntézy nebo stability buďto α nebo β řetězců (precipitace, destrukce erytrocytů)
 - 1) α - talasemie
 - 2) β – talasemie

α - thalasemie

- dědičné poruchy tvorby α – globinu (abnormální hemoglobin není schopen přenášet kyslík)
- α^0 -tal - nedochází k žádné tvorbě α -řetězců
- α^+ -tal - částečná exprese genu



Obrázek 11.11 Pravděpodobný mechanismus vzniku nejčastější formy α -talasémie, která je způsobena delecí jednoho nebo dvou α -globinových genů na jednom chromozomu. Výsledkem chybného nasednutí, homologního párování a rekombinace mezi genem $\alpha 1$ na jednom chromozomu a $\alpha 2$ na druhém homologním chromozomu je delece jednoho z α -genů. (Překresleno podle Orkin SH Disorders of hemoglobin synthesis: The thalassemias. In Stamatoyannopoulos G, Nienhuis AW, Leder P, Majanis PW (ed.) The Molecular Basis of Blood Diseases. Philadelphia, WB Saunders 1987, 106–126.)

α - thalasemie

Tabulka 11.3 Klinické stavy u různých alfa-talasemických genotypů

Klinický stav	Počet funkčních α -genů	Genotyp	Produkce α -řetězců
Normální	4	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	100 %
Přenašeč	3	$\alpha\alpha/\alpha-$	75 %
Náznak α -talasémie (mírná anémie, mikrocytóza)	2	$\alpha-/ \alpha-$ nebo $\alpha\alpha/--$	50 %
Choroba Hb H (β_4) (středně závažná hemolytická anémie)	1	$\alpha-/--$	25 %
Hydrops fetalis nebo homozygotní α -talasémie (Hb Bart's: γ_4)	0	$--/--$	0 %

β - thalasemie

- snížená tvorba β -globinu – důsledek hypochromní mikrocytární anémie
- nerovnováha v syntéze globinů vede k precipitaci nadbytečných α -řetězců a poškození membrány červených krvinek
- často důsledek substituce jednotlivých párů bazí (100 různých bodových mutací) !!!
- osoba nesoucí dvě β - talasemické alely je často složeným heterozygotem
- varianty s β^0 a β^+ alelami

Molekulární podstata β -thalasemií

Typ	Příklad	Fenotyp	Postižená populace
Delece*			
Delece β -globinového genu	delece 619 párů bází	β^0	Indové
Porucha syntézy mRNA			
Poruchy sestřihu RNA (viz obr. 11.14)	Abnormální akceptorové místo v intronu 1: AG \rightarrow GG	β^0	Afroameričané
Mutace promotoru	Mutace v ATA boxu -31 -30 -29 -28 -31 -30 -29 -28 A T A A \rightarrow G T A A	β^+	Japonci
Abnormalita v místě připojení čepičky	Transverze A \rightarrow C v místě připojení čepičky mRNA	β^+	Asiaté
Defekt polyadenylačního signálu	AATAAA \rightarrow AACAAA	β^+	Afroameričané
Nefunkční mRNA			
(Poznámka: předčasné stop kodóny, jako jsou dva níže uvedené, také snižují množství mRNA – viz text)			
Nesmyslné mutace	kodón 39 gln \rightarrow stop CAG \rightarrow UAG	β^0	Středozeří (obzvláště Sardinie)
Mutace s posunem čtecího rámce	kodón 16 (delece 1 páru bází) <i>normální</i> trp gly lys val asn 15 16 17 18 19 UGG GGC AAG GUG AAC UGG GCA AGG UGA <i>mutovaný</i> trp ala arg stop	β^0	Indové
Synonymní mutace	Mutace v kódující oblasti, které také narušují sestřih kodón 24 gly \rightarrow gly GGU \rightarrow GGA	β^+	Afroameričané

Mutace vedoucí k nesmyslnému kodónu

MUTATION						
Codon no.	36	37	38	39	40	41
β^A -Gene	CCT	TGG	ACC	<u>C</u> AG	AGG	TTC
RNA codons	CCU	UGG	ACC	CAG	AGG	UUC
β^A -Globin	pro	trp	thr	glu	arg	phe
β^{o39} -Gene	CCT	TGG	ACC	<u>I</u> AG	AGG	TTC
RNA Codons	CCU	UGG	ACC	UAG	AGG	UUC
β^{o39} -Globin	pro	trp	thr	STOP		

Fig. 4.12. A nonsense mutation in codon 39 of the β -globin gene. The C \rightarrow T transition (underlined) creates a new codon TAG, which signals (through the RNA codon UAG) termination of translation. The truncated β -globin is not recognizable in the cell and the consequence is a β^0 -thalassaemia phenotype.

Mutace narušující sestřih DNA

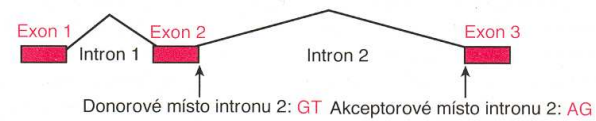
Vadná syntéza mRNA – příčina některých β -talasemií

a) Mutace v místě sestřihu (mutace v 5' donorovém nebo 3' akceptorovém místě intronů – jsou použita kryptická sestřihová místa, část intronu v mRNA) β^0

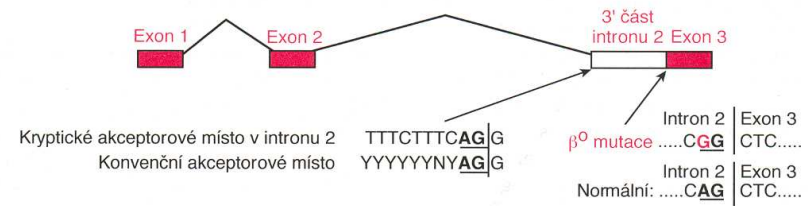
b) Mutace v intronech (mutace v kryptickém místě zvýší jeho využitelnost, pokles používání normálního místa – snížení množství normální mRNA) β^+

c) Mutace v exonech

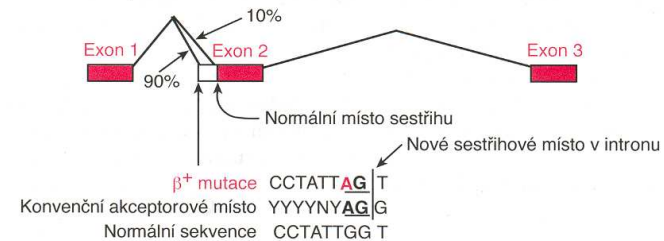
A Normální sestřih



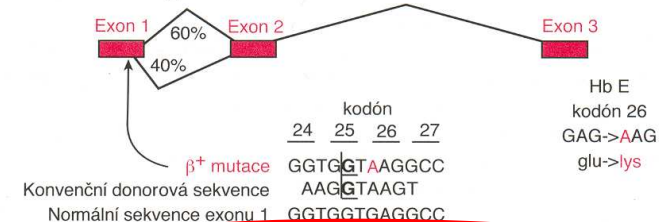
B β^0 mutace akceptorového intronu 2 → mutované místo není použito
→ je použito kryptické sestřihové místo v intronu 2



C β^+ mutace v intronu 1. 110 bp v kryptickém akceptorovém místě → pokles užívání normálního neporušeného místa
→ preferenční užívání mutovaného místa



D Hb E: exonová mutace v kryptickém donorovém místě → pokles užívání normálního místa
→ mimě používání kryptického místa



Obrázek 11.14 Příklady mutací narušujících normální sestřih A: β -globinového genu a způsobujících tak β -talasemii. B: mutace intronu 2 (A → G) v akceptorovém místě sestřihu toto místo zcela vyřadí. Důsledkem je používání kryptického akceptorového místa v intronu 2. Toto kryptické místo zcela přesně odpovídá konvenční sekvenci akceptorových sestřihových míst (kde Y = kterýkoliv pyrimidin, T nebo C). Podle tohoto mutantního genu tvořená mRNA nemůže být použita pro syntézu β -globinu, neboť exon 3 je na 5'-konci prodloužen zavětím sekvence intronu 2 do alternativně sestřihané mRNA. C: mutace v intronu 1 (G → A v 110 nukleotidu intronu 1) aktivuje kryptické akceptorové místo sestřihu tím, že vytváří dinukleotid AG a činí tak toto místo podobnější konvenční akceptorové sekvenci. Takto vzniklá globinová mRNA je na 5'-konci exonu 2 prodloužená o 19 nukleotidů, přičemž je do transkriptu vnesen stop kodón. Důsledkem je fenotyp β^+ -talasémie, protože je stále používáno i správné akceptorové sestřihové místo, ovšem jen asi z 10 % normální úrovně. D.: u Hb E mutace mění smysl kodónu (Glu26Lys) v kodónu 26 exonu 1 aktivuje kryptické donorové místo sestřihu, které úspěšně kompetuje s normálním donorovým místem. Důsledkem je částečné užívání této alternativní cesty, ale většina RNA je zpracována správnou cestou a výsledným fenotypem je jen mírná β -talasémie.

Otázky

- Proč jsou pacienti s β -talasemií většinou složení heterozygoti ? V jaké situaci byste očekávali, že pacient s β -talasemií má dvě identické alely genu pro β -globin ?
- Dítě zemřelo na fetální hydrops. Nakreslete rodokmen s genotypy, který rodičům, kteří jsou nosiči, ukáže dědičnou podstatu talasemie, jíž jejich dítě trpělo.
- Dítě má strýce z otcovy strany a tetu z matčiny strany se srpkovitou anémií. Oba jeho rodiče jsou zdraví. Jaká je pravděpodobnost, že jejich dítě bude mít abnormální hemoglobin ?

Tabulka 5. Klinicky významná autozomálně recesivní onemocnění v severní Evropě

Orgánová soustava	Onemocnění	Výskyt na 10 000 porodů	Hlavní klinické symptomy
metabolismus	cystická fibróza	5	pankreatická nedostatečnost; plicní infekce
	fenylketonurie	1,2	mentální retardace
	cystinurie	1	ledvinové kameny
	α_1 -antitrypsinová deficiencie	3	chronické onemocnění plic; rozedma
	mukopolysacharidóza (několik subtypů)	0,5	defektní tělesný a duševní vývoj
	galaktosémie	0,2	žloutenka; zákal; náchylnost k infekci
nervový systém krev ²	Tayova-Sachsova choroba	0,04 ¹	mentální retardace; slepota
	spinální muskulární atrofie	0,4	progressivní svalová slabost
	srpkovitá anémie	1	hemolytická anémie
	β -talasémie	0,5	těžká anémie; znetvoření kostí; splenomegalie
endokrinní systém	vrozená adrenální hyperplazie	0,6	novorozenecké zvracení, šok a smrt; virilismus
uši	vrozená hluchota	0,2	hluchota
oči	retinitis pigmentosa ³	1,8	ztráta nočního vidění a zrakové ostrosti

¹ Mnohem vyšší výskyt (3 na 10 000) u Ashkenazi-Židů.

² Přibližné odhady založené na genových frekvencích v populacích přistěhovalců.

³ Vyskytuje se rovněž v autozomálně dominantní a X-vázané recesivní formě.
Zdroj: [77, 95].

**Mutace způsobují enzymové defekty
– enzymopatie –**

Příklad: fenylketonurie

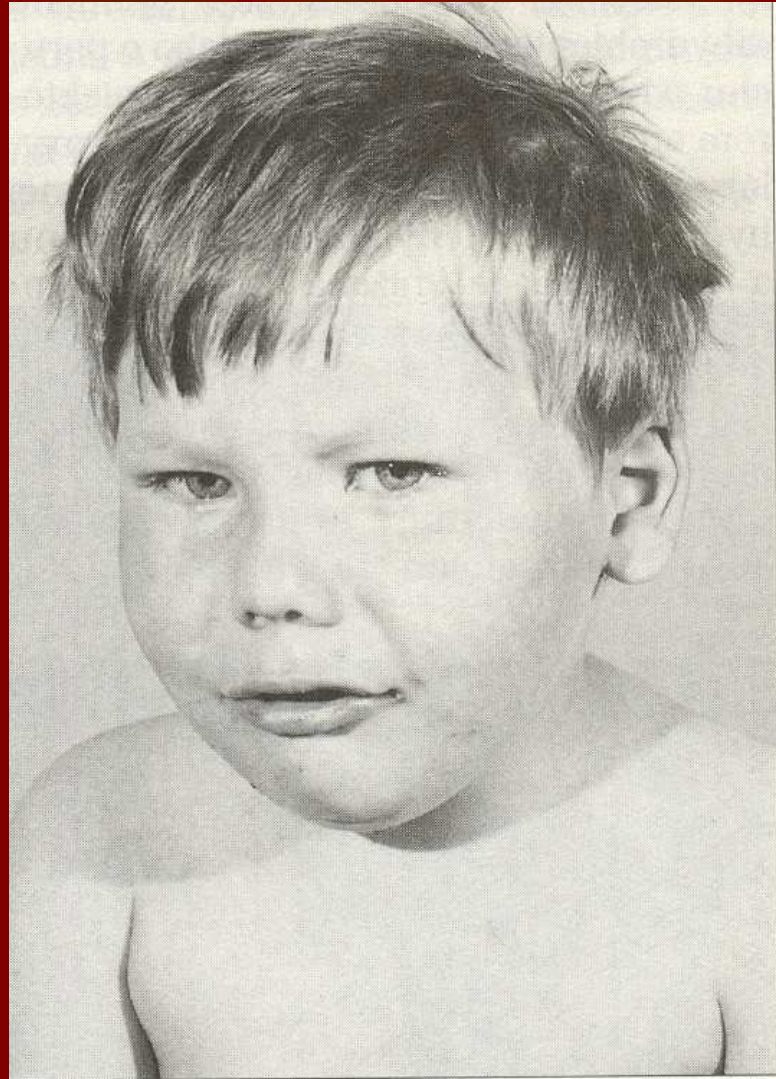
Metabolické poruchy

- **Enzymopatie:** téměř vždy AR, heterozygoti s 50 % reziduální aktivitou alely jsou klinicky normální
- Všechny patofyziologické důsledky enzymopatií mohou být připsány akumulaci substrátu či nedostatku produktu
- Poruchy metabolismu aminokyselin, cukrů, lipidů, purínů, pyrimidínů aj.)
- **(fenylketonurie, alkaptonurie, albinismus, galaktosemie)**

Fenylketonurie (PKU)

- **AR porucha katabolismu fenylalaninu způsobená mutacemi v genu kódujícího PAH – přeměna fenylalaninu na tyrozin**
- **první důkaz genetického defektu jako příčiny mentálních retardací (Fohling, 1934)**
- **ztrátové mutace !!!**
- **u pacientů s PKU dochází k hromadění fenylalaninu v tělních tekutinách – poškození vyvíjejícího se mozku**

- **novorozenecký screening – dieta !!!**
- **(1/2900 živě narozených dětí)**



Obr. 2.24. Pacient s fenylketonúriou (z materiálu Výskumného laboratória klinickej genetiky LF UK Martin)

Vztah mezi genotypem a fenotypem u genetických chorob

Tabulka 12.2 Různé typy heterogenity sdružené s genetickými chorobami

Typ heterogenity	Definice	Příklad
Genetická heterogenita Alelová heterogenita Lokusová heterogenita	Existence více než jedné alely v lokusu Asociace více než jednoho lokusu se specifickým klinickým fenotypem	<ul style="list-style-type: none">• alely β-talasémie• mutace fenylalaninhydroxylázy• defekty biopterinu způsobující hyperfenylalaninémii• Sanfilippův syndrom
Klinická nebo fenotypová heterogenita	Asociace více než jednoho fenotypu s mutacemi jednoho lokusu	<ul style="list-style-type: none">• mutace fenylalaninhydroxylázy způsobující PKU, variantní PKU, nebo non-PKU hyperfenylalaninémii• mutace α-iduronidázy způsobující Hurlerové nebo Scheieho syndrom

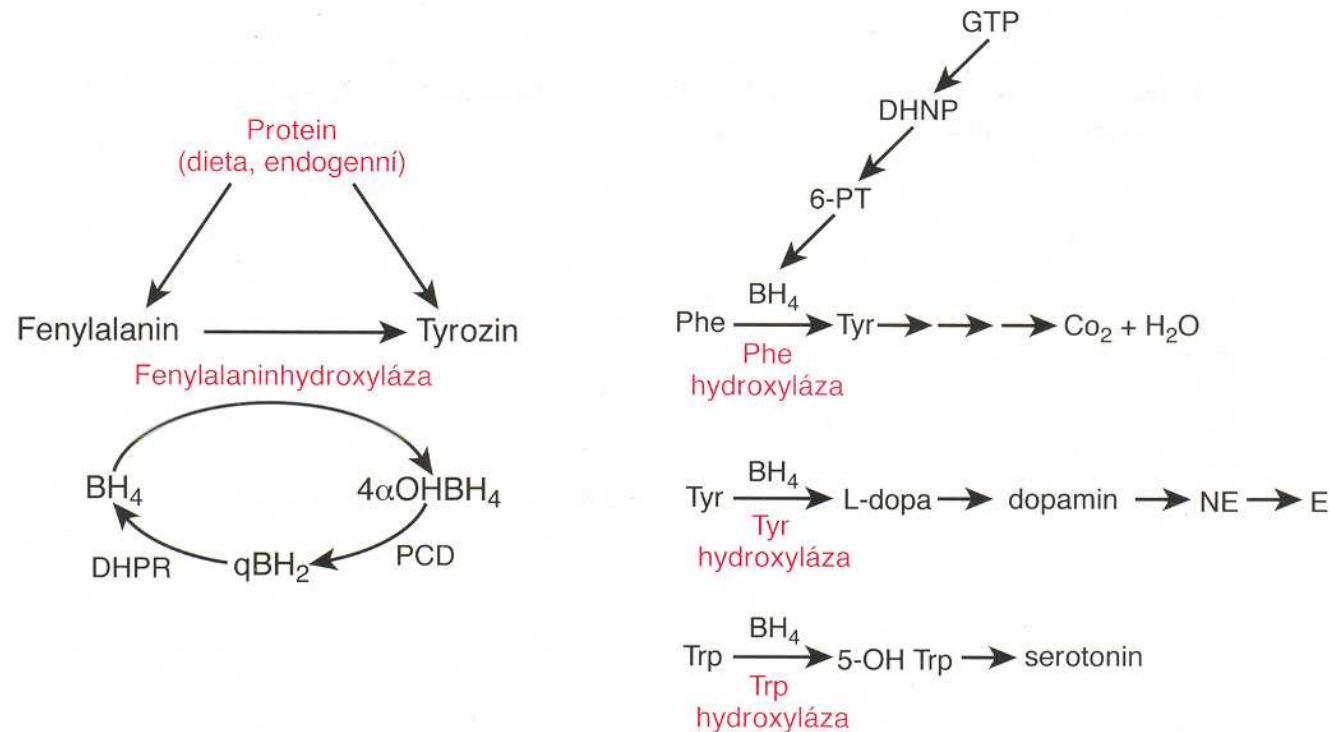
PKU = fenylketonurie

Alelová a lokusová heterogenita u hyperfenylalaninemií (mutace 5 genů)

Biochemický defekt	Incidence/ 10 ⁶ narozených	Postižený enzym	Lokalizace genu	Dědičnost	Léčba
Mutace v apoenzymu fenylalaninhydroxylázy					
Klasická PKU	5–350	PAH	12q24.1	AR	Dieta s nízkým obsahem fenylalaninu
Variantní PKU	méně než klasická PKU	PAH	12q24.1	AR	Dieta s nízkým obsahem fenylalaninu (méně restriktivní než u klasické PKU)
Non-PKU hyperfenylalaninémie	15–75	PAH	12q24.1	AR	Žádná, nebo méně restriktivní dieta s nízkým obsahem fenylalaninu
Mutace v genech kódujících enzymy metabolismu tetrahydrobiopterinu					
Porucha recyklace BH ₄	1–2	PCD	10q22	AR	Dieta s nízkým obsahem fenylalaninu + L-dopa, 5-HT, carbidopa
		DHPR	4p15.31	AR	Dieta s nízkým obsahem fenylalaninu + L-dopa, 5-HT, carbidopa + kyselina listová
Porucha syntézy BH ₄	vzácná	GTP-CH	14q22	AR	Dieta s nízkým obsahem fenylalaninu + L-dopa, 5-HT, carbidopa + kyselina listová + farmakologické dávky BH ₄
		6-PTS	11q22.3–23.3	AR	jako výše

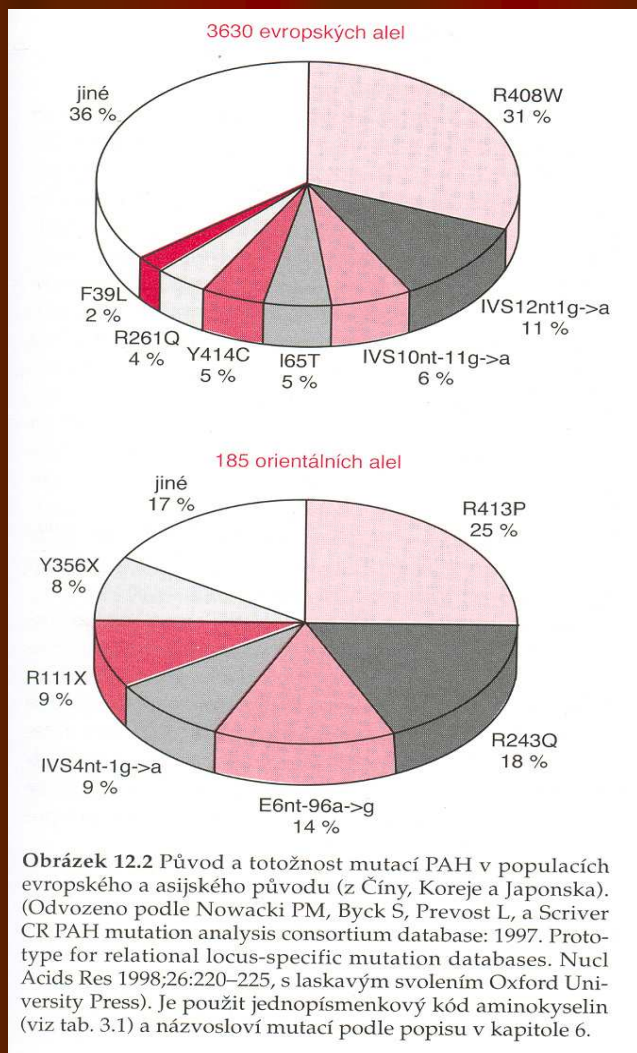
5-HT = 5-hydroxytryptofan; 6-PTS = 6-pyruvoyltetrahydropterinsyntáza; BH₄ = tetrahydrobiopterin; DHPR = dihydropteridinreduktáza; GTP-CH = guanosintrifosfátcyklohydroláza; PAH = fenylalaninhydroxyláza; PCD = pterin-4- α -karbinolamindehydratáza; PKU = fenylketonurie.

Biochemické dráhy postižené u PKU



Obrázek 12.1 Biochemické dráhy postižené u hyperfenylalaninemií. BH₄ = tetrahydrobiopterin; qBH₂ = quinoiddihydrobiopterin, oxidovaný produkt hydroxylační reakce, který je redukován na BH₄ dihydropteridinreduktázou (DHPR); Phe = fenylalanin, Tyr = tyrozin, Trp = tryptofan, L-dopa = L-dihydroxyfenylalanin, NE = norepinefrin, E = epinefrin, 5-OH Trp = 5-hydroxytryptofan, GTP = guanosin trifosfát, DHNP = dihydroneopterin trifosfát, 6-PT = 6-pyruvoyltetrahydropterin, PCD = pterin 4- α -karbinolamindehydratáza.

Typy a distribuce mutací PAH v populacích evropského a asijského původu (je známo asi 400 alel PAH)



Díky vysokému stupni alelové heterogenity v lokusu je většina pacientů s PKU složenými heterozygoty (dvě různé kauzální mutace) !!!

mutace	% aktivity	zastoupení mezi mutacemi*	asociovaný haplotyp**	sdužený fenotyp u homozygotů***
Arg408Trp	< 1 %	31 %	1, 2, 5, 44	klasická PKU
IVS12+1g->a****	< 1 %	11 %	3	klasická PKU
IVS10-11g->a	není známo	6 %	6, 10, 34, 36	klasická PKU
Ile65Thr	asi 25 %	5 %	9	klasická PKU, variantní PKU, non-PKU HPA
Tyr414Cys	30-50 %*****	5 %	4	variantní PKU, non-PKU HPA
Arg261Gln	30 %*****	4 %	1, 2, 4, jiné	PKU nebo variantní PKU

* Podle Nowacki P. a kol. PAH mutation analysis consortium database: 1997. Prototype for relational locus-specific mutation databases. Nucl Acids Res 1998;26:220-225.
 ** Podle databáze PAH (www.mcgill.ca/pahdb).
 *** Podle Kayalp E. a kol. Human phenylalanine hydroxylase mutations and hyperphenylalaninemia phenotypes: A metanalysis of genotype-phenotype correlations. Am J Hum Genet 1977;61:1309-1317.
 **** IVS12+1g->a znamená, že první nukleotid 12. intronu je „a“, kterým bylo nahrazeno „g“
 ***** Není jasné, zda tyto aktivity, získané stanovením *in vitro*, odpovídají funkci *in vivo*.

6 nejčastějších mutací evropského původu

Mutace vedoucí k poruchám transportu

Příklad: cystická fibróza

Cystická fibrosa /mukoviscidosa/

- autosomálně recesivní onemocnění
- frekvence 1 : 3000 živě narozených dětí
- výskyt nositelů mutace v genu CF je 1 : 25
- gen objeven v roce 1989 (7q31)
- rozsah asi 250 kb, koduje oblast s 27 exony

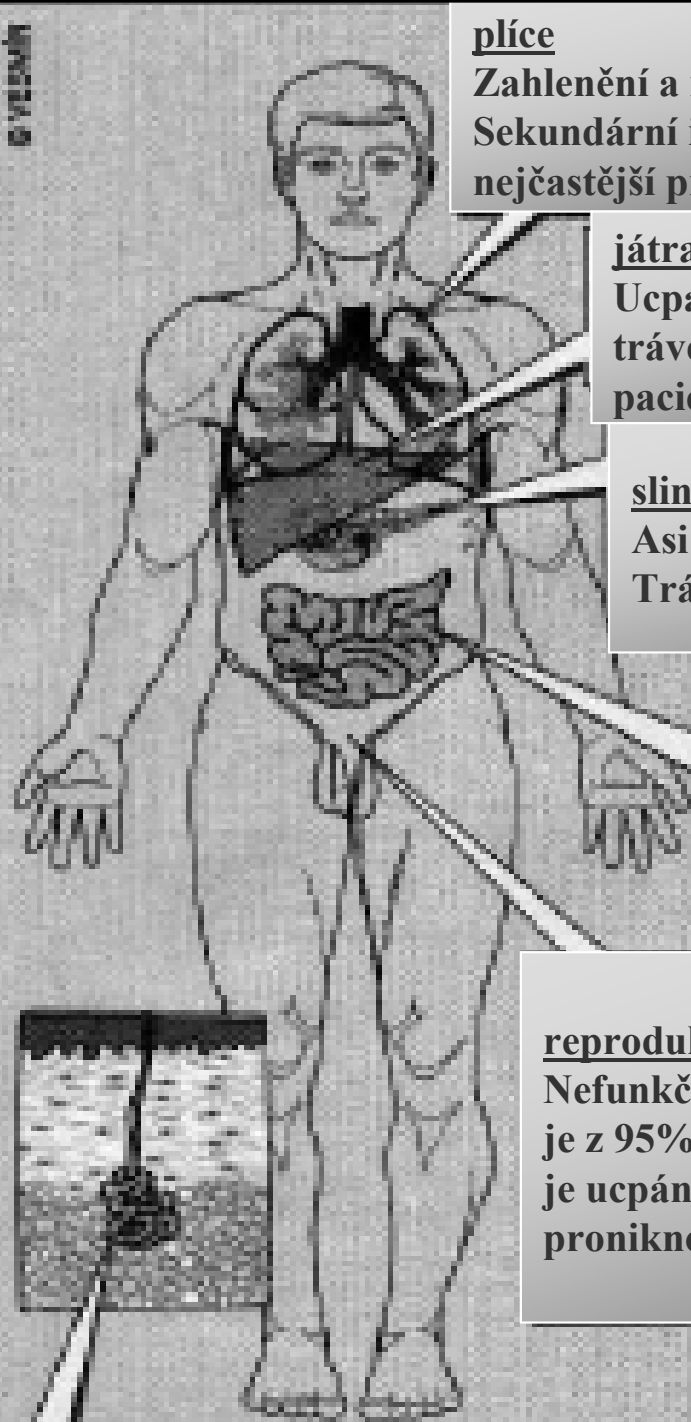
Základní fyziologický defekt

při onemocnění CF

- Porucha absorpce iontů chloru, sodíku a vody buněčnou membránou
- /zvýšená koncentrace Na^+ a Cl^- v potu/

Zasahuje různé orgány:

- plíce
- pankreas
- trávicí trakt - reprodukční orgány



plíce

Zahlenění a infekce průdušek znesnadňuje dýchání. Sekundární infekce narušující plíce jsou u lidí s CF nejčastější příčinou smrti

játra

Ucpávání drobných žlučvodů znesnadňuje trávení a narušuje funkci jater asi u 5% pacientů.

slinivka břišní

Asi u 85% pacientů dochází k uzavření jejích kanálků. Trávicí enzymy nemohou být dopraveny do střev.

tenké střevo

Ucpávání střeva hustou stolicí si vynucuje chirurgický zákrok asi u 10% novorozenců.

reprodukční orgány

Nefunkčnost kanálků v pohlavním ústrojí (např. vas deferenc) je z 95% příčinou mužské sterility. Příčinou neplodnosti u žen je ucpání děložního hrdla hleny, které znemožní spermiím proniknout dále do dělohy.

potní žlázy

Porušená funkce se projevuje nadměrným vylučováním solí (NaCl).

ZDÁ SE VÁM VAŠE DÍTĚ SLANÉ ?

*cítíte při políbení svého dítěte
slanou chuť nebo dokonce
vidáte krystalky soli na obličejí ?*

*trpí opakovanými a chronickými
infekcemi dýchacích cest
a trvalým kašlem ?*

*má objemné a mastné stolice
nebo výhřezy konečníku?*

*neprospívá,
přestože má větší chuť k jídlu ?*

**MÁ VAŠE DÍTĚ NĚKTERÉ
Z TĚCHTO PŘÍZNAKŮ ?
MŮŽE MÍT CYSTICKOU FIBRÓZU**



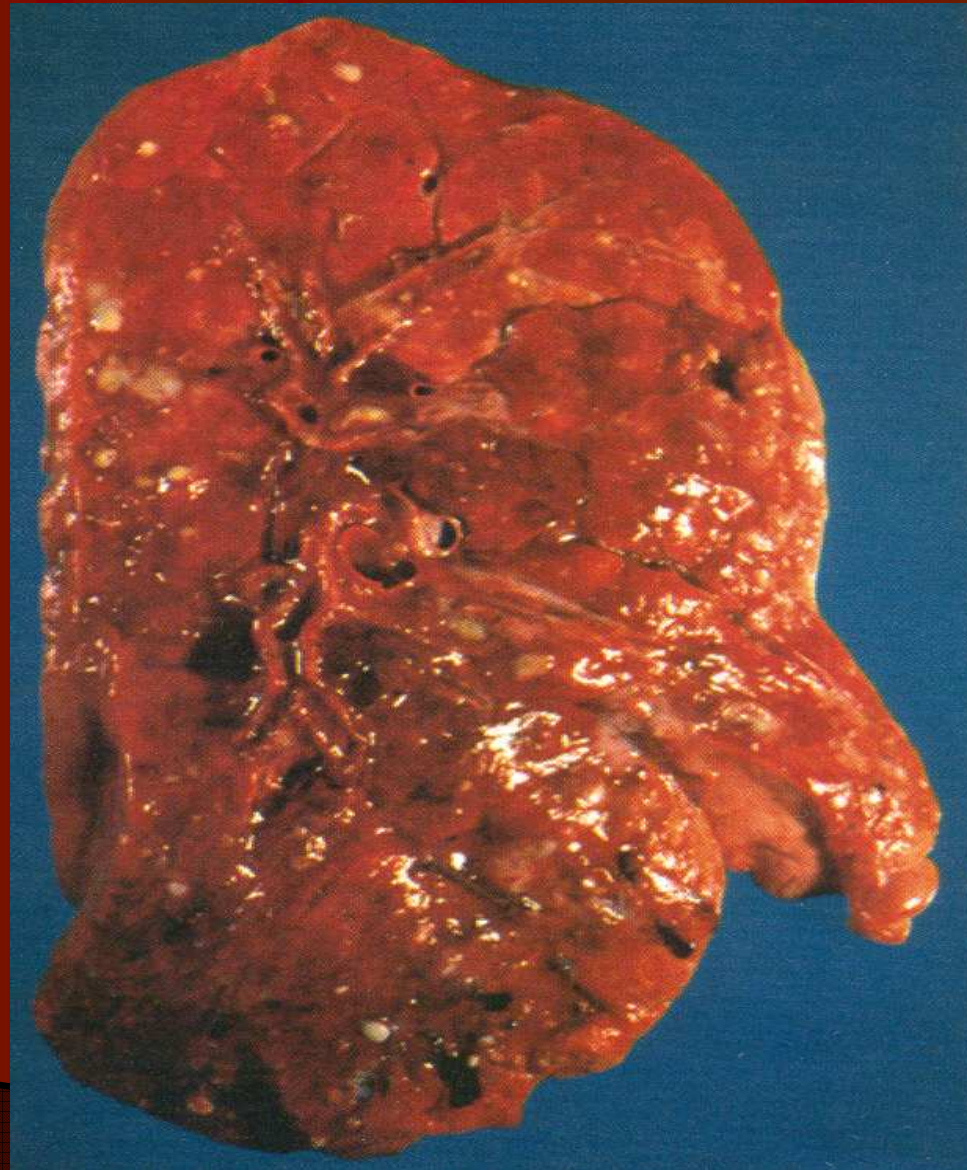
CYSTICKÁ FIBRÓZA

- je jedno z nejčastějších dědičných onemocnění, každý 25. člověk je nepostiženým nosičem genu CF, rodičovství dvou nosičů tohoto genu přináší 25% riziko narození dítěte s CF
- postihuje jedno z 2500 - 3000 narozených dětí, každý rok se u nás narodí asi 30 dětí s CF
- diagnóza není mnohdy včas a správně rozpoznána, některé příznaky se nemusí vůbec vyskytnout, ale většina rodičů dětí s CF si zpětně uvědomí, že se jim jejich dítě zdálo slanější
- včasná diagnóza umožní dříve zahájit léčbu a tím výrazně zlepšit prognózu pacienta

KONTAKT

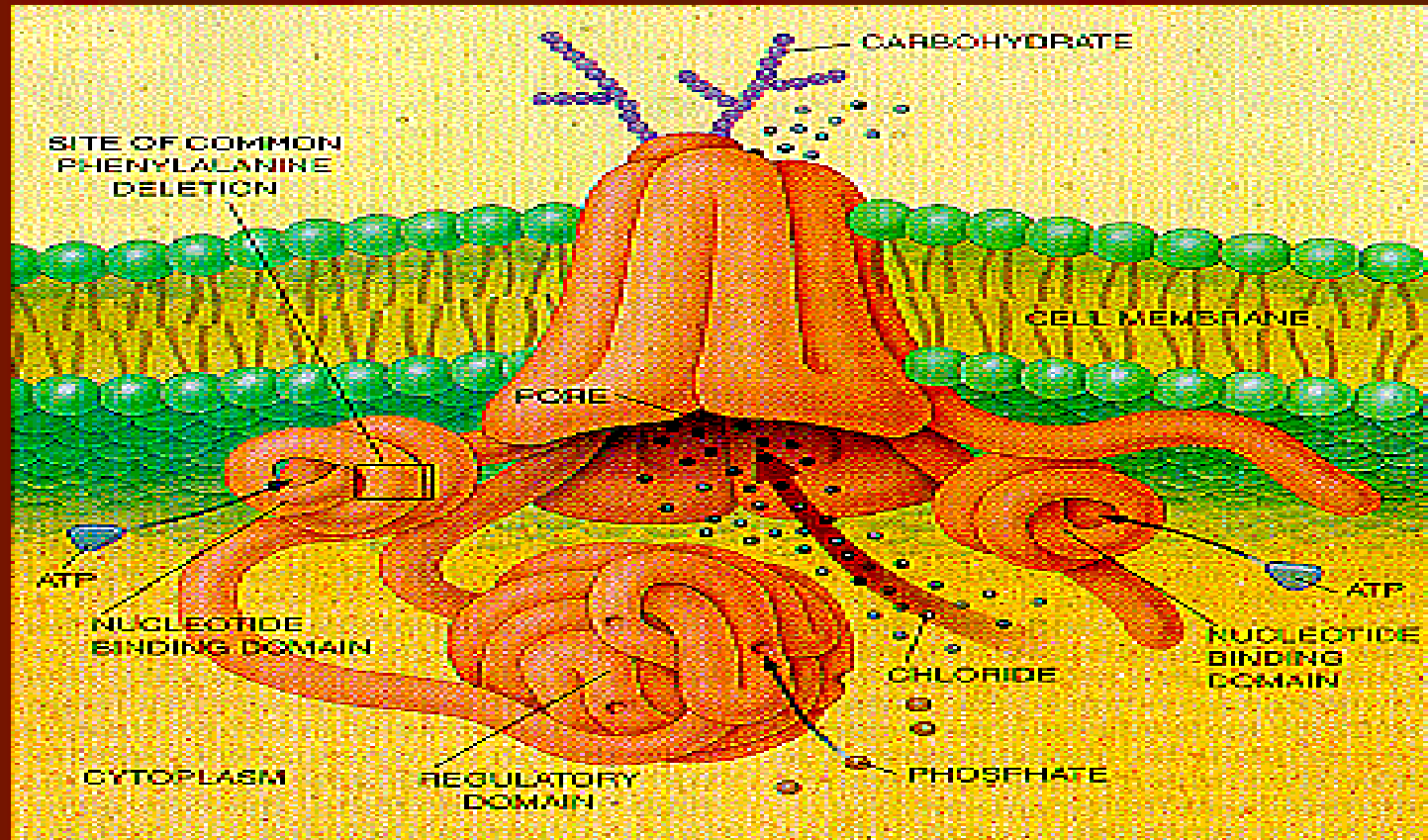
Při jakémkoliv podezření upozorněte svého dětského lékaře. Více informací je možné získat v Klubu nemocných cystickou fibrózou:
Kudrnova 22, 150 18 Praha 5, tel.: 257 211 929, fax: 257 221 515
e-mail: cfklub@volny.cz, www.cfklub.cz

Fotografie středního příčného řezu plíce u pacienta s CF (hlenové zátky v plicích)

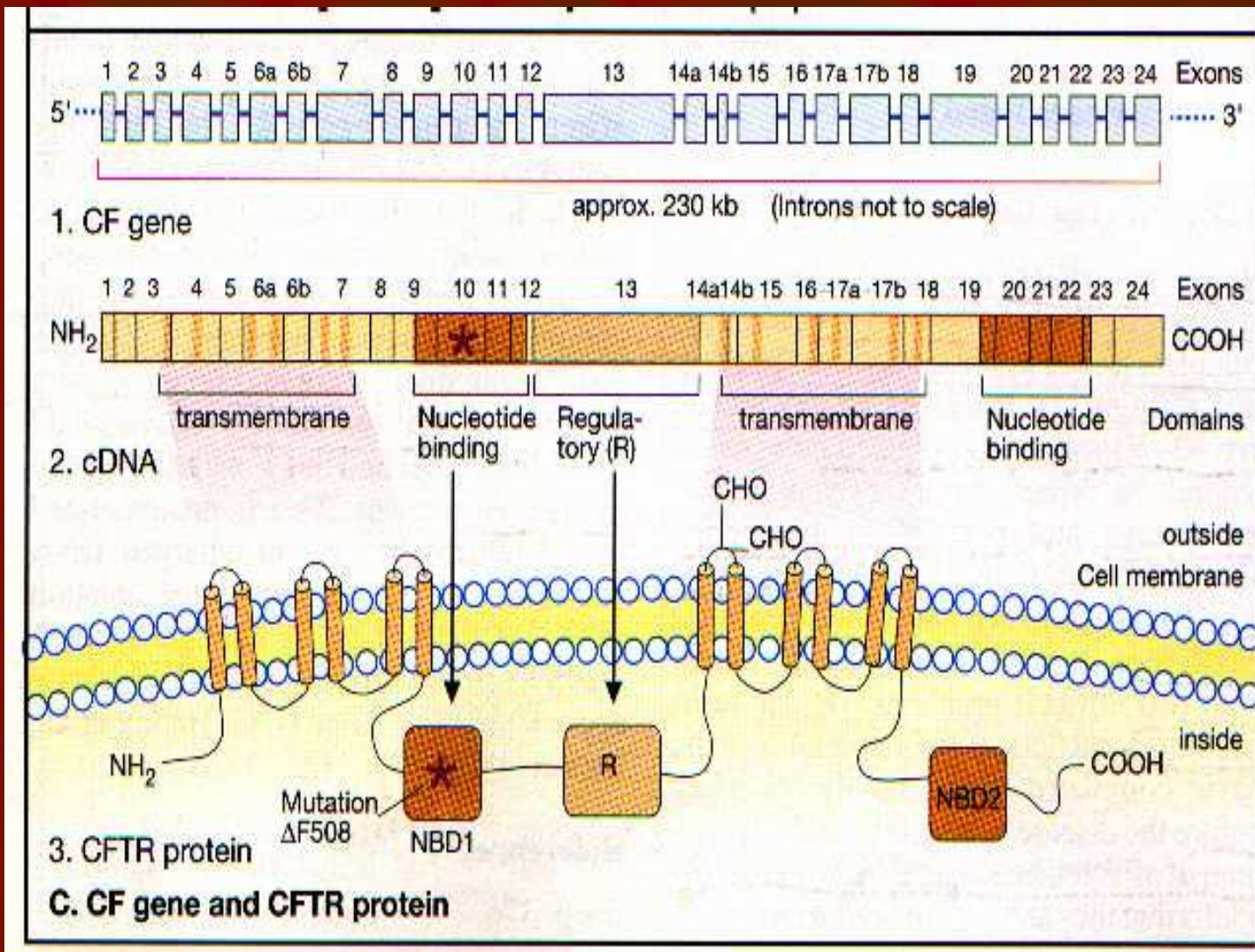


CFTR protein

(Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator)



CFTR protein – regulovaný chloridový kanál umístěný na apikální membráně epitelálních buněk



Nejčastější mutace - dF508 – delece v 10 exonu

Genotypy pacientů s CF a klinické projevy

	$\Delta F508/\Delta F508$	$\Delta F508/\text{jiná alela}$	jiná alela/jiná alela
Počet pacientů	151	117	25
% všech pacientů	52 %	40 %	8 %
% s PI	99 %	72 %	36 %
% s PS	1 %	28 %	64 %
Věk v době diagnózy (\pm SD)	1,8 \pm 3,3 roku	4,4 \pm 5,9 roku	8,4 \pm 8,3 roku

PI = pankreatická insuficience; PS = pankreatická suficience.

Upraveno podle Kerem E, Corey M, Kerem B-S, a kol. The relationship between genotype and phenotype in cystic fibrosis: Analysis of the most common mutation ($\Delta F508$). N Engl J Med 1990;323:1517-1522.

Gen pro cystickou fibrózu v populacích

alela/choroba	populační variabilita
alela β^S - β -globinového genu (srpkovitá anémie)	Vyšší v Africe, méně obvyklá v ostatních oblastech. Frekvence alely 1/20 mezi Afroameričany, < 1/200 mezi Američany hispánského původu.
alela β^C - β -globinového genu	Vysoká v západní Africe (speciálně v Ghaně a Burkina Faso), kde alelová frekvence je 1/6. Alelová frekvence mezi Afroameričany je 1/100.
Cystická fibróza (všechny typy alel)	Vysoká v Evropě a USA. Kavkazská populace (frekvence alel 1/40–1/50); nízká ve Finsku, Asii a v africké populaci.
Fenylketonurie (PKU)	Vyšší mezi Evropany a populacemi keltského a severoevropského původu (alelová frekvence 1/67–1/90). Alelová frekvence ve Švýcarsku a Itálii 1/125, mezi Afroameričany 1/225, 1/330 v Japonsku, 1/500 ve Finsku.
Tay-Sachsova choroba	Vysoká frekvence u Aškenazi Židů (alelová frekvence 1/60), 100x menší v ostatních populacích.
Familiární hypercholesterolémie	Vysoká v určitých oblastech Quebecu (alelová frekvence 1/244) a Afrikánců v jižní Africe (alelová frekvence 1/140). Alelová frekvence 1/1000 v Evropě a USA.
Myotonická dystrofie	Alelová frekvence 1/50 000 v Evropě a není přítomna v subsaharské Africe, alelová frekvence 1/950 v určitých oblastech Quebecu.

Mutace v genu CFTR u českých CF pacientů

- dF508 71,57%
- dele2,3(21kb) 4,64%
- G551D 4,03%
- N1303K 3,02 %
- G542X 2,22%
- 1898+1GtoA 2,02%
- 2143delT 1,21%
- R347P 0,81%
- W1282X 0,60%

- 4374+1GtoA, 1717-1GtoA, R1162X, E92X, 2184insA, 3849+10kb
každá 0,4%
- R334W, R553X, 621+1GtoT, každá 0,2%

Cílená mutační analýza CF genu je prováděna:

- **A: pro potvrzení diagnózy**

1. u pacientů s dg. CF
2. u členů rodin s výskytem CF
3. prenatálně u plodů v riziku s pozitivní CF rodinnou anamnézou
4. prenatálně u plodů s patologickým ultrazvukovým nálezem (abnormalita střevních kliček)
5. u novorozenců s mekoniovým ileem
6. u mužů s poruchami reprodukce

- **B: prevence**

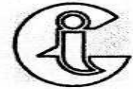
1. u příbuzenských párů
2. u manželských párů zařazených do IVF programu
3. u dárců gamet a embryí
4. u partnerů (partnerek) heterozygotů

Přehled mutací CFTR genu vyšetřovaných na OLG, FN Brno

- **Základní vyšetření:**
- dF508, dele 2,3(21kb), G542X, G551D, R553X
- **Rozšířené vyšetření:**
- N1303K, 1717-GtoA, W1282X, S1251N, R560T, 3905insT, Q552X, dI507, 394delTT, G85E, 621+1GtoT, R117H, 1078delT,R347P, R334W, E60X,711+5GtoA, 2789+5GtoA, R1162X, 3659delC, 3849+10kbCtoT, 2143delT,A455E, 2183AtoG, 2184delA
- Celkově vyšetřováno 30 mutací v genu CFTR
- 95% všech mutací detekovaných u CF pacientů v ČR

Etnická variabilita ve frekvenci mutací !!!

Mutační analýza pacientů s CF



INNOGENETICS
BIOTECHNOLOGY FOR HEALTHCARE

INNO-LiPA CFTR

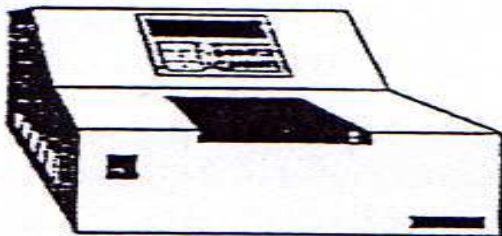
Mutace	CG LiPA CFRT12	CF LiPA CFTR17+Tn
Delta F508	X	
G542X	X	
N1303K	X	
I717-1G>A	X	
W 1282X	X	
G551D	X	
R553X	X	
Delta 1507	X	
R560T	X	
390 insT	X	
Q552X	X	
S1251N	X	
394delTT		X
G85E		X
621+1G>T		X
R117H		X
I078delT		X
R347P		X
R334W		X
E60X		X
711+5G>A		X
2789+5G>A		X
R1162X		X
3659delC		X
3849+10kbC>T		X
2143delT		X
A455E		X
2183AA>G		X
2184delA		X

dTTP, dATP, dGTP, dCTP
Biotinylated primers

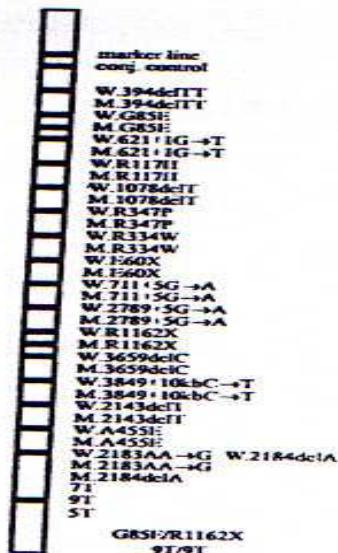
DNA Target

Taq-polymerase

Thermal cycler



PCR amplification



INNO - LiPA strip

troughholder

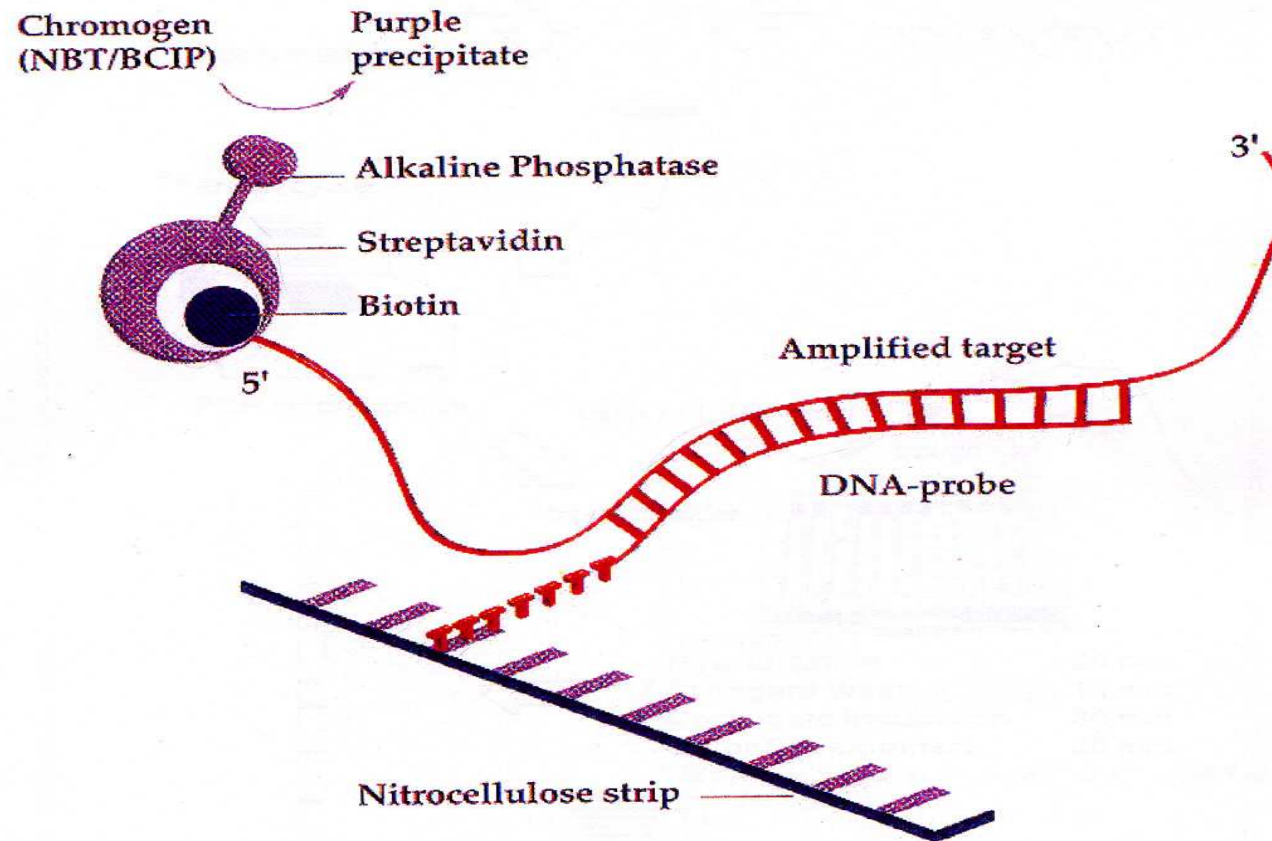
trough

Hybridization	30 min
Stringent Wash	10 min
Conjugate Incubation	30 min
Color Development	30 min

Interpretation

INNO-LiPA

Reverse hybridization principle



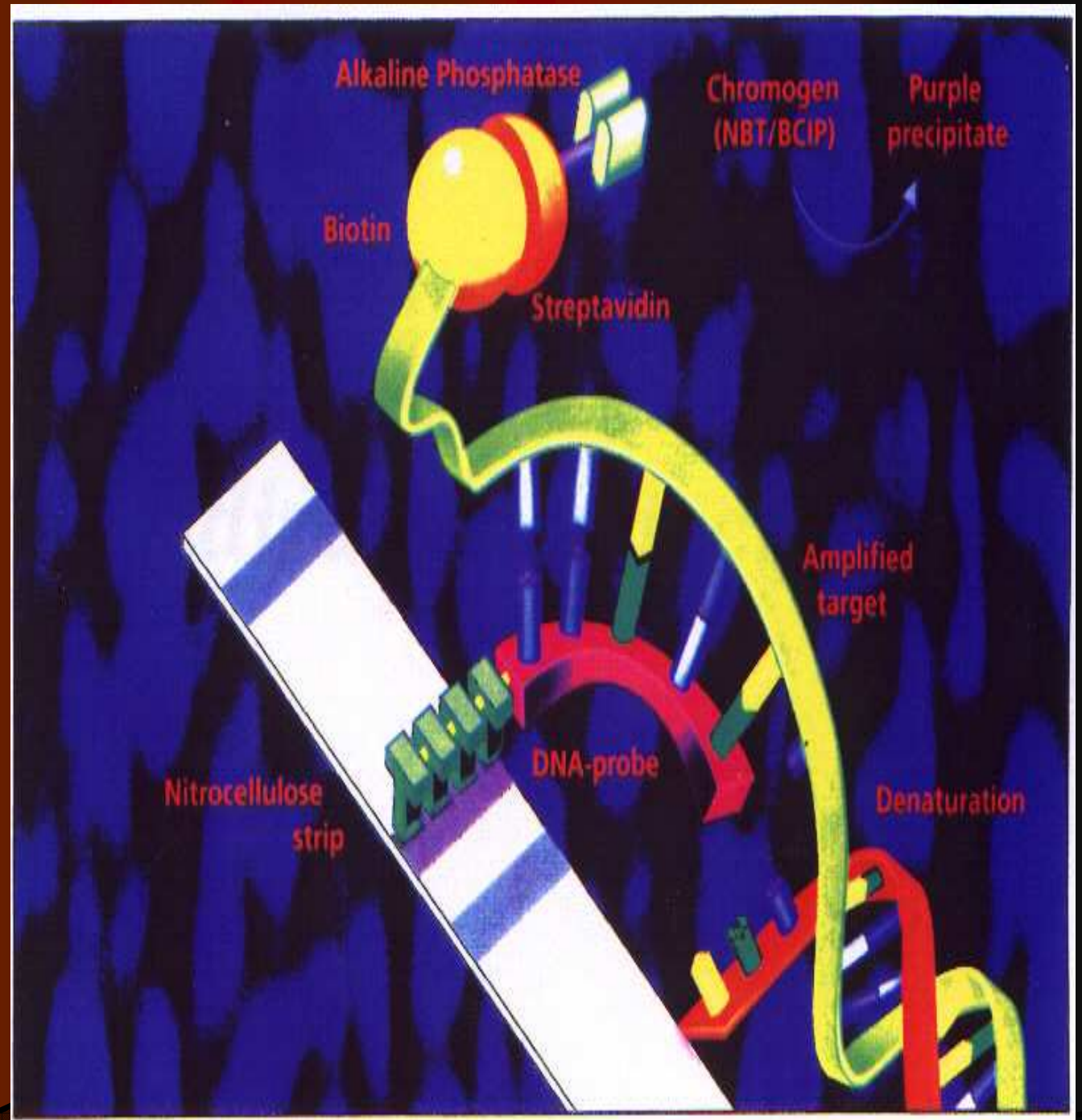
Princip

Jeden vzorek

Jedna amplifikace

Jeden strip

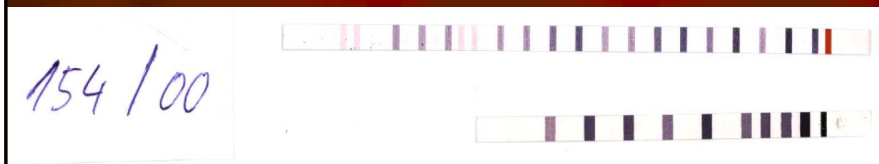
Výsledek
multihybridizace do
3 hodin po amplifikaci



Pacientka Z.V., 15 let

důvod vyšetření: rok trvající kašel

- CT prokázalo četné bronchiectasie v obou horních plicních lalocích
- hyperplazie maxilárních, nosních a sphenoideálních dutin
- pankreas, játra bez odchylek
- vyšetření chloridů v potu opakovaně se zvýšenými hodnotami (82 - 88 mmol/ml)
- zvažována dg.CF



Výsledek mutační analýzy CFTR genu

genotyp : dF508 / 3849+10kb

Dg.CF potvrzena

Cystická fibrosa – genotyp nemocných

Genotyp	Počet	Genotyp	Počet
dF508/dF508	8	CFTRdele2,3/1717-1	1
dF508/CFTRdele2,3	2	G542X/G542X	1
dF508/G542X	1	W1282X/N1303k	2
dF508/R553X	1	R347P/711+5	1
dF508/R347P	1	dF508/5T	1
dF408/3849+10	1		

Cystická fibrosa - heterozygoti

Genotyp	Počet
dF508 / non	87
G542X / non	8
CFRTdele 2,3(21kb)	7
R553X / non	2
3849+10kb CtoT / non	5
R947P / non	4
711+5 GtoA / non	2

Cystická fibróza

Frekvence onemocnění cystickou fibrózou činí
1 : 2000 živě narozených dětí.

Jaká je frekvence heterozygotů ?

Jaká je pravděpodobnost, že dva zdraví jedinci budou
mít dítě postižené CF ?

Jaké je celkové riziko postižení dítěte CF v případě, že
jeden rodič je přenašeč $\Delta F508$?

Cystická fibróza (CF)

Výskyt	postižení	1 : 2 000
	heterozygoti	1 : 22

gen CFTR: lokalizace 7q31

250 000 nukleotidů

26 exonů

protein 1 480 aminokyselin

70% případů: delece 3 nukleotidů v 10. exonu

pro aminokyselinu fenylalanin

na 508. místě proteinu = F508

$P \text{ heter.} \times \text{heter.} = 1/22 \times 1/22 = 1/484$, riziko výskytu postižení: $1/484 \times 1/4 = 1/1936$

Po testování na $\Delta F508$. Jeden z páru je přenašeč $\Delta F508$, $P=1$.

P , že druhý bude přenašeč: $P=0,3 \times 1/22 = 1/73,3$

Celkové riziko pro pár: $1/73,3 \times 1 \times 1/4 = 1/293,2$

Nositelé vadného genu CF – odolnost vůči onemocnění tyfem !!