

Mutace vedoucí k poruchám strukturních proteinů

**Příklad: Duchennova a
Beckerelova muskulární dystrofie**

Duchennova muskulární dystrofie

- těžká X-recesivní monogenně dědičná choroba
- primární příčina: mutace v dystrofinovém genu (Xp21)
- incidence choroby 1:3500
- destrukce svalových vláken (dystrofin intracelulární protein exprimovaný v hladkých, kosterních a srdečních svalech)
- **Fenotyp:**
 - 1) špatné držení těla, potíže při zvedání se ze země
 - 2) narůstající svalová slabost (3 – 5 let)
 - 3) pseudohypertrofie lýtek
 - 4) lordóza
- většina pacientů má abnormální EKG
- zvýšenou hladinu kreatinkinázy
- někteří trpí gastroporézou
- 1/3 vykazuje mírnou mentální retardaci
- pacienti nepřezívají 20. rok života

Duchennova muskulární dystrofie

The Symptoms

DMD

- Signs of muscle weakness as early as 3 years old.
- Gradual weakening of skeletal or voluntary muscles in arms, legs or trunk.
- By early teens may be confined to wheelchair. Heart and respiratory muscles may be affected.
- Death in early 20s usually from Cardiomyopathy.

BMD

- Milder version – onset in late teens or early adulthood.
- Slower course and less predictable than DMD.

Innovative screening solutions for human genetic analysis



- Incidence of DMD = 1/3500 males
BMD = 1/30,000 males
- Dystrophin gene has 79 exons and spans 2.4Mb
- Maps to chromosome Xp21
- 427kDa Protein that localises to muscle cell membranes



Innovative screening solutions for human genetic



Duchennova muskulární dystrofie

DMD Mutations

- Mutations of the gene fall in to three categories:

- Deletions of one or more exons

65%

- Small mutations *within* exons

30%

- Intragenic duplications

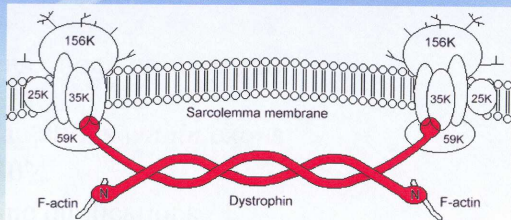
5%

- So, exon screening will pick up 65% of DMD Mutations

Innovative screening solutions for human genetic analysis



- Dystrophin protein forms part of muscle structure (molecular glue)



- Helps stabilize membrane during muscle contraction and relaxation

Innovative screening solutions for human genetic analysis



Mutace v dystrofinovém genu - delece

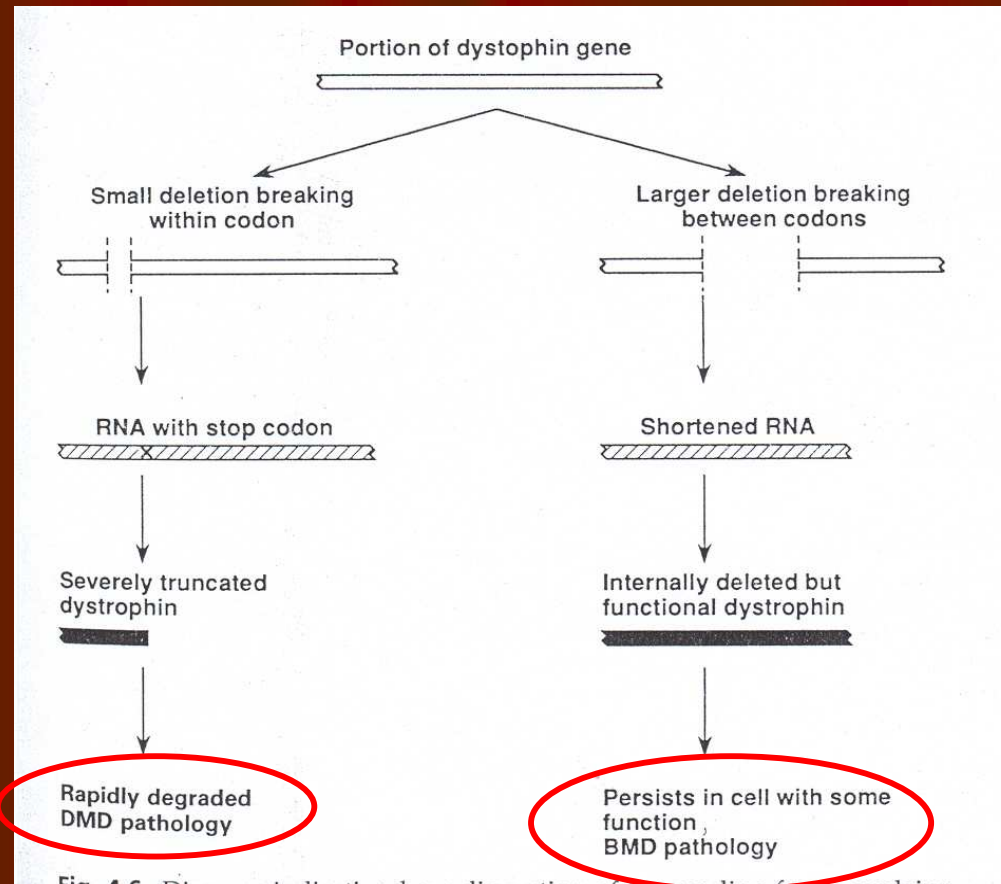
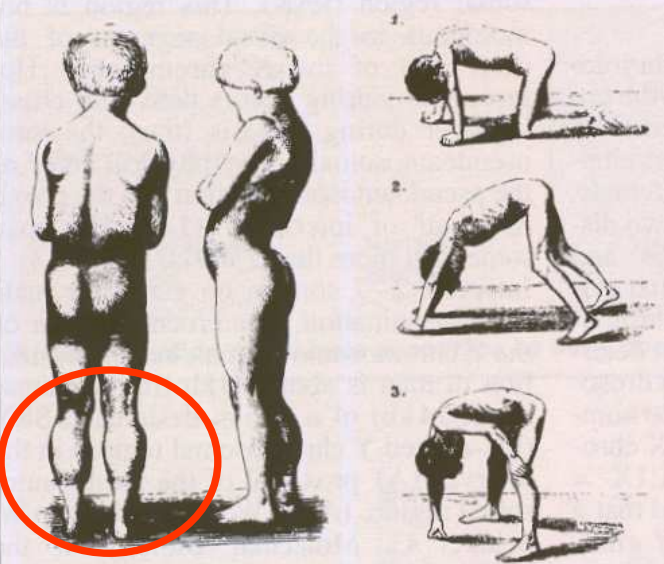


Fig. 4.6. Diagram indicating how disruption of the reading frame explains differences in the pathology of DMD and BMD. Deletions breaking within codons, even when comparatively small, may generate a stop codon (X) in the transcribed RNA and encode a severely truncated dystrophin protein that is rapidly degraded by the cell. Deletions that do not interrupt the reading frame may lead to internally deleted, but still functional, dystrophin protein with consequent milder pathology.

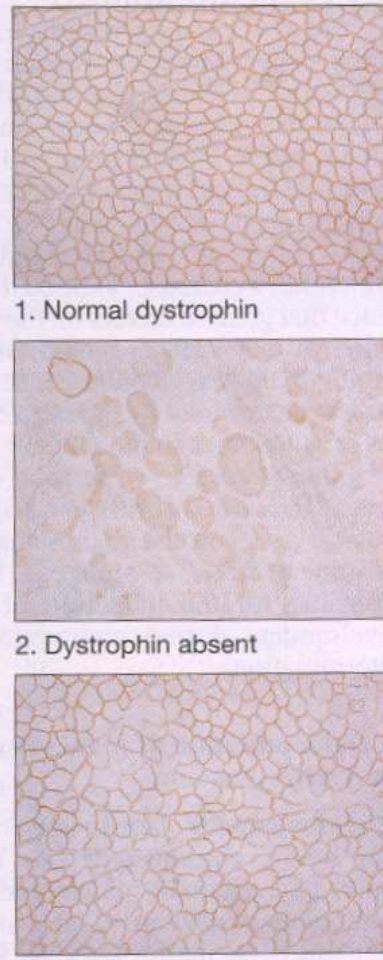
Klinické projevy DMD



1. Calf hypertrophy and lordosis

2. Difficulty in rising (Gower's sign)

A. Clinical signs of Duchenne muscular dystrophy

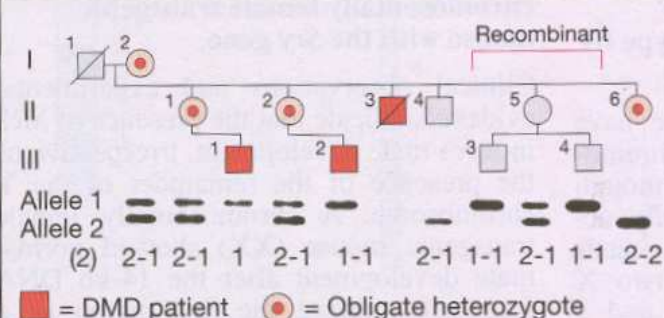


1. Normal dystrophin

2. Dystrophin absent

3. Areas lacking dystrophin in heterozygotes

B. Dystrophin analysis in muscle cells



C. Investigation of a family with DMD by DNA marker

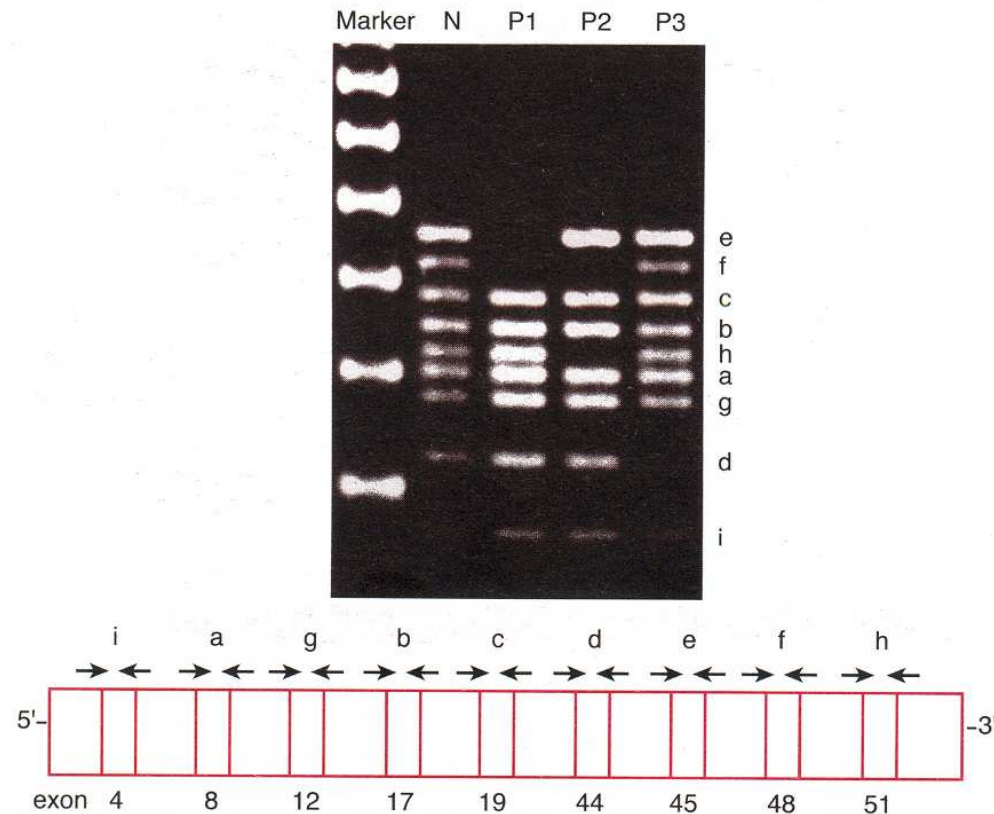
■ = DMD patient ● = Obligate heterozygote

Mechanismy mutace u Duchennovy a Beckerovy muskulární dystrofie (muži i ženy)

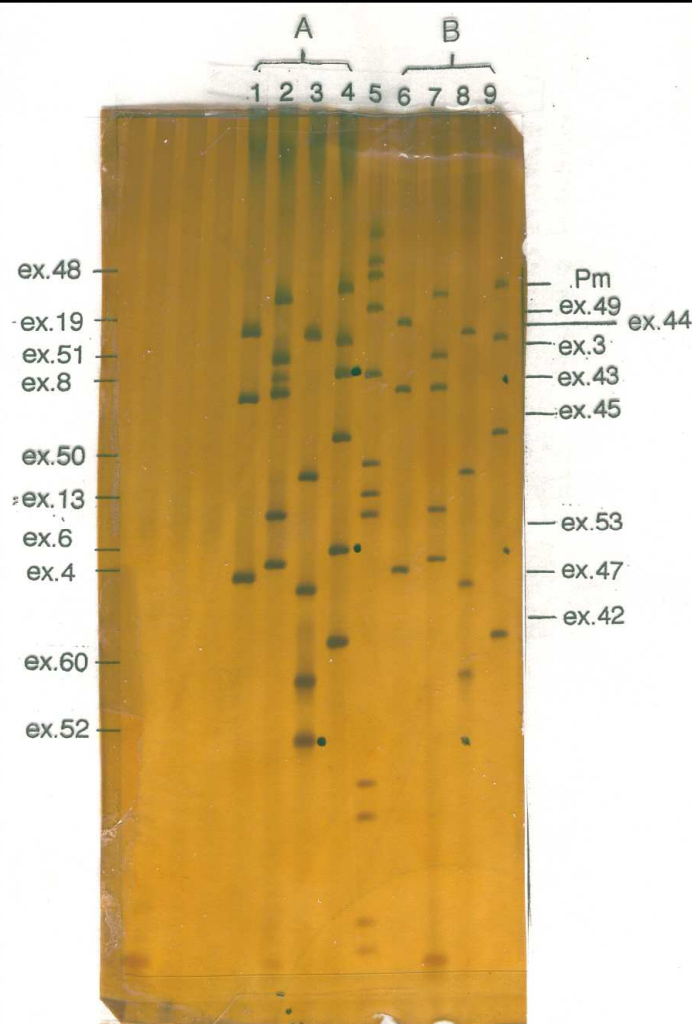
Molekulární nebo genetický defekt	Frekvence	Fenotyp
<i>U postižených mužů:</i> Genová delece (1 exon až celý gen) Bodové mutace Parciální duplikace genu Delece přilehlých genů	asi 60 % asi 34 % asi 6 % vzácné	DMD nebo BMD DMD nebo BMD DMD nebo BMD DMD plus jiné fenotypy, podle dalších deletovaných genů
<i>U postižených žen:</i> Nenáhodná X-inaktivace Turnerův syndrom (45,X) Translokace X;autozom	vzácně vzácně vzácně	DMD DMD DMD

Gen DMD má mutační frekvenci 10^{-4} , tj. asi o jeden řád vyšší než u ostatních genů !!!

Analýza mutací u DMD – molekulární metody



Obrázek 12.18 Diagnóza Duchenneovy muskulární dystrofie zahrnuje screening delecí a duplikací pomocí metody zvané multiplexová polymerázová řetězová reakce (PCR). Chybění nebo přítomnost abnormálních pruhů v DNA pacienta je analyzována s použitím sad primerů (páry šipek), které amplifikují různé oblasti genu (*a-i*) v jedné reakci, a gelovou elektroforézou. Dráha 2 ukazuje devět PCR produktů u normálního jedince (*N*), což svědčí pro přítomnost odpovídajících exonů. U pacienta 1 (*dráha P1*) chybí proužky e a f, což znamená delecí zahrnující exony 45–48. U pacienta 2 (*P2*) chybí proužky f a h, což svědčí pro delecí postihující exony 48–51. U pacienta 3 (*P3*) chybí proužek d a má tedy delecí postihující exon 44. (Publikováno s laskavým svolením P. N. Ray, The Hospital for Sick Children, Toronto.)



Výsledek multiplex PCR (19 exonů) u kontrolní DNA(od zdravého jedince - A) a DNA probanda s dg DMD (B) s delecí exonů 51,52,53 v genu pro dystrofin.

Amplifikační produkty byly analyzovány v polyakrylamidovém gelu a následně barveny dusičnanem stříbrným.

Starty 1,6 - exony 4(196bp),8(360bp),19(459bp)

2,7 - exony Pm(535bp),3(410bp),6(202bp),13(238bp),43(357bp)

3,8 - exony 47(181bp),49(439bp),50(271bp),52(113bp),60(139bp)

4,9 - exony 42(155bp),44(426bp),45(307bp),

48(506bp),51(388bp),53(212bp)

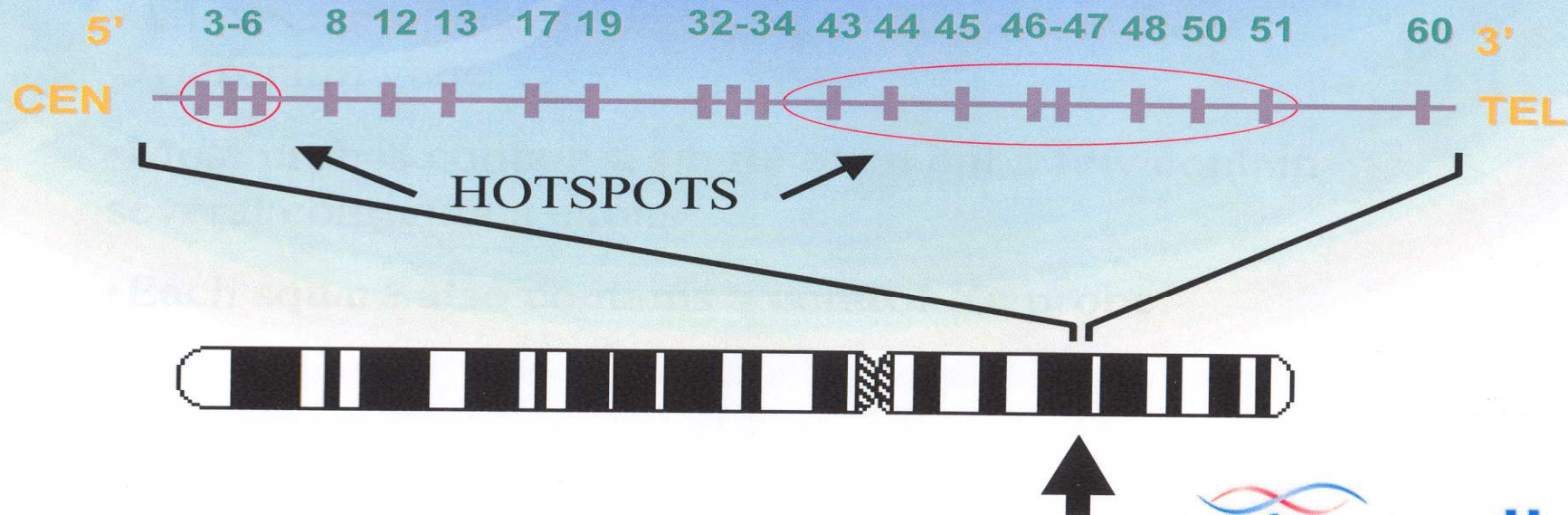
5 - marker pBR322/AluI

Analýza mutací u DMD – molekulárně cytogenetické metody (FISH)



Exons tested with Multiprobe

- 65% of DMD Mutations involve deletions of one or more exons.
- 98% of deletions occur within two hotspots in the gene



Innovative screening solutions for human genetic analysis

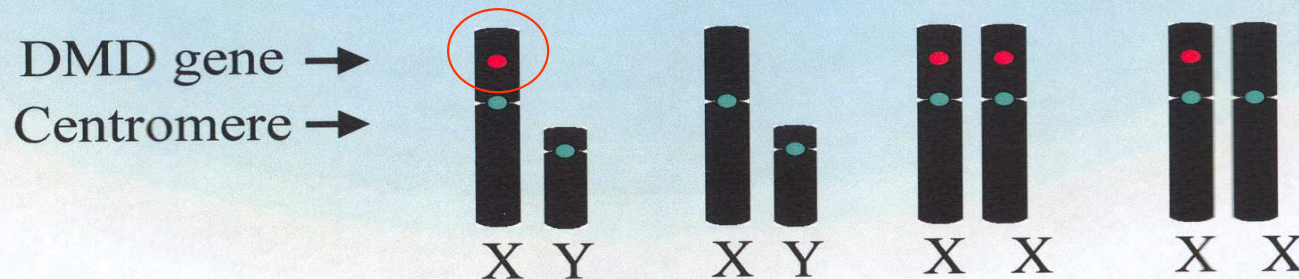
**cytocell**
TECHNOLOGIES

DNA sondy používané pro detekci přenašečů DMD



Expected FISH patterns

- Exon and gene specific probes test for deletions (red)
- X and Y centromere control probes (green or blue)



Multisondový systém určený k detekci delecí jednotlivých exonů pomocí techniky FISH (všechny exony jsou na jednom sklíčku)

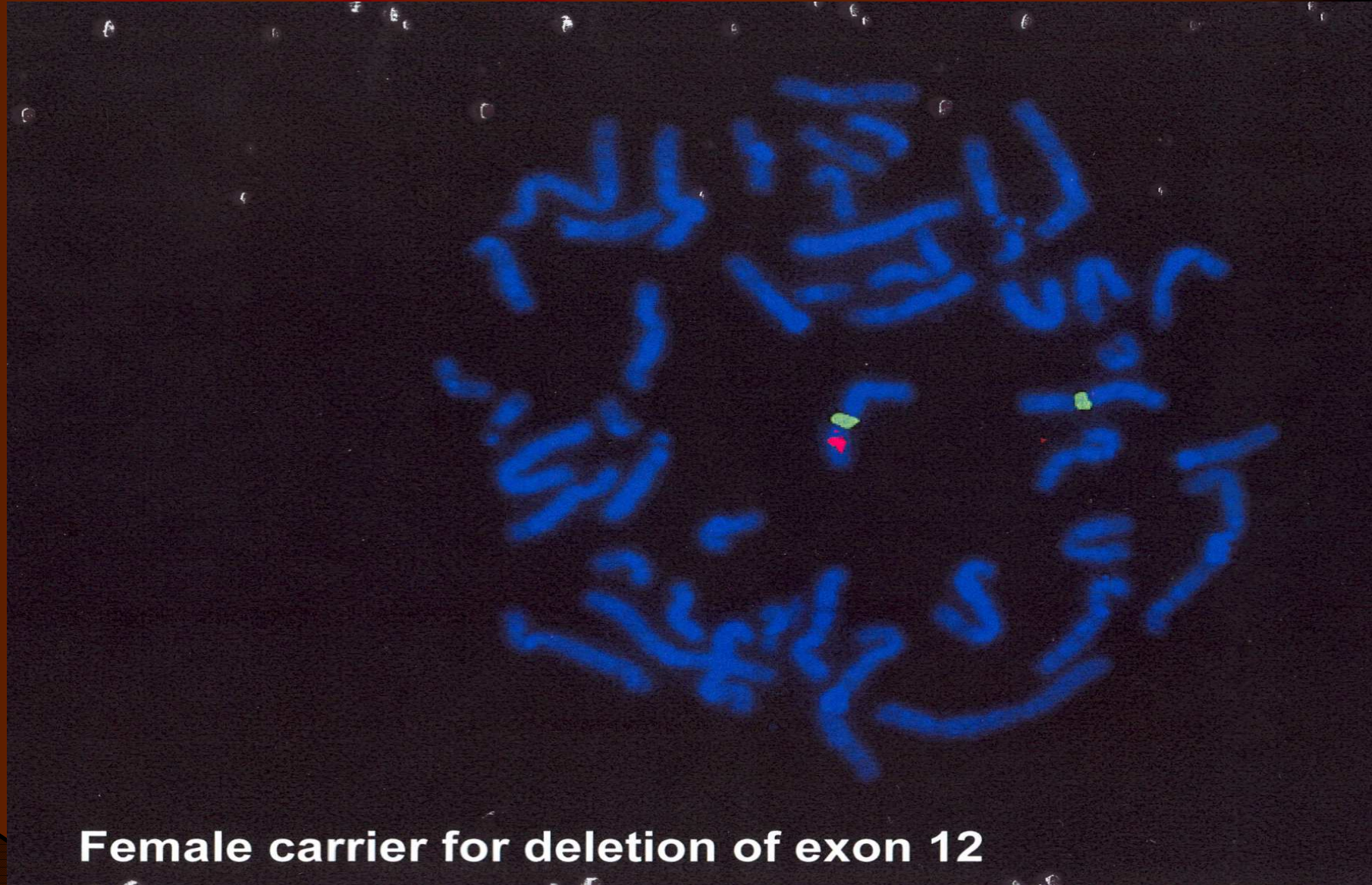


The DMD Panel

1	2 Exons 3-6 Xc	3 Exon 8 Xc	4 Exon 12 Xc	5 Exon 13 Xc	6 Exon 17 Xc	7 Exon 19 Xc	8
9	10 Exons 32-34 Xc	11 Exon 43 Xc	12 Exon 44 Xc	13 Exon 45 Xc	14 Exons 46-47 Xc	15 Exon 48 Xc	16
17	18 Exon 50 Xc	19 Exon 51 Xc	20 Exon 60 Xc	21 GK Xc	22 AHC Xc	X Yc	Y

- Xc control probes provided in alternating green and blue = chequerboard pattern.
 - Provides control for the hybridisation.
 - Allows confirmation that are looking at the correct square for each probe.
 - Allows any slippage of devices during use to be monitored.
- Yc probe included as a control to determine sex of patient

Delece exonu 12 u přenašečky genu pro DMD





MLPA[®]

Multiplex Ligation Probe Amplification

MLPA

- Detection of aberrant copy number of 45 genomic DNA sequences in one easy to perform, PCR based reaction.
- Minimum of only 20 ng DNA
- Partially degraded DNA
 - DNA extracted from paraffin
 - Formalin treated tissues
 - Free fetal DNA obtained from maternal plasma
- Discriminates sequences that differ in only a single nucleotide.
- 45 different mRNAs
- To determine the methylation status of promoters
- Detection of known mutations and SNPs.

MLPA technique

1. Denaturation
2. Hybridization
3. Ligation
4. Amplification



SALSA MLPA probes

Synthetic oligonucleotide
50-60 bp



M13-derived oligonucleotide
60-450 bp



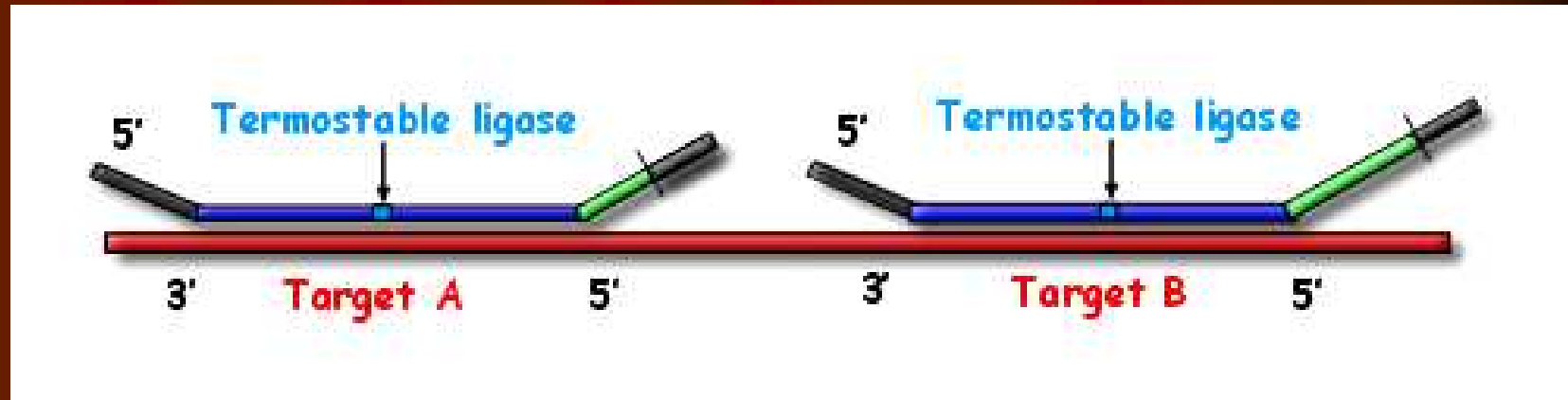
Hybridisation

1. The MLPA probemix is added to denatured genomic DNA
2. The two parts of each probe hybridise to adjacent target sequences



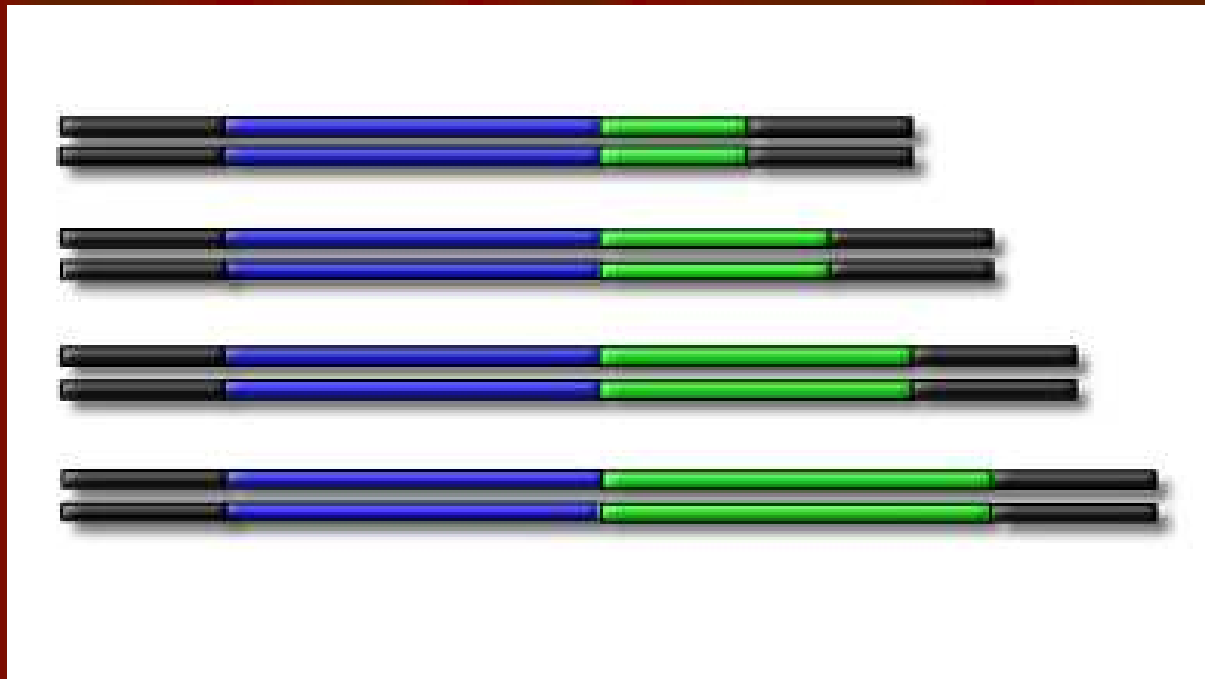
Ligation

3. Probes are ligated by a thermostable ligase



Amplification

4. A universal primer pair is used to amplify all ligated probes.
The amplification product of each probe has a unique length (130 480 bp).

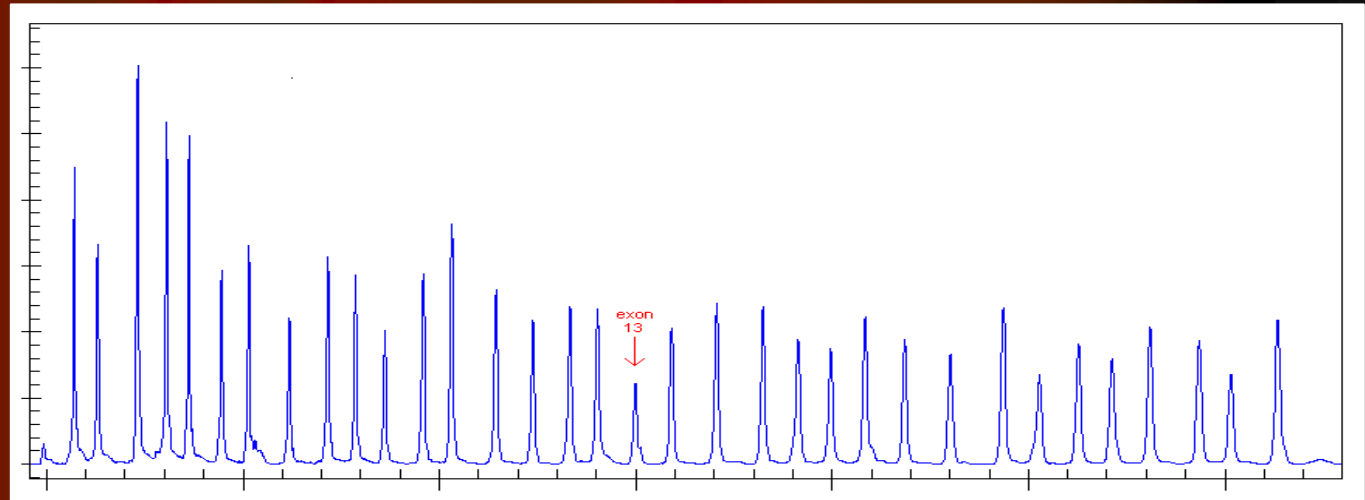
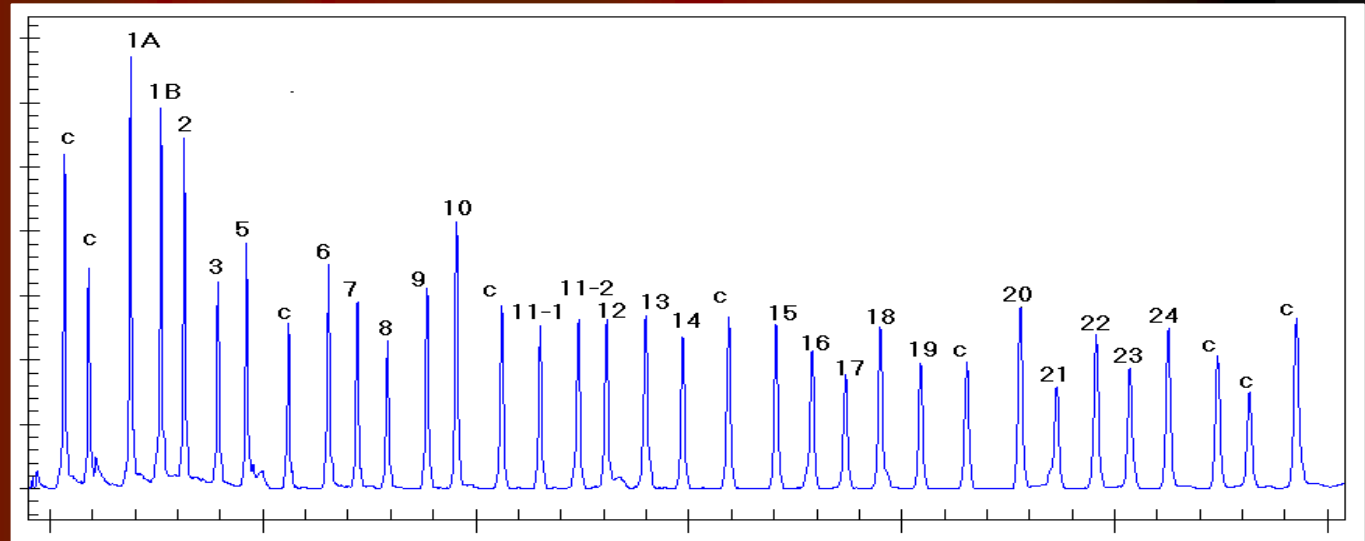


Separation and quantification by capillary electrophoresis

Each peak is the amplification product of a specific probe.

Samples are compared to a control sample.

A difference in relative peak height or peak area indicates a copy number change of the probe target sequence



MLPA products

- Detection of aneuploidy of chromosomes 13, 18, 21, X and Y
- Detection of large chromosomal deletions or duplications: DiGeorge syndrome, Williams syndrome, Spinal Muscular Atrophy (SMA), subtelomeric regions etc
- Detection of gains and losses of genes in cancer tissues: Her2-neu (ERBB2), TP53, MYC etc.
- Detection of deletions / duplications of single genes and exons: RHD, BRCA1 and 2, MSH2, MLH1, VHL, SHOX, MECP2, APC and NF2 etc.
- Copy number of all CFTR exons.
- Copy number of all 79 DMD exons in 2 MLPA reactions
- MS-MLPA kits
- Visit www.mlpa.com for all our products

DMD – dědičnost a genetická prognóza

- vysoká frekvence nových mutací
- alelová heterogenita
- manifestace u přenašeček
- fenotypová variabilita
- zhruba třetina matek majících jednoho postiženého syna není nosičkami mutace DMD genu. Je-li matka nosička má každý syn 50 % riziko a každá dcera 50 % riziko, že zdědí mutaci DMD genu
- /u žen inaktivace X chromozomu – nízké riziko pro onemocnění DMD/
- germinální mozaicismus !!!

Mapování genu pro DMD

- příklad mapování genu pomocí genové dávky – využití strukturálně přestavěných chromozomů
- chlapec s prokazatelnou intersticiální delecí pruhu Xp21

(Bruce Bryer: 1966-1983, Washington)

- 4 choroby:
- DMD, chronická granulomatoza, retinitis pigmentosa, vzácná krevní skupina
- lokalizace genu do deletované oblasti

(Lou Kunkel, 1987)

Tabulka 16. Souhrn kroků použitých k izolaci genu pro Duchenneovu muskulární dystrofii (DMD)

- Objev vazby DMD a náhodné próby z X-specifické knihovny.
- Próba mapuje do oblasti Xp21 s maximálním lod score ve vzdálenosti 15 cM.
- Chromozomální delecce a translokační zlomy v oblasti Xp21.

Pacient BB:

- Viditelná delecce. DMD, chronická granulomatózní choroba a retinitis pigmentosa.
 - Genomická knihovna z normálního X-chromozomu odpovídající sekvencím deletovaným u pacienta BB.
 - Jeden klon (pert-87) detekuje delecii u BB a dále u 5 z 57 postižených chlapců.
 - Kráčení po chromozomu (chromosome walking) do vzdálenosti 110 kb oběma směry od pert-87.
 - Klony z procházky po chromozomu jsou použity jako próby na zoo-blot.
 - Klony pozitivní na zoo-blotu jsou použity jako próby pro hybridizaci se svalovou mRNA.
 - Pozitivní klon p87-25 je použit jako próba do svalově specifické cDNA-knihovny.
 - Z pozitivně screenovaných cDNA-klonů je sestaven 14kb transkript.
 - Transkript kóduje protein obsahující 3685 aminokyselin; protein pojmenován dystrofin.
 - Asi 52 exonů roztažených po délce 2 megabází DNA - jen 0,7 % genu představuje kódující sekvence.
 - Duchenneova muskulární dystrofie je způsobena delecemi exonů, při nichž se posouvá čtecí rámeček.
 - Beckerova muskulární dystrofie vzniká při delecích exonů, které nemění čtecí rámeček zbylého transkriptu.
-

DMD – klinické aplikace

Prenatální diagnostika a stanovení přenašečství

- u rodin, s prokázanou delecí či duplikací vyšetření fetální krve (multiplexová PCR, MLPA)
- tam, kde neznáme molekulární defekt – prenatální diagnostika pomocí markerů ve vazbě s genem

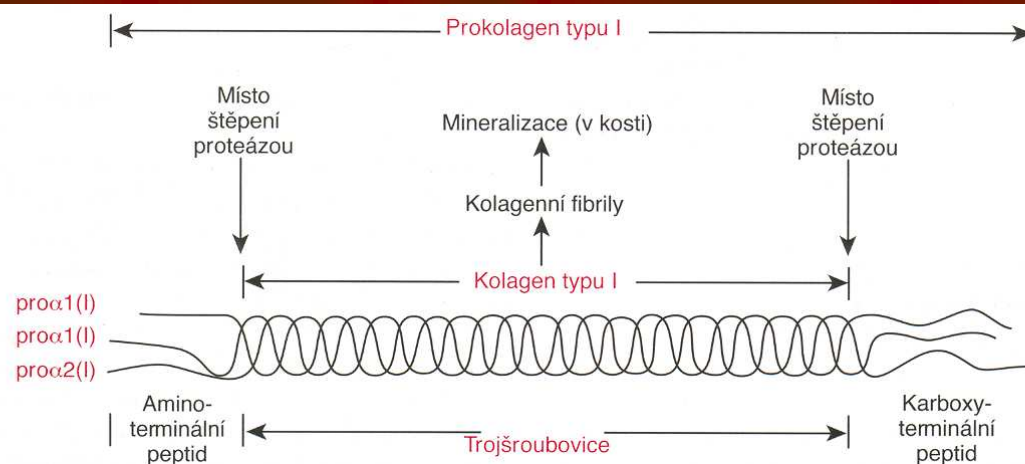
Tabulka 4. Klinicky významná autozomálně dominantní onemocnění v severní Evropě

Orgánová soustava	Onemocnění	Výskyt na 10 000 porodů	Hlavní klinické symptomy
nervový systém	neurofibromatóza	2	benigní kožní neurofibromy; hnědé skvrny na kůži
	tuberózní skleróza	1	epilepsie; mentální retardace; bílé skvrny na kůži
	Huntingtonova choroba	0,55	vůlí neovladatelné pohyby; demence; pozdní nástup
	myotonní dystrofie	0,5	progresivní svalová slabost, zpožděná relaxace
střeva	adenomatózní polypóza	1	benigní polypy v tlustém střevě, z nichž některé časem přecházejí v maligní nádory
ledviny	polycystické ledviny	10	renální cysty; progresivní selhání ledvin; pozdní nástup
oči	retinoblastom	0,55	maligní nádory sítnice
	retinitis pigmentosa ¹	0,4	ztráta nočního vidění a zrakové ostrosti
uši	otoskleróza	3	progresivní ztráta sluchu; pozdní nástup
krev	hypercholesterolémie	2	raná ateroskleróza věnčitých tepen
	vrozená sférocytóza	2	chronická hemolytická anémie; splenomegalie
kostra	hereditární trombofilie	5	opakující se žilní trombózy
	diafyzální aplazie	5	četné nádorovité výrůstky (exostózy) na konci kostí
	Marfanův syndrom	1	arachnodaktylie; skolióza; dilatace kořene aorty; dislokace čoček
	osteogenesis imperfecta	0,5	lomivé kosti; zlomeniny; deformita; hluchota
metabolismus	achondroplazie	0,4	nanismus; deformita
	Ehlersův – Danlosův syndrom	0,06	ochablost kůže a kloubů; aneurismy
	akutní intermitentní porfyrie	0,13	akutní záchvaty bolesti břicha; respirační paralýza

¹ Vyskytuje se rovněž v autozomálně recesivní a X-vázané recesivní formě. Zdroj: [77, 95].

Dominantní mutace v genech pro kolagen: *Osteogenesis imperfecta (OI)*

- dědičná onemocnění kolagenu I jsou charakterizovaná náchylností ke snadné lomivosti kostí či deformitám skeletu
- molekula prokolagenu I je tvořena ze dvou řetězců **pro α 1** (chromozom 17) a jednoho řetězce **pro α 2** (chromozom 7)
- častý výskyt mutací prokolagenu bránící v asociaci podjednotek (nalezeno více než 200 mutací)



Obrázek 12.20 Struktura prokolagenu typu I. Každé vlákno kolagenu je tvořeno jako trojšroubovice prokolagenu, která je secernována do extracelulárního prostoru. Amino- a karboxyterminální domény jsou extracelulárně odštěpeny, vzniká kolagen. Zralé kolagenní fibrily jsou pak uspořádány a v kosti také mineralizovány. Povšimněte si, že prokolagen typu I je tvořen dvěma řetězci $\text{pro}\alpha 1(\text{I})$ a jedním řetězcem $\text{pro}\alpha 2(\text{I})$. (Převzato z Byers PH Disorders of collagen biosynthesis and structure. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (ed.) The Metabolic Bases of Inherited Disease, 6. vyd., New York, McGraw-Hill 1989, 2805–2842.)

Souhrn různých typů Osteogenesis imperfecta

Typ	Fenotyp	Dědičnost	Biochemický defekt	Genový defekt
Porucha produkce kolagenu typu I*				
Typ I	Lehký: modré skléry, křehké kosti, ale bez kostních deformit; často presenilní hluchota	AD	Běžný: všechn kolagen je <i>normální</i> (z normální alely, ale jeho množství je <i>sníženo</i> na polovinu. Zřídka substituce Gly (viz obr. 12.21)	Běžný: nulové alely, které ruší produkci řetězců pro $\alpha 1(I)$, jako defekty, které interferují se syntézou mRNA
Poruchy struktury kolagenu typu I				
Typ II	Perinatálně letální: těžké abnormality (fraktury, deformity), tmavé skléry, smrt do 1 měsíce	AD (nové mutace)	Běžný: produkce <i>abnormálních</i> molekul kolagenu díky substituci Gly v (Gly-X-Y) trojitého helixu, s určitou převahou COOH-terminální poloviny proteinu (viz obr. 12.22)	Běžný: mutace měnící smysl kodónu v kodónech pro glycin genů pro řetězce $\alpha 1$ a $\alpha 2$
Typ III	Progresivně deformující: fraktury, často při narození, progresivní deformity kostí, omezený růst, modré skléry, dentinogenesis imperfecta, ztráta sluchu	AD**	Abnormální molekuly kolagenu: substituce Gly mnoha typů v trojitém helixu. Lokalizovány po celém proteinu (viz obr. 12.22)	Mutace měnící smysl kodónu v kodónech pro glycin genů pro řetězce $\alpha 1$ a $\alpha 2$
Typ IV	Deformující, s normálními sklérami: lehké až střední deformity kostí, malá postava, fraktury, ztráta sluchu, dentinogenesis imperfecta	AD	Abnormální molekuly kolagenu: mnoho typů substituce Gly v trojitém helixu. Lokalizovány po celém proteinu (viz obr. 12.22).	Mutace měnící smysl kodónu v kodónech pro glycin genů pro řetězce $\alpha 1$ a $\alpha 2$

* Několik pacientů s chorobou typu I má substituci glycinu v jednom kolagenním řetězci typu I (viz obr. 12.22).

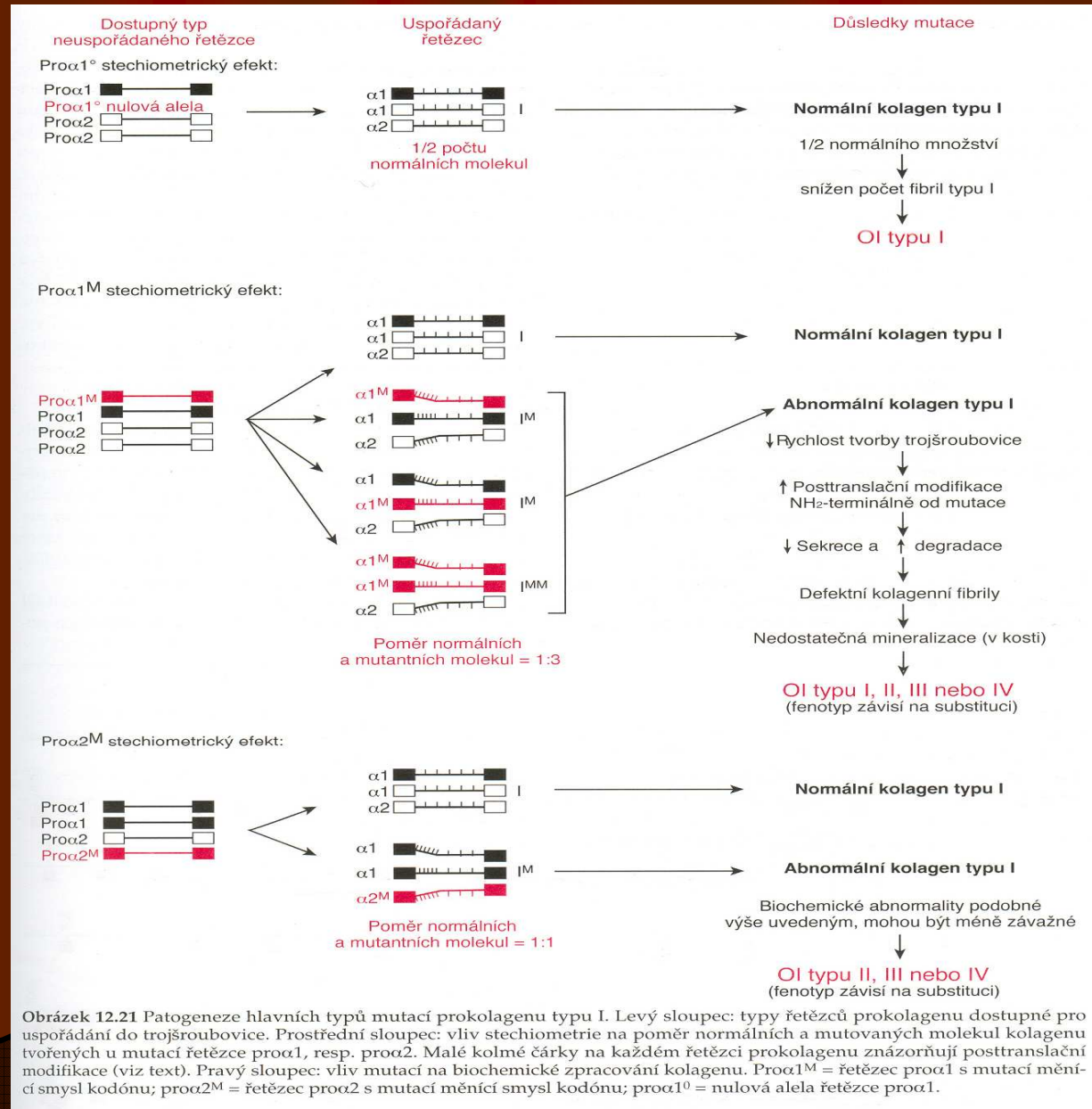
** Vzácné případy jsou autozomálně recesivní.

Modifikováno podle Byers PH Disorders of collagen biosynthesis and structure. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle (ed.) The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. 6. vyd. New York, McGraw-Hill 1989, 2805–2844; a Byers PH Brittle bones – fragile molecules: Disorders of collagen structure and expression. Trends Genet 1990;6:293–300.

Mutace u OI

- A) mutace snižující tvorbu kolagenu
- B) mutace měnící strukturu kolagenu

Důsledky mutací prokolagenu typu I



Obrázek 12.21 Patogeneze hlavních typů mutací prokolagenu typu I. Levý sloupec: typy řetězců prokolagenu dostupné pro uspořádání do trojšroubovice. Prostřední sloupec: vliv stechiometrie na poměr normálních a mutovaných molekul kolagenu tvořených u mutací řetězce proα1, resp. proα2. Malé kolmé čárky na každém řetězci prokolagenu znázorňují posttranslační modifikace (viz text). Pravý sloupec: vliv mutací na biochemické zpracování kolagenu. Proα1^M = řetězec proα1 s mutací měnící smysl kodónu; proα2^M = řetězec proα2 s mutací měnící smysl kodónu; proα1⁰ = nulová alela řetězce proα1.

Genetika Osteogenesis imperfecta

- většina mutací účinkuje dominantně
- mírný fenotyp OI typu I – je tvořena polovina množství normálních molekul, ale mají normální funkci (**nulová alela Pro $\alpha 1^0$**)
- alely s mutací měnící smysl kodónu (pro $\alpha 1^M$ poškozují funkci jak normální alely Pro $\alpha 1$, tak i normální alely pro $\alpha 2$ – **dominantně negativní alely** (brání vzniku trojšroubovice)
- **důsledek - OI typu II, III a IV – těžší postižení**
- **léčba bisfosfonáty – zvyšují kostní denzitu**

Ehlersův-Danlosův syndrom (AD dědičnost – mutace kolagenu)

- choroba pojivové tkáně charakterizovaná fragilitou a hyperextenzibilitou kůže
- defekty v genech pro řetězce kolagenu I nebo III – porucha postranslační modifikace
- deficit lyzylhydroxylázy
- **dominantně negativní efekt** (defektní produkt jednoho genu vede k nefunkčnosti proteinového komplexu)



table 11.1

Collagen Disorders

Disorder	Defect	Signs and Symptoms
Alport syndrome	Mutation in type IV collagen that interferes with tissue boundaries	Deafness and inflamed kidneys
Aortic aneurysm	Missense mutation substitutes an <i>arg</i> for <i>gly</i> in alpha 1 gene	Aorta bursts
Chondrodysplasia	Deletion, insertion, or missense mutation replaces <i>gly</i> with bulky amino acids	Stunted growth, deformed joints
Dystrophic epidermolysis bullosa	Collagen fibrils that attach epidermis to dermis break down	Skin blisters on any touch
Ehlers-Danlos syndrome	Missense mutations replace <i>gly</i> with bulky amino acids; deletions or missense mutations disrupt intron/exon splicing	Stretchy, easily scarred skin, lax joints
Osteoarthritis	Missense mutation substitutes <i>cys</i> for <i>arg</i> in alpha 1 gene	Painful joints
Osteogenesis imperfecta type I	Inactivation of α allele reduces collagen triple helices by 50%	Easily broken bones; blue eye whites; deafness
Stickler syndrome	Nonsense mutation in procollagen	Joint pain, degeneration of vitreous gel and retina

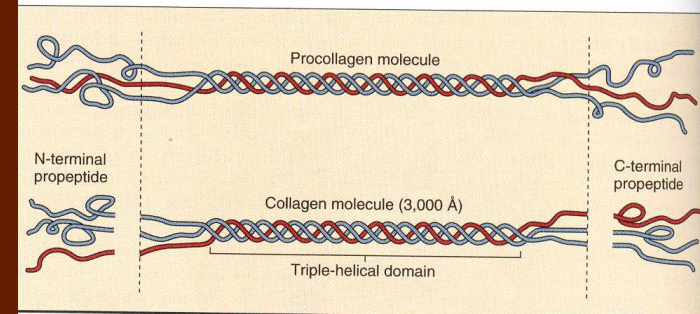


Figure 11.4

Collagen has a very precise conformation. The $\alpha 1$ collagen gene encodes the two blue polypeptide chains, and the $\alpha 2$ procollagen gene encodes the third, red chain. The procollagen triple helix is shortened before it becomes functional, forming the fibrils and networks that comprise much of the human body.

Mutace vznikající v důsledku fúze genů - barvoslepost

FUSION MUTATIONS

Unequal crossing-over between non-homologous genes can also result in a class of fusion gene mutations. These are best illustrated by defects in colour vision genes leading to different kinds of colour blindness. Humans have three different colour genes; a blue pigment gene on chromosome 7 and contiguous red and green pigment genes at the tip of the long arm of the X chromosome. There is a single red pigment gene but one to three (occasionally more) green pigment genes situated to the 3' side of the red gene. Red and green pigment genes are highly homologous and are assumed to have evolved from a common ancestral red pigment gene.

X-linked colour-vision defects affect about 8% of Caucasian males, with deuteranopia (green-colour blindness) being some three times as common as protanopia (red-colour blindness). Many different types of mutation account for these defects, but among the more interesting are fusion genes resulting from unequal crossing-over between red and green pigment genes. In the example shown in Fig. 4.9, meiotic misalignment of a red pigment gene on one X chromo-

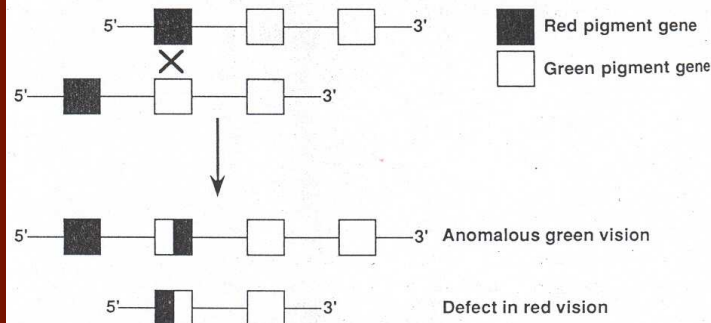
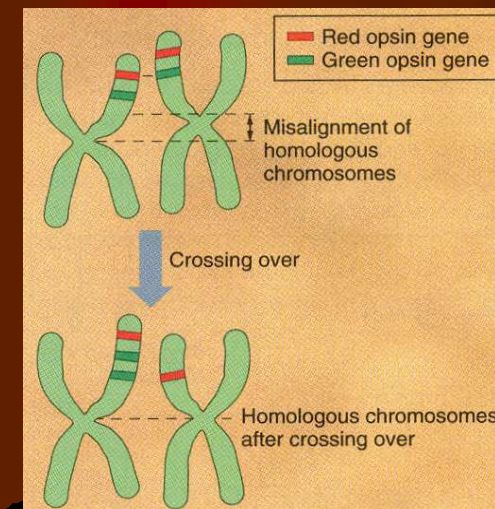
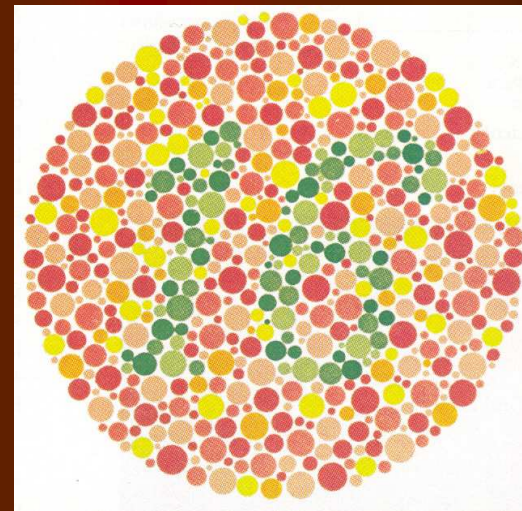


Fig. 4.9. Schematic representation of meiotic misalignment and unequal crossing-over between X-linked red and green colour-vision genes. Two fusion genes result, in one case resulting in anomalous green vision (the chromosome still has two normal green pigment genes) and in the other defective red vision (no intact red pigment gene).



Příklady

Honzík má CF. Jaká je pravděpodobnost, že je homozygotem pro mutaci $\Delta F508$? (Předpokládejme, že v době konzultace může být zjištěno 85 % CF mutací a že rodiče jsou ze severní Evropy, kde má alela $\Delta F508$ frekvenci 0,70)

Jakub je jediný člen rodiny postižený DMD. Má jednoho zdravého bratra, Josefa. DNA-analýza ukazuje, že Jakub má delecí v genu DMD a že Josef zdědil stejný maternální X-chromozom, ale bez delece. Jakou genetickou konzultaci byste poskytli rodičům ohledně rizika rekurence DMD v dalším těhotenství ???

Vliv dominantně negativní alely odráží jeden obecný mechanismus, kterým mutace v bílkovině způsobuje dominantně dědičné onemocnění. Jaký jiný mechanismus je běžně sdružen s dominancí v genech kódujících podjednotky multimerních proteinů?

Mutace vedoucí k farmakogenetickým chorobám

Příklad: maligní hypertermie

Farmakogenetika

- speciální oblast biochemické genetiky, která pojednává o variabilitě odpovědi na léky (..ale i jiné chem. látky) způsobené genetickou variabilitou
- genetická variabilita, která mění schopnost organismu absorbovat, transportovat, metabolizovat či vylučovat léky (chem. látky) nebo jejich metabolity
- polymorfismus pro lékovou odpověď
(6,7 % - nežádoucí reakce na léky)

účinná dávka léku – 50 % populace !!!

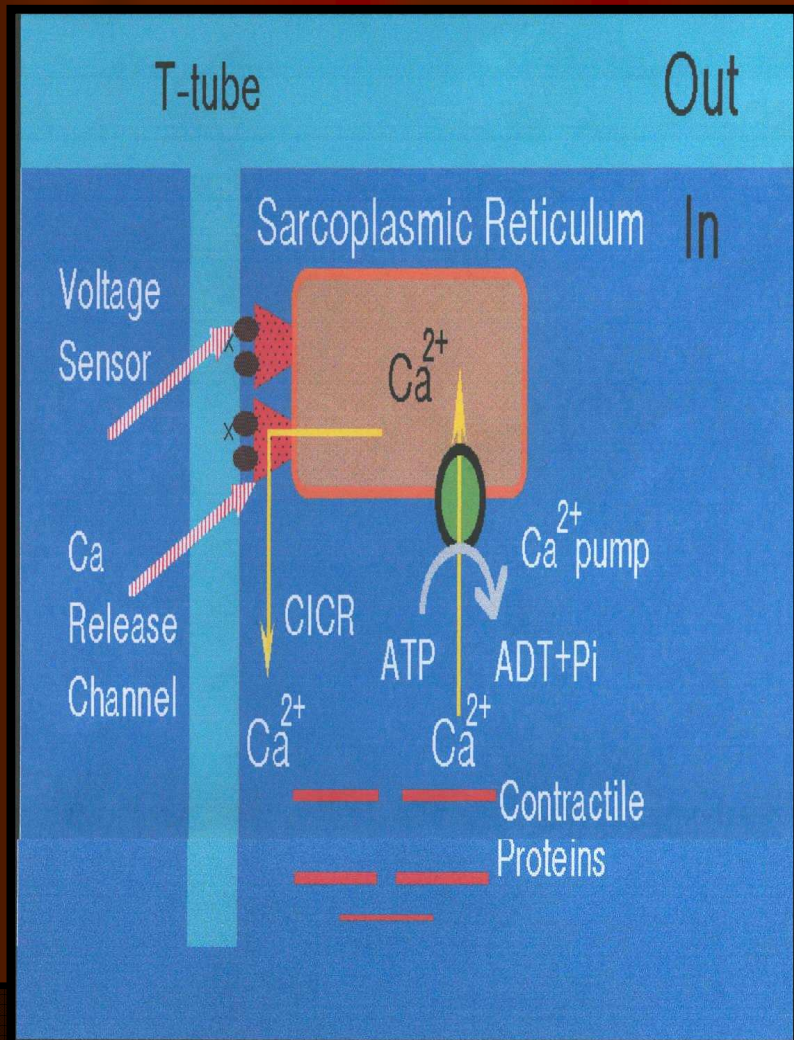
Maligní hypertermie

- AD porucha, u které se může vyskytnout dramatická nežádoucí reakce na aplikaci všech běžně používaných inhalačních anestetik (např. halothanu) a myorelaxancií
- vznik vysoké horečky, přetrvávající svalová kontrakce, vystupňovaný katabolismus
- příčina smrti při anestézii (zejména u dětí) – mortalita 10 – 20 %
- incidence 1 : 15 000 u dětí
1 : 50 000 u dospělých

Svalová buňka

dějiště primární abnormality při MH

MH – porucha kalciového metabolismu příčně pruhovaného svalstva !!!



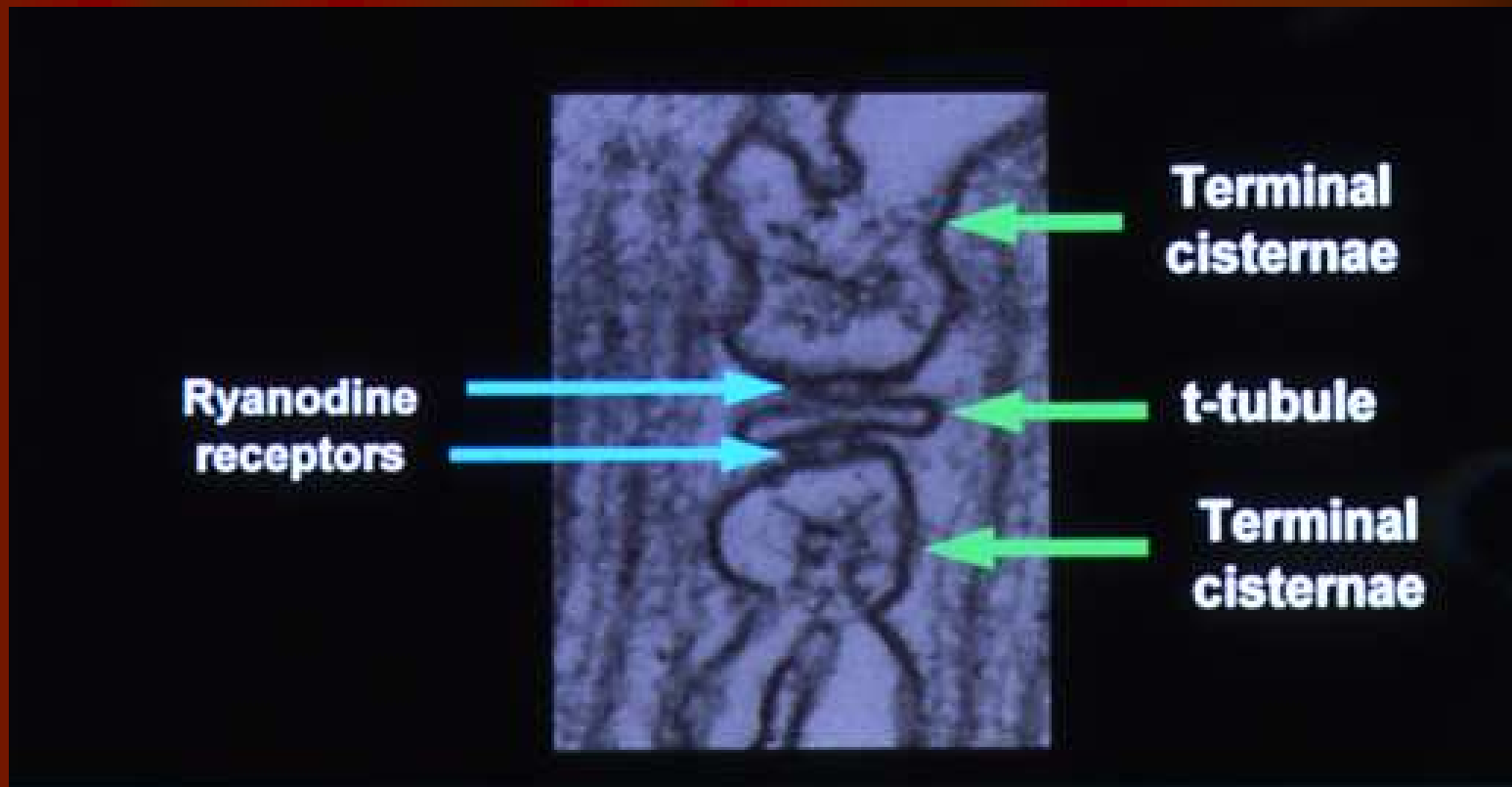
stoupající a klesající množství kalcia způsobuje svalové kontrakce a relaxace

rozhodující význam pro homeostázu kalcia

↓
- **ryanodinový receptor** -
kalciový releasing kanál
na sarkoplasmatickém retikulu

- kontrakce svalu
 ↪ uvolnění Ca^{2+} do myoplasmy
- relaxace svalu
 ↪ resorbce Ca^{2+} do ER
 ↓
 ATPdependentní

Snímek z elektronového mikroskopu zachycující spojení endoplasmatického retikula a T-tubulu ukazuje polohu ryanodinového receptoru RYR1

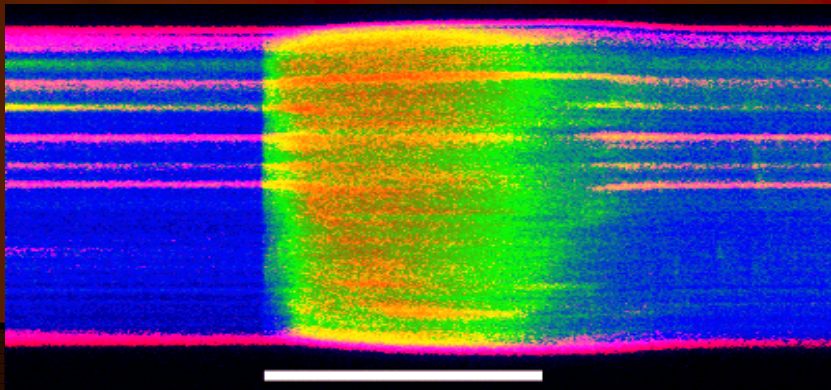


Podstata onemocnění MH

Za hlavní příčinu je považována
porucha funkce ryanodinového receptoru RYR1

↓
sval se změněnou funkcí RYR1 ↔ vnímavý sval

↙
při kontaktu s triggersubstancí
vzniká nekontrolované uvolňování Ca^{2+} ze SR s poruchou jeho
zpětného vychytávání



Konfokálně nasnímaný obraz nahromadění Ca^{2+}
(zelená a žlutá barva) v cytosolu svalové buňky
za 1 s (bílá čára) během jednoho akčního potenciálu.

R. Corado

„Triggersubstance“ (spouštěče) - substance vyvolávající u MHS pacientů rozvoj MH - krize

Látky běžně užívané k úvodu a vedení celkové anestezie:

- volatilní čili prchavá anestetika - všechny halogenové uhlovodíky jako halotan, isofluran, desfluran, sevofluran
- depolarizující svalová relaxancia - zejména sukcinylcholin

MH episoda

Triggersubstance

volatilní anestetika

depolarizující svalová relaxancia



MHS (MH susceptible) pacient



Kauzální terapie MH

Dantrolen



Schválen 1979

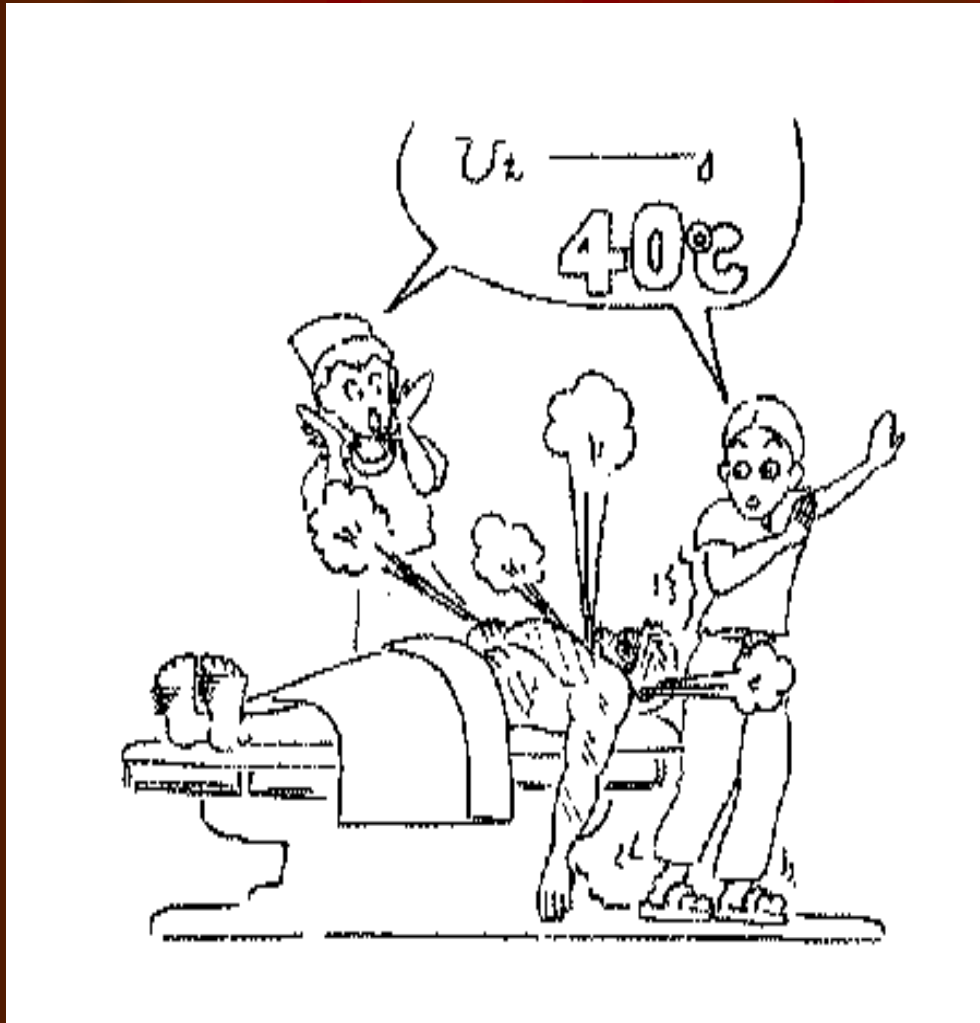
působí na úrovni
dyhydropyrimidinového receptoru

pravděpodobně zde blokuje
přenos membránového potenciálu

- tlumí tak uvolňování Ca^{2+} ze SR
- neovlivňuje zpětné vstřebávání Ca^{2+}

Jeho zavedení přispělo ke snížení mortality při MH – krizi ze 70-80 % (konec 70.let) na 5-10%.

Diagnostika MH

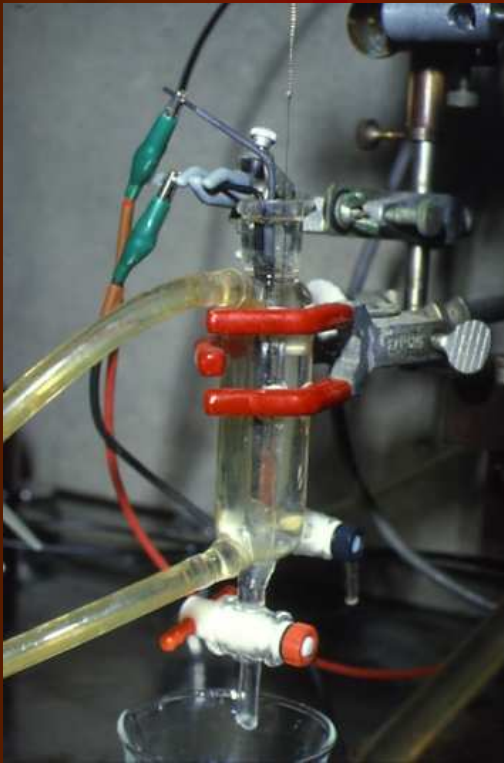


In vitro kontrakční test

Molekulárně genetická
diagnostika

Diagnostika MH

In vitro kontrakční test



vzorek svalové tkáně získané otevřenou biopsií
vystaven působení klasických spouštěčů
halotanu a kofeinu ve stoupajících koncentracích

měřena velikost kontrakce svalového vlákna



sval s dispozicí k MH se kontrahuje zřetelně více
a při nižších koncentracích než zdravý sval

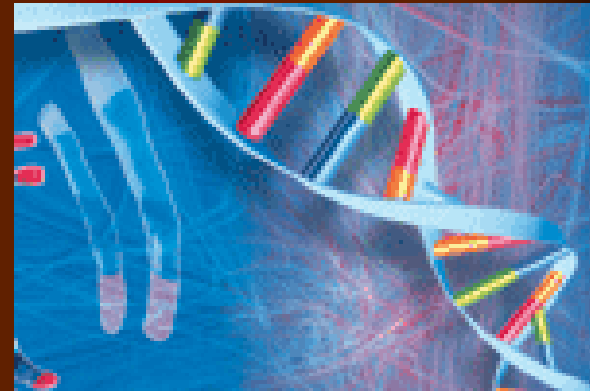
specifita 94%

Diagnostika MH

Molekulárně genetická diagnostika – mutační analýza genu RYR1

Komplikace:

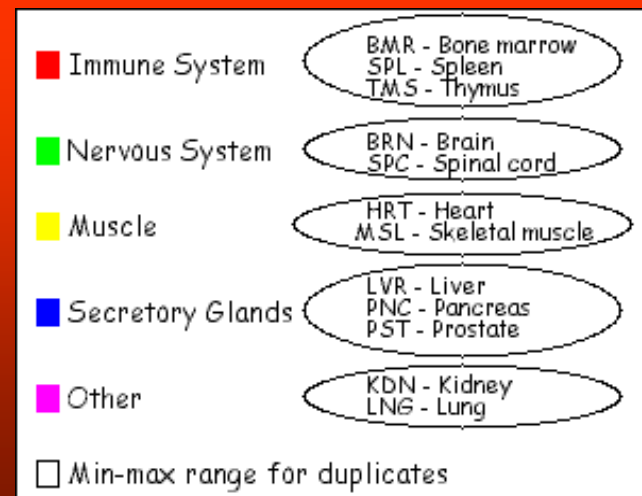
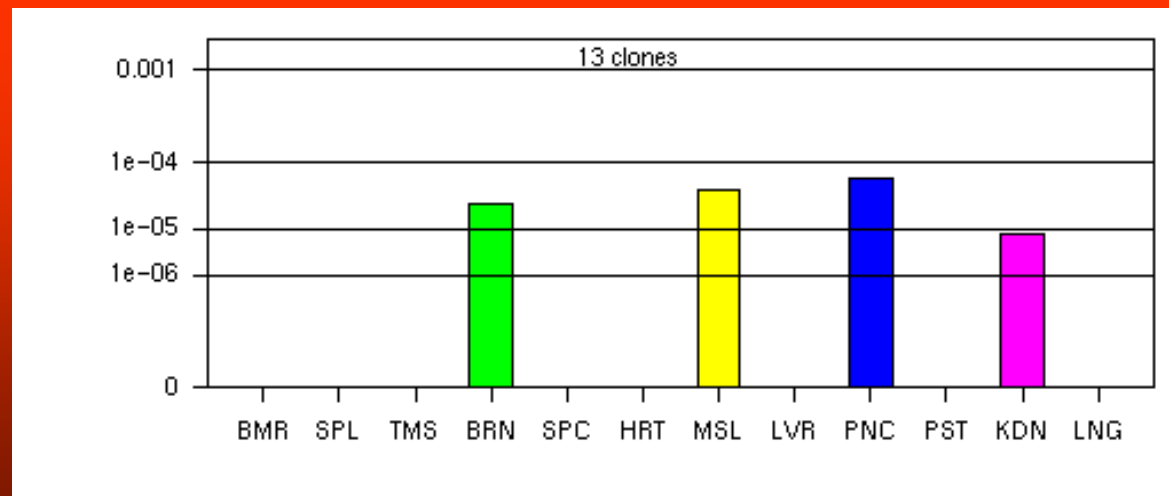
- **diskordance mezi MH susceptibilitou and RYR1 mutacemi**
potřeba nezávislého biochemického důkazu, že kandidátní MH mutace je patogenní
- **nízká incidence každé RYR1 mutace**
- **rozsáhlost RYR1 genu**



RYR1 gen

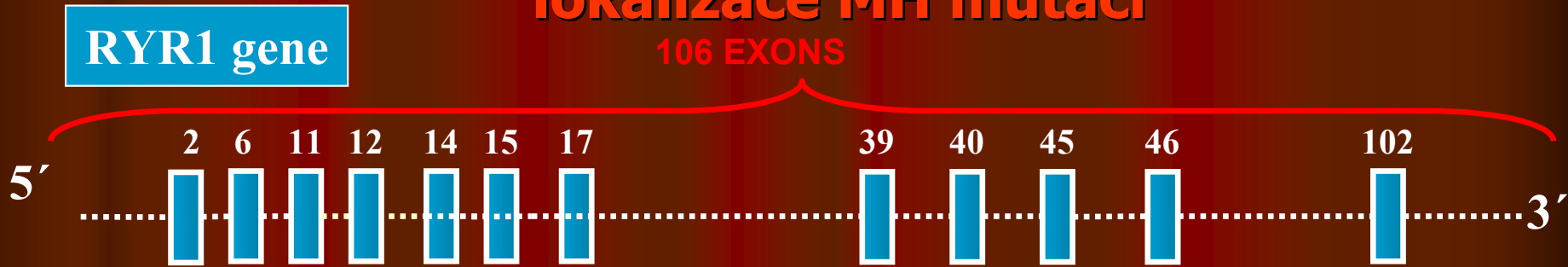
- lokalizace: 19q12.1-13.2
- 106 exonů
- cDNA 15 301bp

Exprese RYR1 genu v lidských tkáních

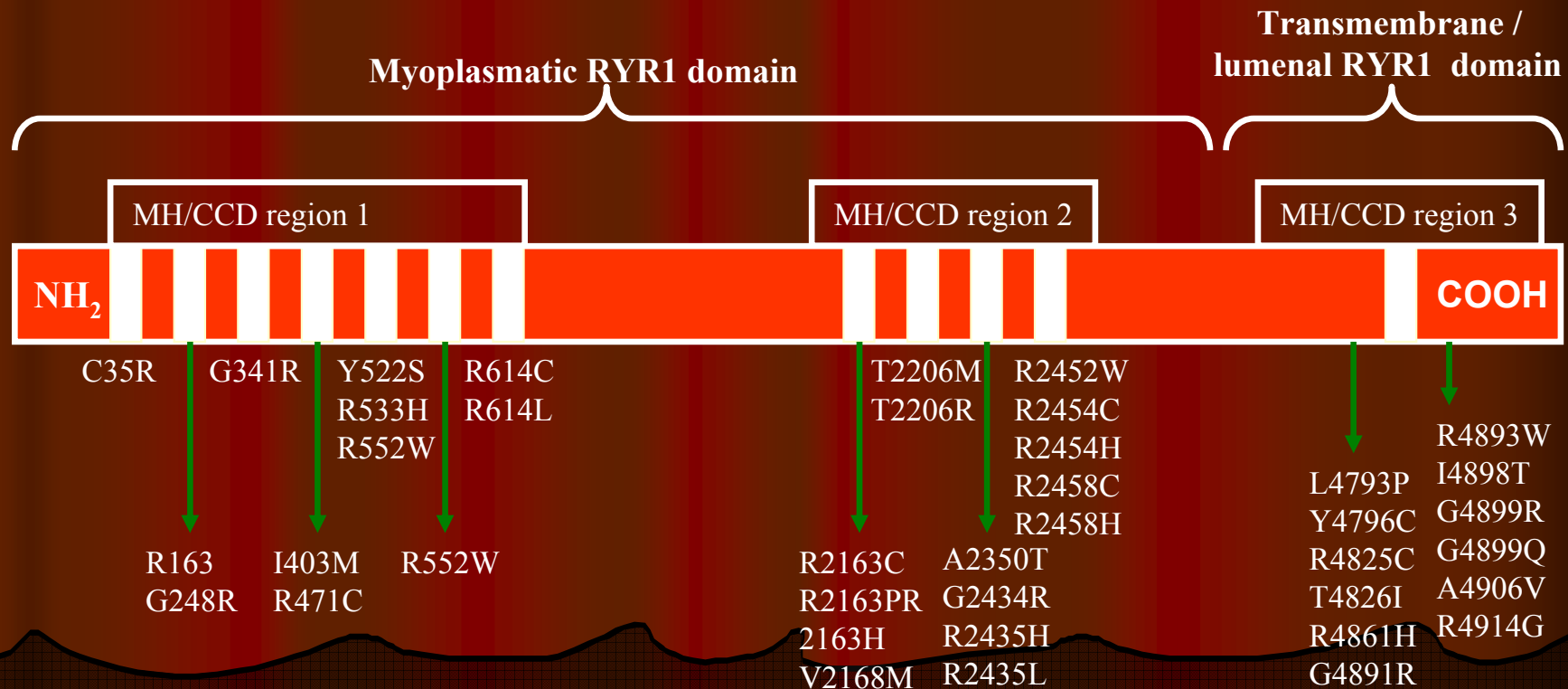


RYR1 gen a protein, lokalizace MH mutací

106 EXONS



RYR1 protein



Mutace v RYR1 genu

- více než 50% MH rodin a většina CCD rodin
- detekováno 45 mutací - 41 nukleotidových substitucí
- 4 malé delece

jsou nahromaděny ve třech regionech genu RYR1 :

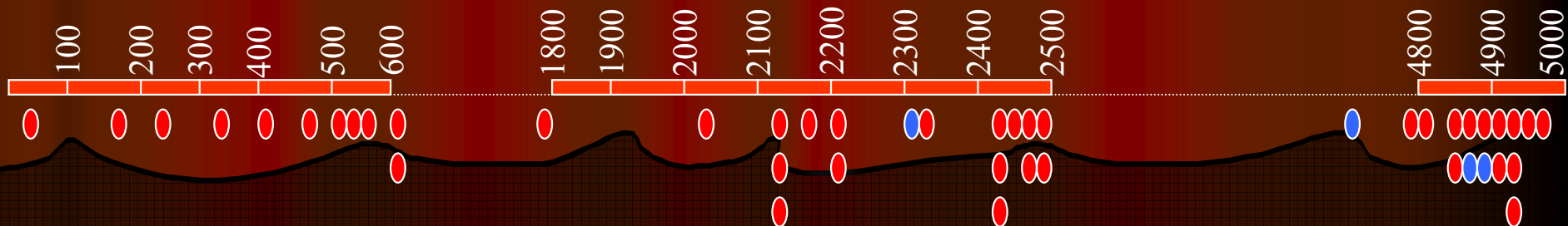
MH/CCD region 1 : N-terminalní AK 35 -614

MH/CCD region 2 : centrálně lokalizované AK 2163 - 2548

MH/CCD region 3 : C-terminální

RYR1 amino acid sequence

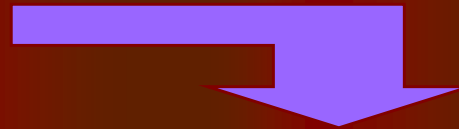
- nucleotide substitutions (missense / nonsense)
- small deletions



Strategie v mutační analýze RYR1 genu (dr. I. Valášková, OLF FN Brno)

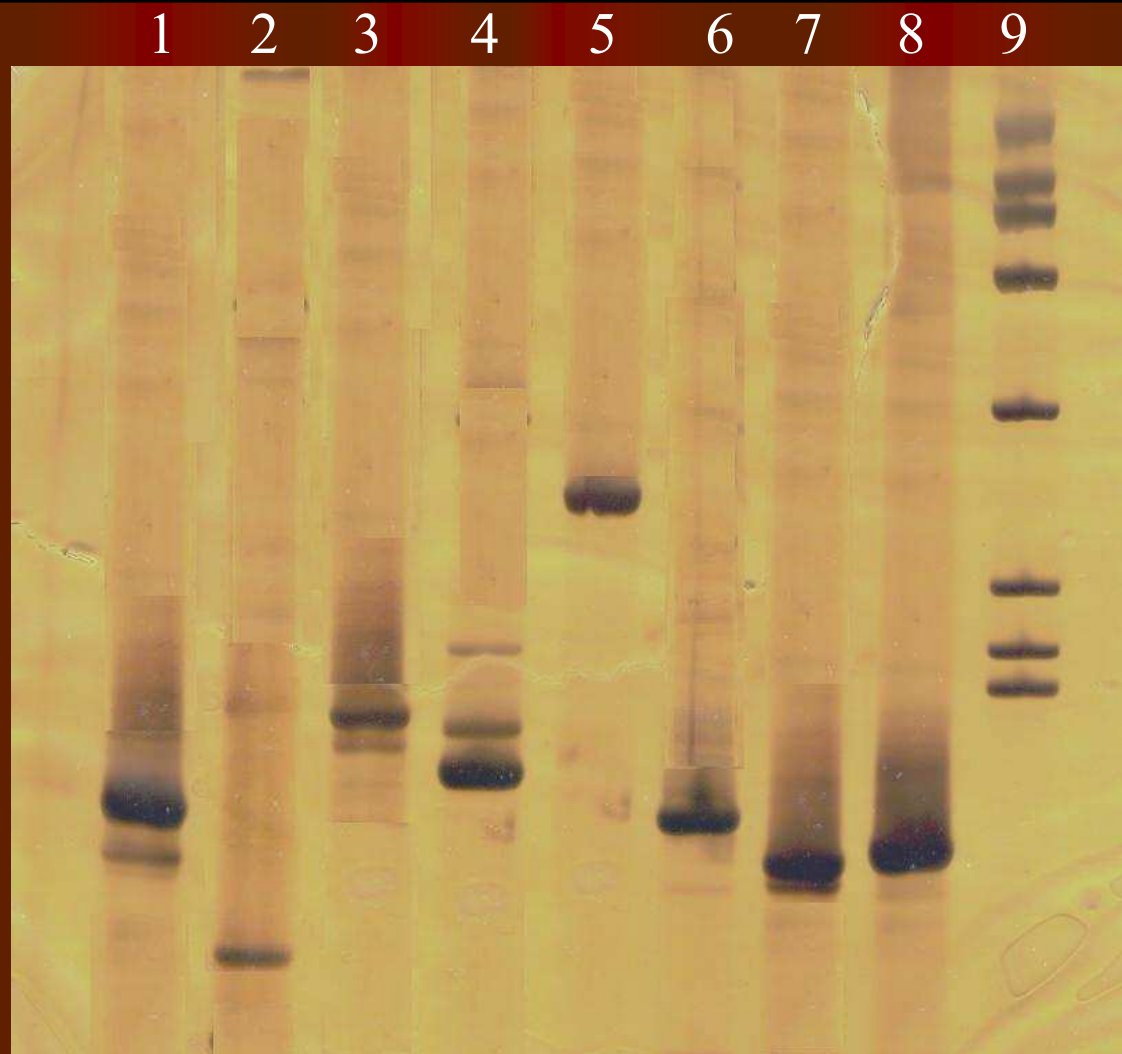
- zaměřena na dva regiony s největším výskytem mutací

- N-terminalní region
- centrálně lokalizovaný region



Je prováděna PCR amplifikace exonů 6, 11, 12, 17, 39, 40, 45,46

PCR fragmenty jsou přímo sekvenovány na ABI PRISM 310.



Exons: 6 11 12 17 39 40 45 46 M

PCR produkty analyzovaných exonů RYR1 genu

5% PAG

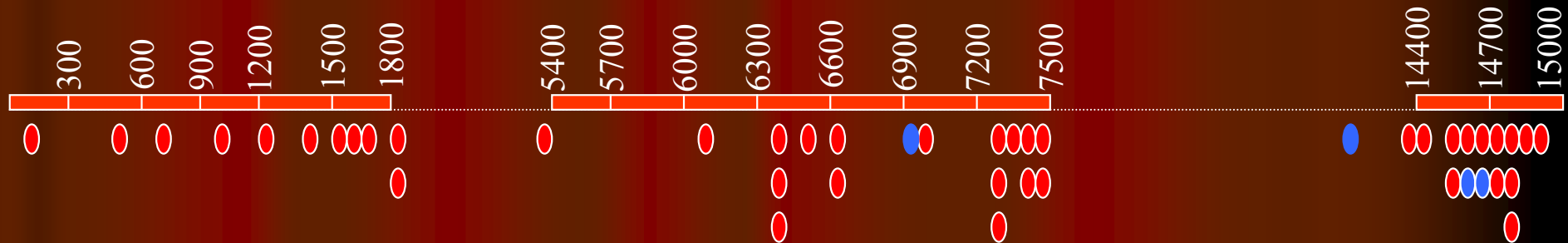
dráha 1 - 8: exony RYR 1 genu

dráha 9: molecular weight marker pBR322/AluI

Strategie mutační analýzy RYR1 genu

**RYR1 cDNA sekvence/
distriduce RYR1 mutací**

○ nucleotide substitutions (missense / nonsense)
○ small deletions



RNA

cDNA

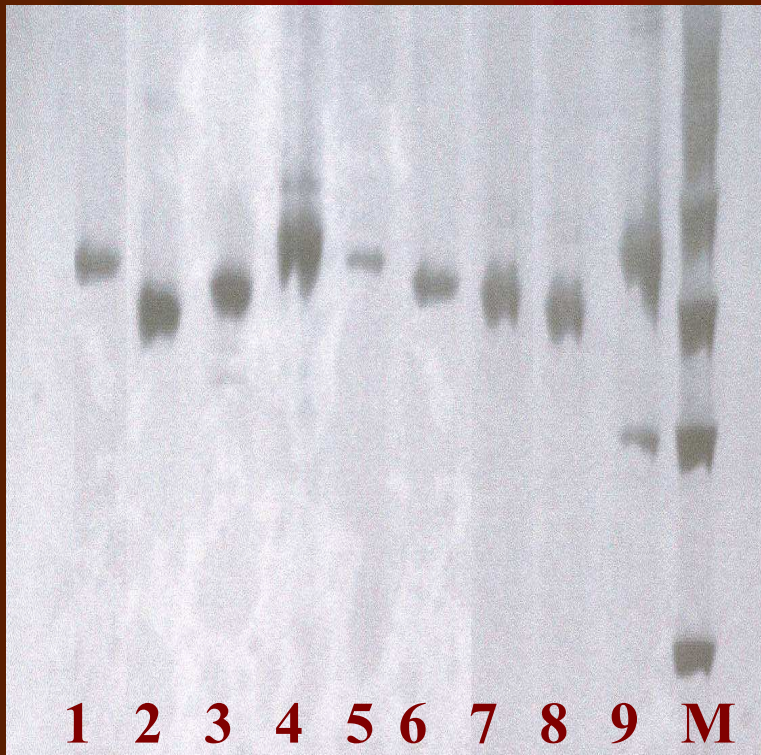
↓ RT

↓ PCR



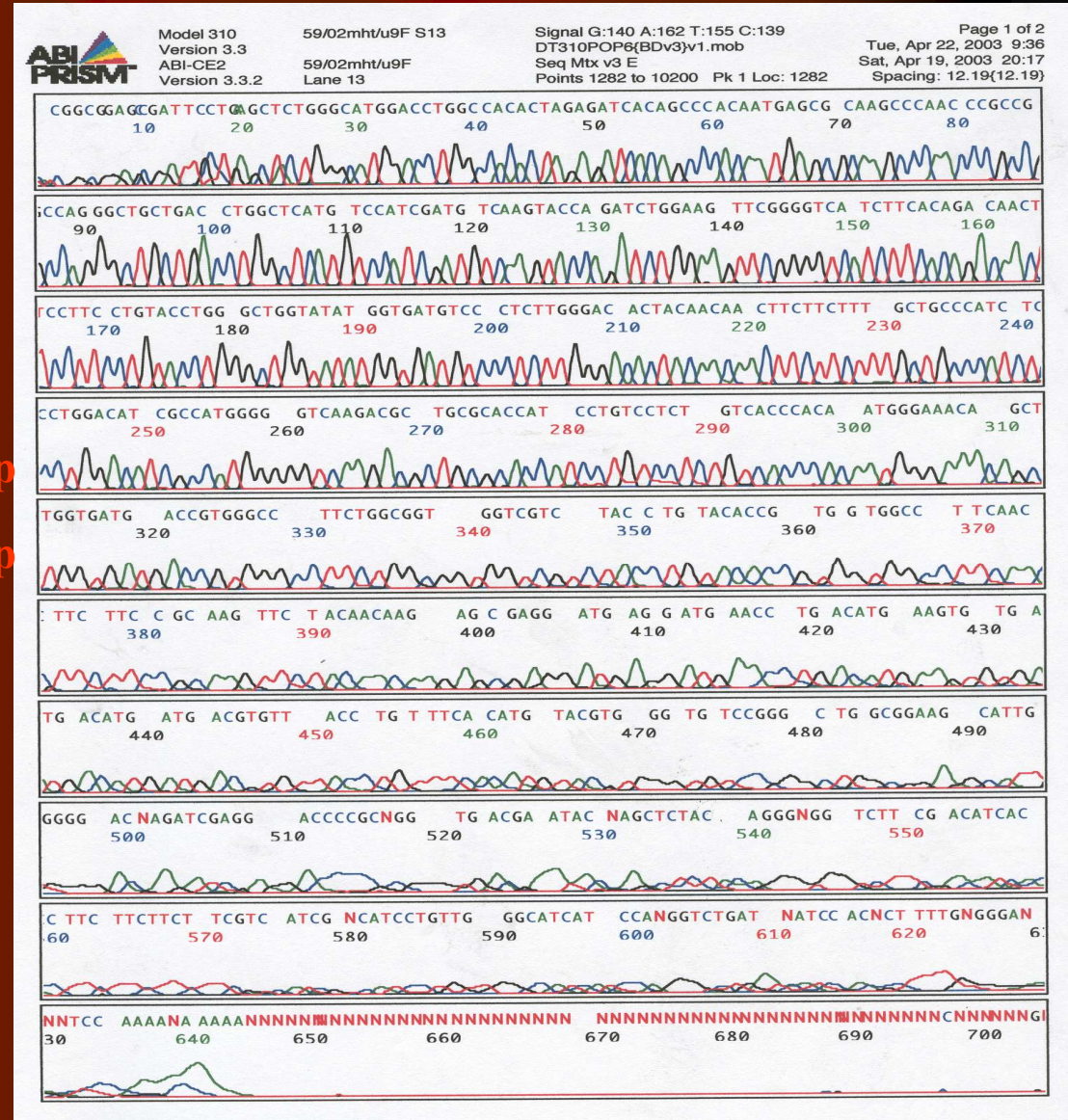
1 - 9 cDNA fragmenty
délky 600 -700bp

↓
sekvenování



**Electroforeza PCR produktu
RYR1 cDNA segmentu 1-9**
5% PAG, silver stained
weight marker 100 bp DNA Ladder

700bp
600bp



Chromatogram cDNA segment 9 (670 bp)

Kdy je nalezená mutace kauzální ?

- nutný nálezn alespoň 2 rodokmenů (nepříbuzných MH vnímavých rodin) s danou mutací, mutace musí být potvrzena u více než 1 člena dané rodiny
- negativní nálezn u 100 MHN jedinců pokrevně nepříbuzných (vyloučení polymorfizmu)

Národní centrum pro diagnostiku MH (NCDMH) v Brně

- ARO FN Brno
- ARK USA
- OLG FN Brno

- vyhledávání a databáze rizikových rodin
(99 k 15.6. 2004)
- diagnostika MH

Farmakogenomika

Cíle:

- vytvoření farmakogenomického profilu každého jednotlivce na základě užití husté mapy SNP (zkrácený profil SNP) pro každého jedince
- predikce nežádoucích účinků na léky
- předpověď účinnosti medikace před podáním léku

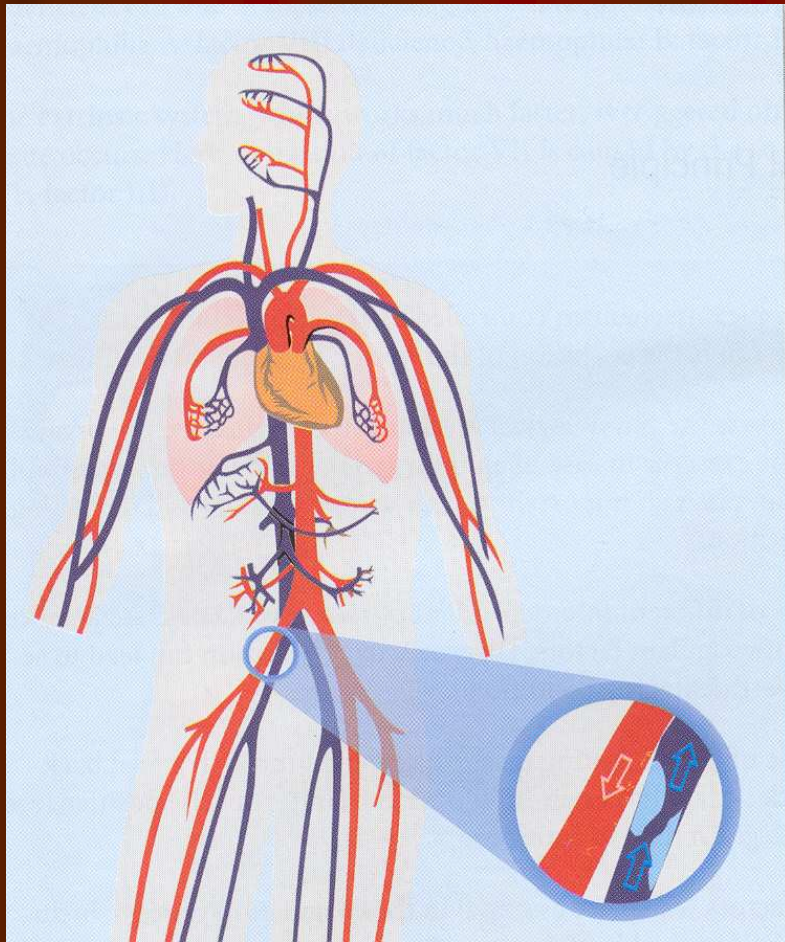
Mutace a poruchy srážlivosti krve

**Tromboembolická nemoc a
genetické rizikové faktory**

Tromboembolická nemoc (trombofilie)

- **vrozená či získaná porucha hemostatického mechanismu – příčina vzniku trombóz (venózní či arteriální)**
- **patří mezi nejčastější příčiny úmrtí**
- **incidence 1 – 5 případů /1000 osob ročně**
- **/trombofilie x hemofilie/**

Klinické symptomy



- ▶ **vznik žilní trombozy do 45 let, arteriální do 35 let**
- ▶ **opakované či atypické trombózy**
- ▶ **hypertenze v těhotenství**
- ▶ **infarkt placenty - potraty**

Žilní tromboembolismus

- Vnější faktory

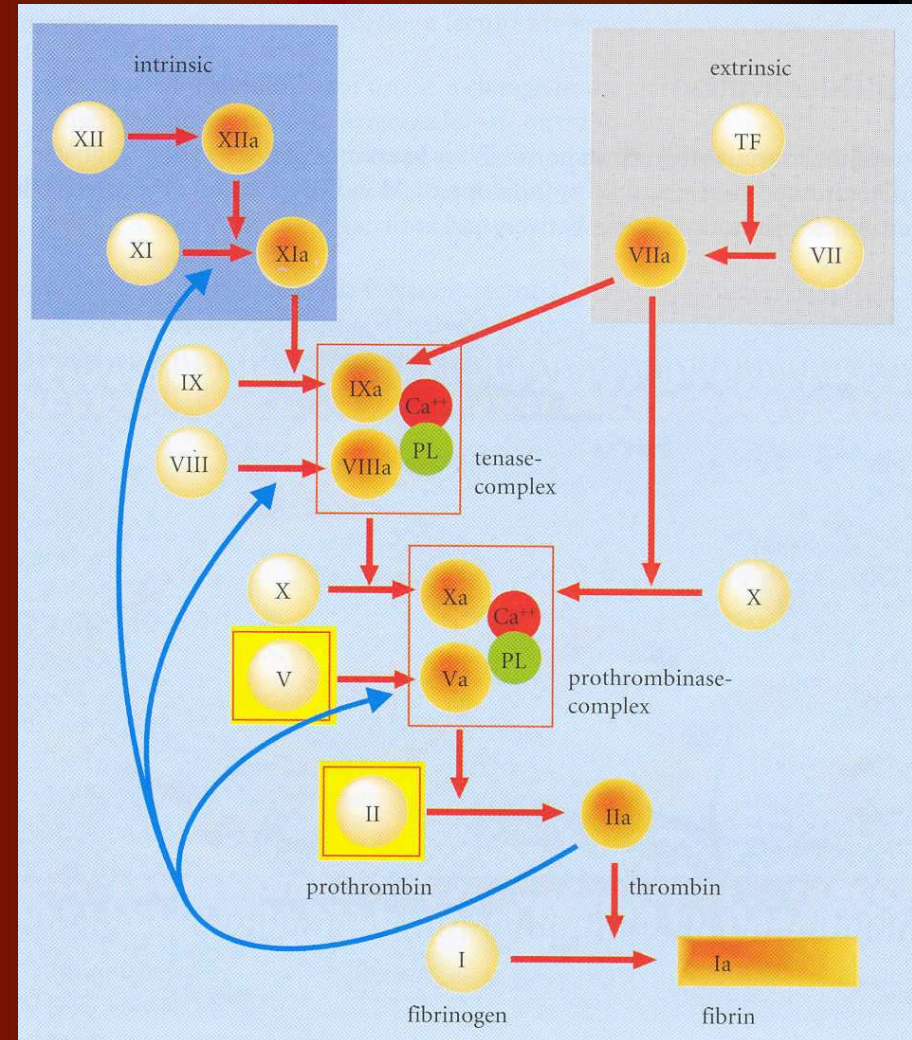
- *kouření*
- *úrazy*
- *chirurgický zákrok*
- *hormonální antikoncepce*
- *obezita*
- *imobilizace*
- *nedostatek pohybu*

- Vrozená predispozice

- *Leidenská mutace*
(mutace v genu koagulačního faktoru V)
- *mutace v genu pro protrombin*
(faktor II)

Koagulace krve

- koagulace –fyziologický mechanismus chráníci organismus před ztrátou krve
- komplexní mechanismus kontrolovaný různými skupinami plazmaproteinů (30)
- proces vyžadující **jemnou rovnováhu mezi koagulačními a antikoagulačními faktory**
- zpětnovazebný systém



Gen pro faktor V

- Genetická mapa: 1q23
- Leidenská mutace: Exon 10
- Bodová mutace G1691A, AD typ dědičnosti
- **Substituce Arg506(CGA) to Gln(CAA)**
- Faktor V (proakcelerin) – plazmatický protein 2196 AMK
– prekurzor kofaktoru Va – **syntéza trombinu** –
koagulace
- mutovaný faktor Va není správně inaktivován proteinem C (tzv. APC rezistence) !!!

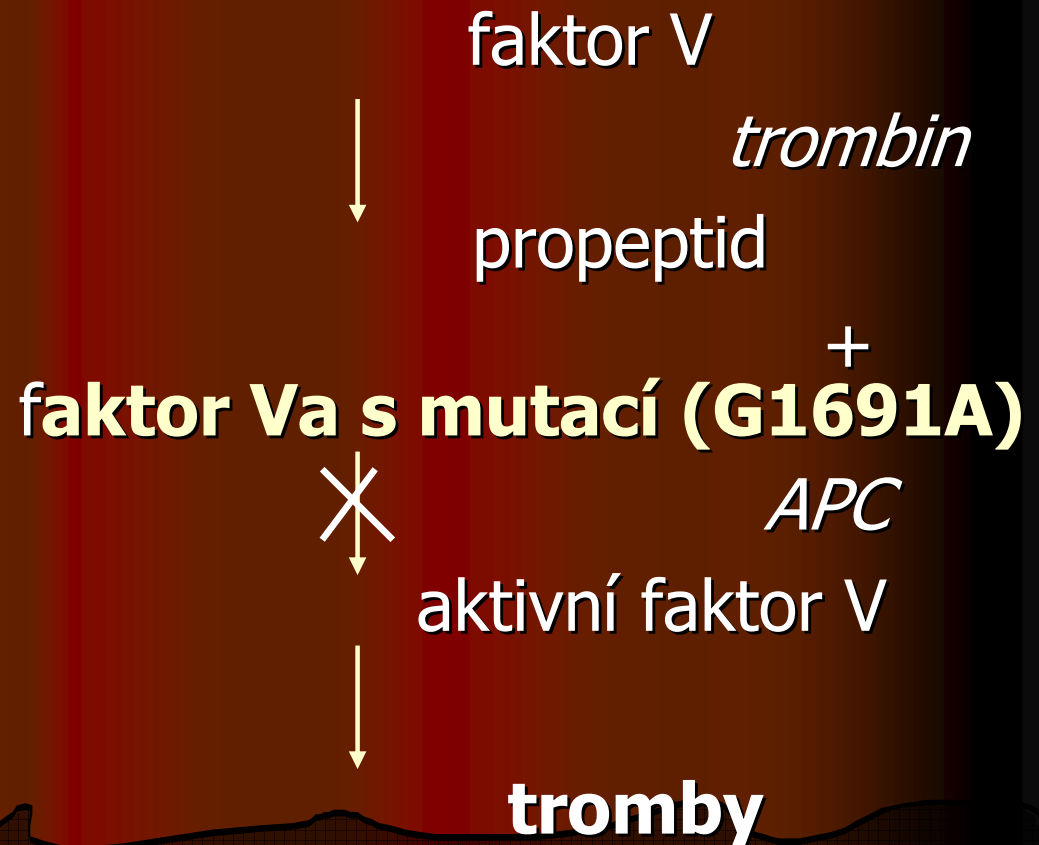
Funkce faktoru V v procesu krevního srážení

Proces krevního srážení

A) fyziologický proces



B) patologický proces



Přehled výskytu Leidenské mutace v některých populacích

● Řecko	13%	
● Švédsko	11%	
● Francie	10%	
● V. Británie	9%	
● Německo	9%	
● Holandsko	5%	
● Polsko	5%	ČR – 5,7 % !!!
● Argentina	5,1%	
● Venezuela	2,4%	
● Costa Rica	2%	
● Indie	1,3%	
● Čína	vzácně	
● Čenošská populace	nedetekováno	
● Japonsko	nedetekováno	

Riziko trombózy u nosičů 1691A mutace

- riziko vzniku trombózy u nosičů mutantní alely se zvyšuje oproti normálnímu genotypu **5 – 10x u heterozygotů** a **50 – 100x u homozygotů**
- u nosičů mutací jsou trombotické epizody často vyvolány: těhotenstvím, užíváním horm. antikoncepce, traumatem, chir. zákrokem, kouřením
- riziko trombózy při užívání horm. antikoncepce je u heterozygotů **28 – 35 x vyšší !!!**

Mutace v genu pro protrombin

- substituce G na A (G20210A)
- frekvence v ČR 2,3 %
- u nosičů mutantní alely stoupá riziko trombózy 2 – 6 x

Pokud je žena nosičkou mutantní alely faktoru V, zároveň nese mutaci pro protrombin a užívá hormonální antikoncepci – **riziko trombózy je 149x vyšší !!!**

Interakce dvou mutantních alel a jednoho vnějšího faktoru !!!

Metody pro detekci LM

- RFLP - restriční enzym MnlI
- SSCP
- detekční kit „Factor V Gene Mutation Assay“
- Real Time PCR (LightCycler)

Stanovení přenašečů Leidenské mutace v Brně

Oddělení klinické hematologie FN
Brno - Bohunice



Příklady

Onemocnění galaktosemie se dědí jako autozomálně recesivní znak. Zdravá dvojice má postižené dítě. Jaká je pravděpodobnost, že nastanou následující situace:

- A) následující dvě děti budou mít galaktosemii
- B) otec dítěte s galaktosemií je heterozygotem ve sledovaném znaku
- C) dítě, které má zdravá sestra nemocného je heterozygotem ve sledovaném znaku
- D) jakýkoliv potomek bude nemocný
- E) nevyskytne se žádný nemocný potomek u 3 následujících dětí
- F) jakékoli dítě bude dívka s galaktosemií, zdravý chlapec ?