

# Srpkovitá anemie

Lidé v Africe jsou ohroženi řadou nemocí, s kterými se v našich končinách nesetkáváme.

Vedle malárie, spavé nemoci, eboly a dalších je to i srpkovitá anémie.

V Ugandě je touto dědičnou chorobou nakaženo tři čtvrtě milionu lidí.

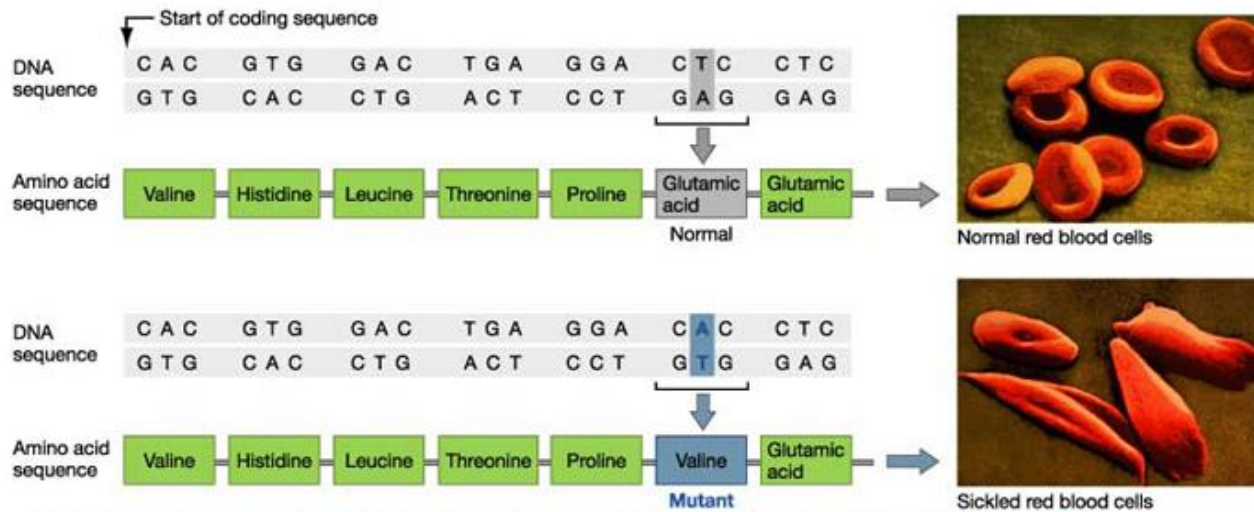
Málokdo se dožije více než 25 let.

- Nemoc je diagnostikována pomocí krevních testů, které v Ugandě provádí jen několik nemocnic.
- Dědí se autosomálně recesivně
- U mužů a žen je stejná pravděpodobnost projevu choroby, přesto lidé na vesnicích věří, že dítě získává onemocnění od matky. Nezřídka je to důvodem rozvodu ze strany otce.
- Ugandané se bohužel často obrací o pomoc na tradiční léčitele a šamany.  
Pouhá bylinná terapie zdravotní stav při tomto onemocnění nezlepší.
- V České nemocnici slouží nemocným specializovaná ambulance pro onemocnění srpkovitou anémií.
- Každý měsíc je v nemocnici hospitalizováno 5 - 8 pacientů v kritickém stavu způsobeném srpkovitou anémií.

# Srpkovitá anemie

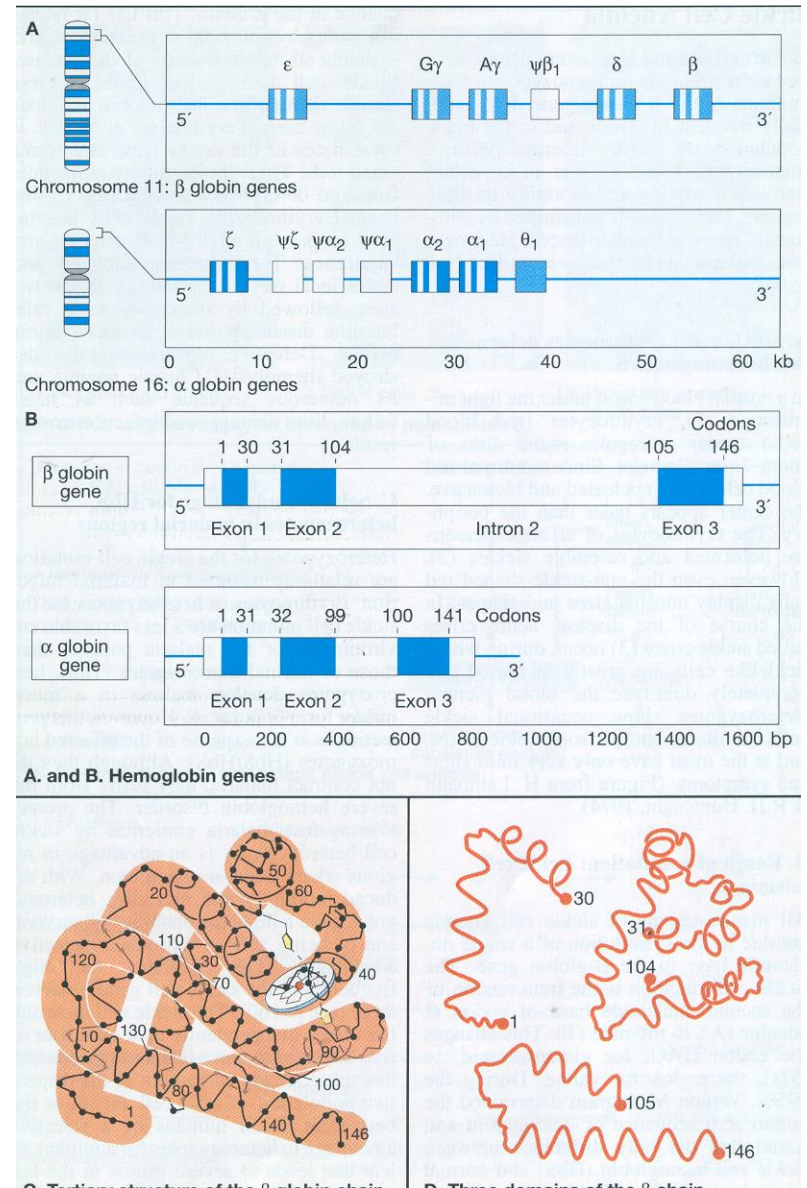
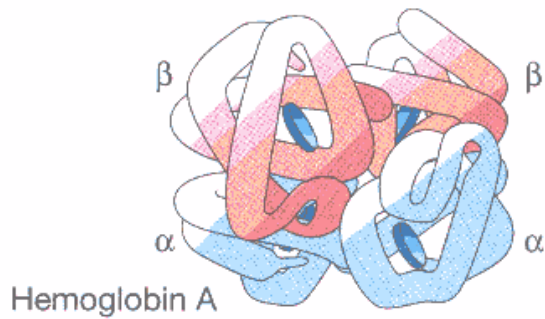
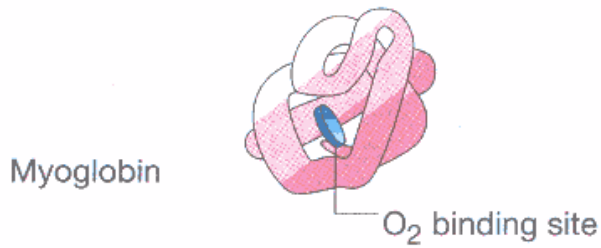
dědičné onemocnění, která se projevuje změnou tvaru červených krvinek z tzv. promáčknutých piškotů na protažené srpky.

Tato změna tvaru je způsobená mutací genu pro hemoglobin, při níž je na 6. pozici v  $\beta$ -řetězci valin místo glutamové kyseliny (vzniká hemoglobin označovaný jako „HbS“).



**The change in amino acid sequence causes hemoglobin molecules to crystallize when oxygen levels in the blood are low. As a result, red blood cells sickle and get stuck in small blood vessels.**

The haemoglobin molecule is a tetramer with two alpha subunits and two beta subunits. The mutation occurs in the beta subunit when a valine(V) replaces glutamate(E) in position 6 of the beta subunit, the replacement is referred to as Glu6Val<sup>1</sup>. In those who show symptoms of sickle cell anaemia, on the beta globin chain in the sixth amino acid position the base A, which is the second codon for the amino acid, is swapped with a T during transcription of the DNA duplex, causing an A-T → T-A transgression



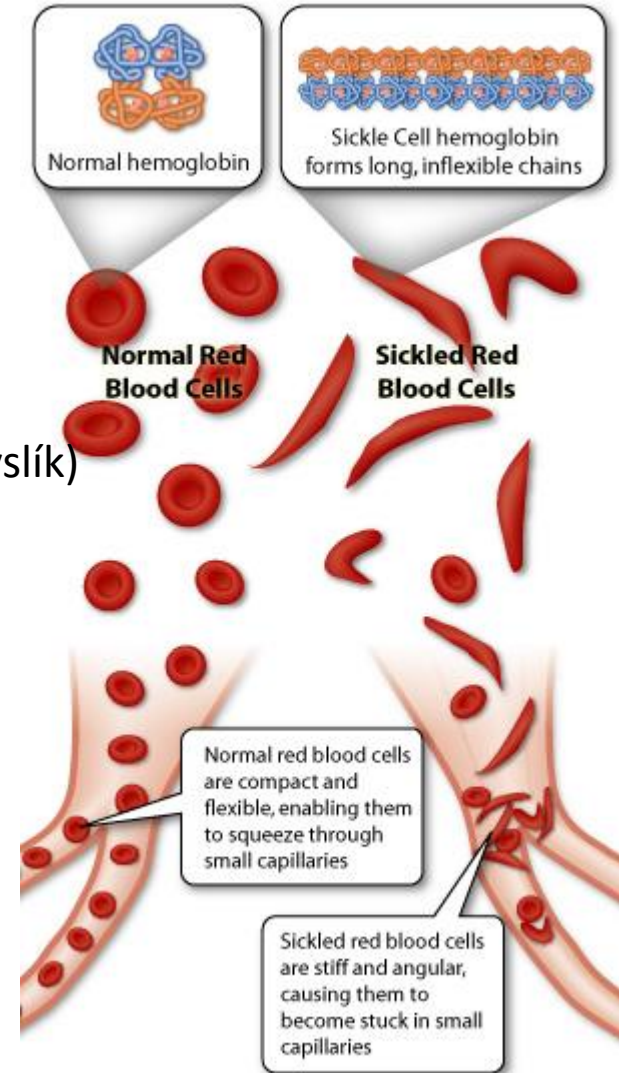
# Srpkovitá anemie

## Glu6Val

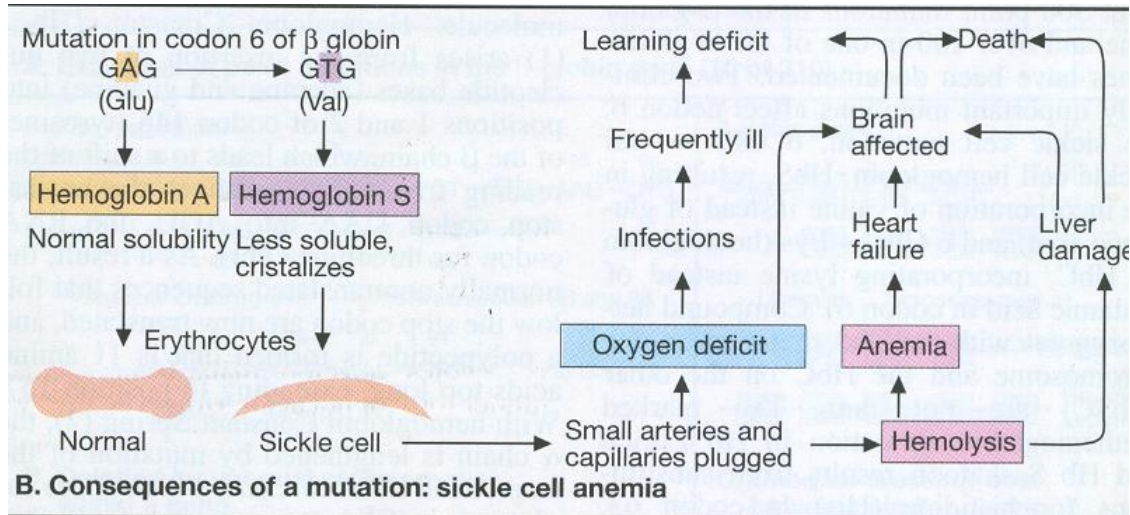
Valin je hydrofobní aminokyselina, glutamová kyselina je hydrofilní.

Vzniklá molekula HbS vykazuje odlišné vlastnosti a ve své deoxygenované podobě (tzn. když není navázán kyslík) se molekuly hemoglobinu shlukují a deformují krvinku.

To snižuje flexibilitu buňky a má za následek mnoho různých komplikací.



# Srpkovitá anemie

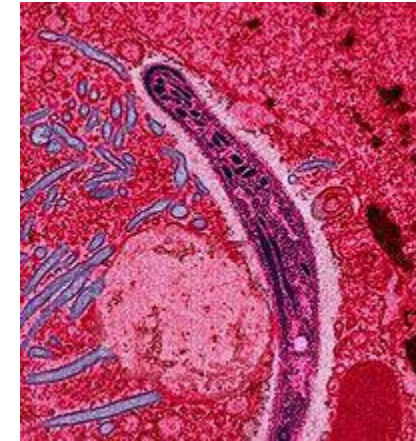
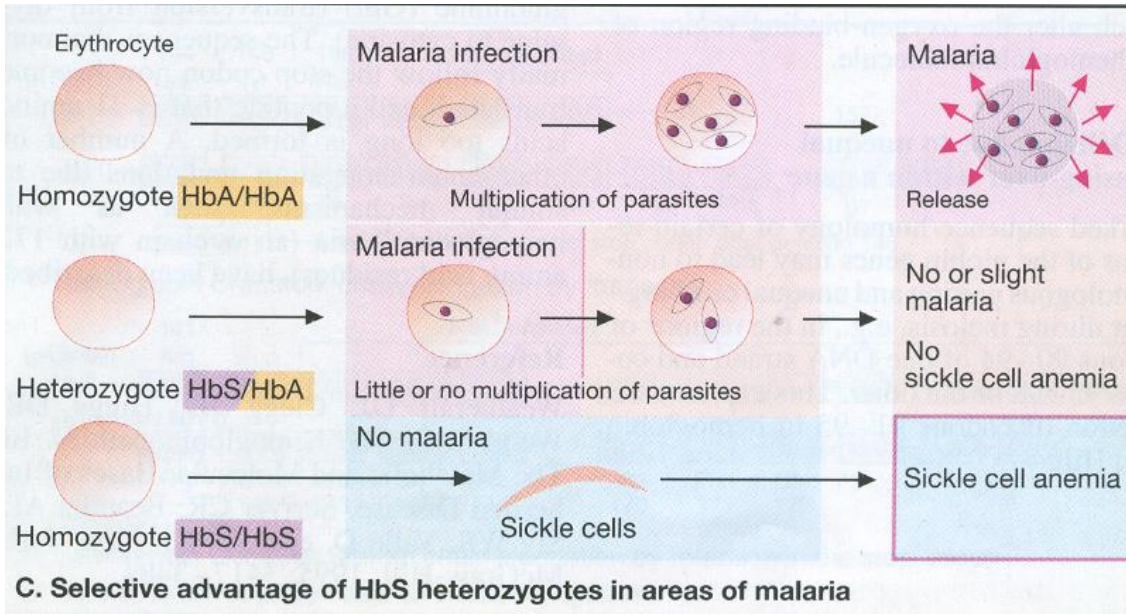


- **frekventovaná v Africe a černé populaci severní Ameriky**

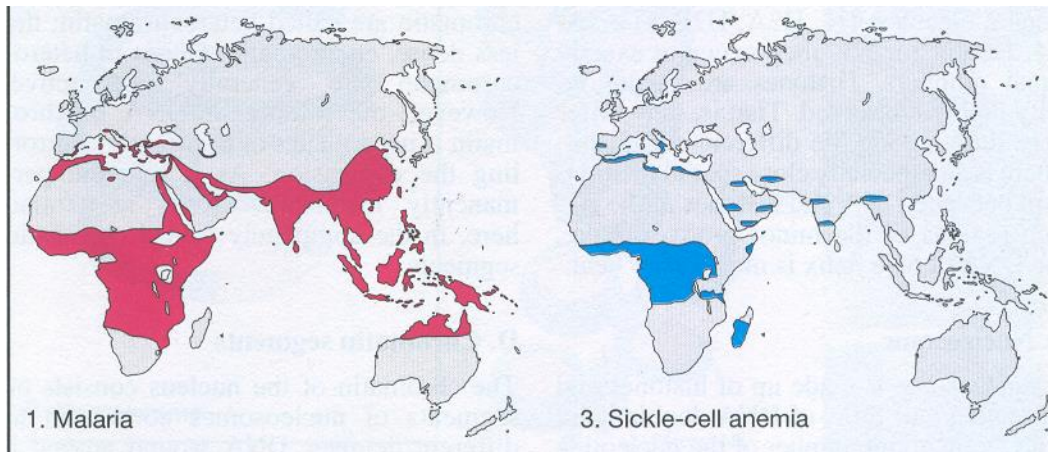
**1: 500**

- **autozomálně recesivní dědičnost**

# Srpkovitá anemie



Doména: [Eukaryota](#)  
 Říše: [Chromalveolata](#)  
 Nadkmen: [Alveolata](#)  
 Kmen: [výtrusovci](#) (Apicomplexa)  
 Třída: [krvinkovky](#) (Haematozoa)  
 Řád: [Haemosporida](#)  
 Čeleď: [Plasmodiidae](#)  
 Rod: *Plasmodium*



# Srpkovitá anemie

## molekulární diagnostika

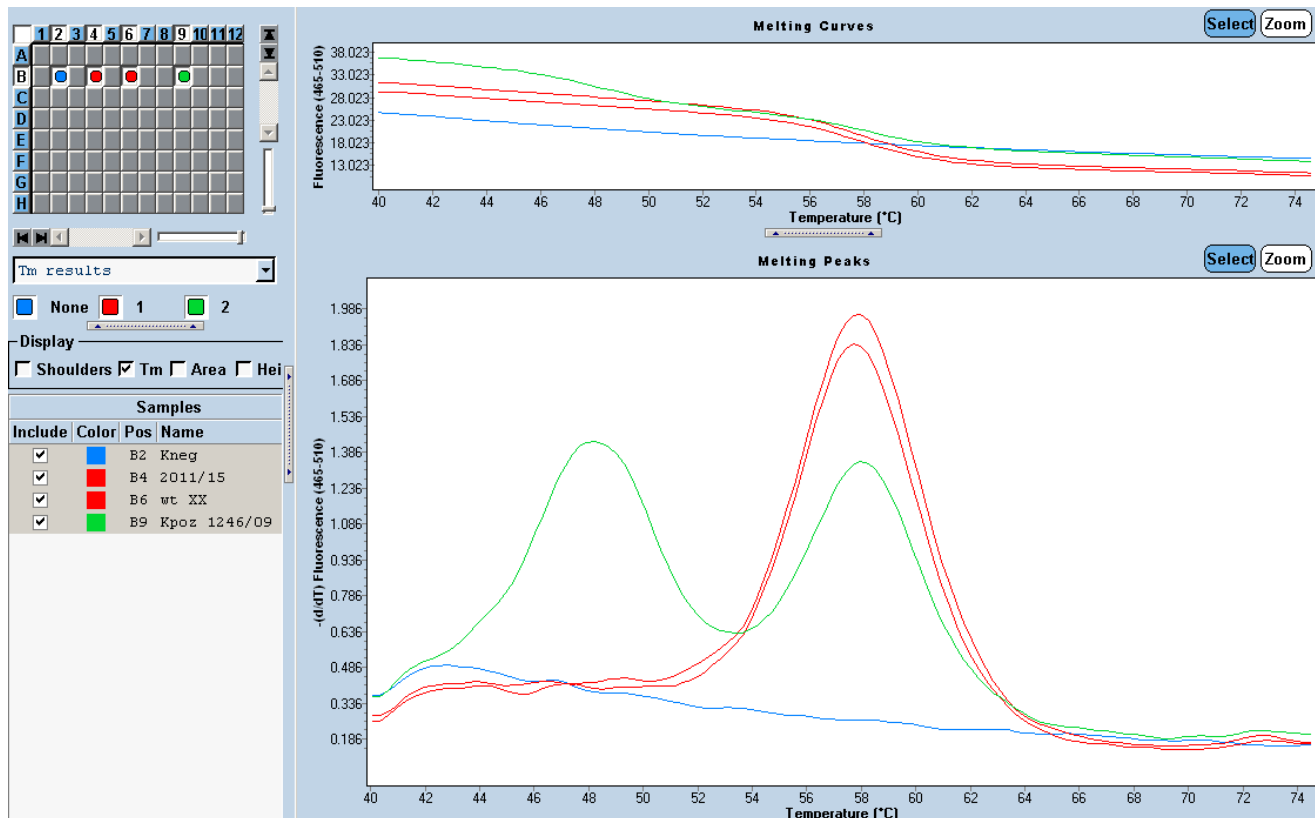
PCR amplifikace s následným restričním štěpením



# Srpkovitá anemie

## molekulární diagnostika

scoring Glu6Val v genu Hb $\beta$  metodou melting curve genotyping na High Resolution Melting (HRM) na platformě LightCycler<sup>®</sup> 480 System pomocí LightSNiP assay.





# Myotonická dystrofie typu 1

## **autozomálně dominantní neuromuskulární choroba**

vrozené onemocnění svalstva příčně pruhovaného, ale i hladkého a srdečního

## **polysystémová manifestace**

mohou se objevit i patologické nálezy na dalších orgánových systémech, u více postižených jedinců v průběhu onemocnění snížený intelekt, postižení srdce, očí (šedý zákal) a žláz s vnitřní sekrecí, například cukrovka nebo atrofie pohlavních orgánů.

## **progrese nemoci je poměrně pomalá,**

často dochází ke komplikacím srdečním onemocněním, slabost někdy vede (až ve vyšším věku) k upoutání na vozík.

## **nejčastější forma svalové dystrofie**

postiženo je asi 1 dítě z 8 tisíc živě narozených

## **klinicky extrémně variabilní**

příznaky onemocnění jsou různě závažné  
platí, že v každé další generaci je onemocnění závažnější.

# Myotonická dystrofie typu 1

**patří mezi onemocnění TREDs**

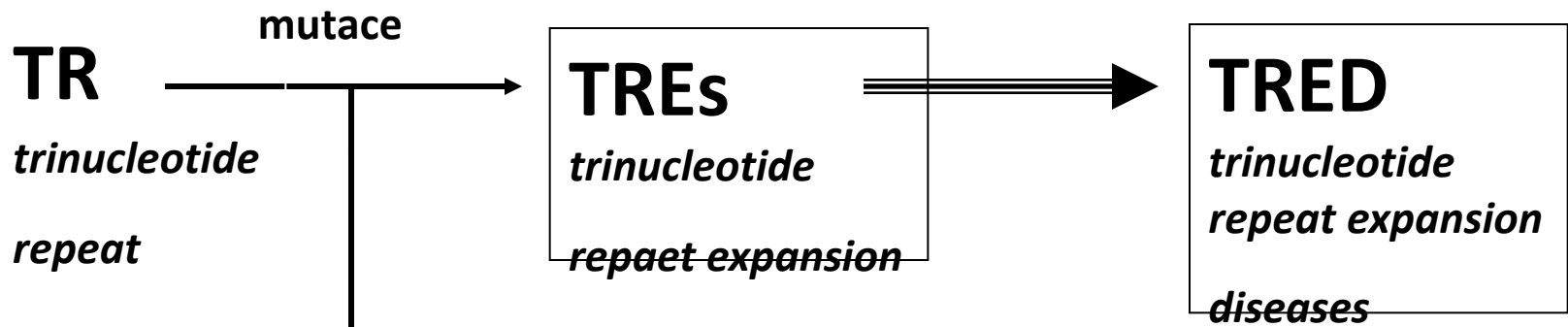
Trinucleotide repeat expansion diseases



**příčina**

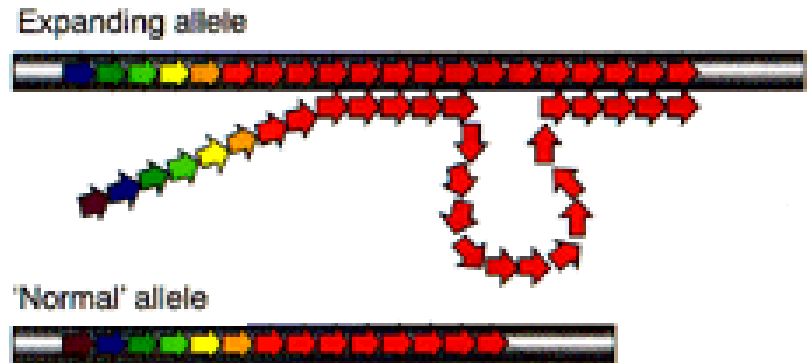
**expandované trinukleotidové repetice (TREs)**

Expanze trinukleotidových repetit



**expanze**

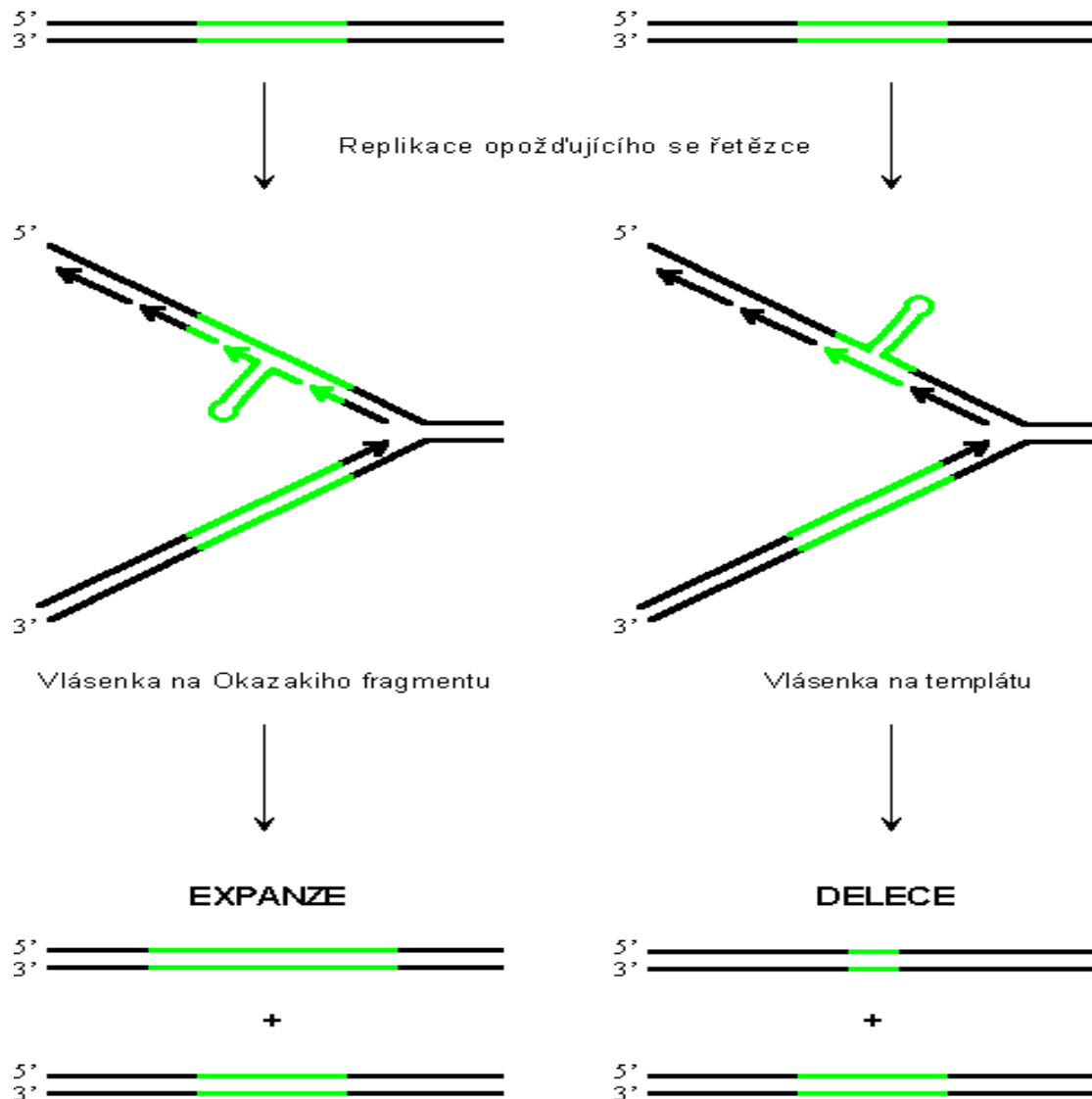
nový typ mutace, popsán 1991



# TR - trinukleotidové repetice

- široce rozšířeny v lidském genomu
  - \* v intronech
  - \* v exonech
    - v překládaných oblastech - uvnitř čtecích rámců
    - v nepřekládaných oblastech
- nestabilita, závisící na:
  - \* typu sekvence
  - \* délce repetitivní sekvence

# Expanze a delece trinukleotidů při replikaci



# Rozdělení chorob zapříčiněných expanzí trinukleotidových repetitivních podle lokalizace TREs

## 1 TR lokalizovány uvnitř ORF

→ expanzí narušená struktura proteinů  
(Huntingtonova chorea)

## 2 TR lokalizovány vně ORF - v 3'UTR nebo 5'UTR

- v intronech

→ patrně inaktivují nebo ovlivňují expresi genu  
(Myotonická dystrofie)

# Přehled a základní charakteristika některých chorob asociovaných s expanzí trinukleotidů

Choroba	Dědičnost	Frekvence	Popis	Lokus	Gen	Protein	Pozice expanze	Sekvence trinukleotidu	Počet opakování		Původ nestability
									normální	patologické	
Fragilní X (FRAX-A)	XD	1/2500	mentální retardace	Xq27.3	FMR-1 (FRAXA)	RNA binding	5'UTR	CGG	5 až 54	200 až 4000	M
Hungtigtonova chorea	AD	1/5000 až 15000	demence	4p16.3	IT15	huntigtin	ORF	CAG	11 až 34	35 až 121	P
Myotonická dystrofie 1	AD	1/8000	svalová slabost	14q13.3	DMPK	proteinkináza	3'UTR	CTG	5 až 35	50 až 2000	M
Kenedyho choroba	XR	1/50 000	atrofie svalů	Xq11	AR	androgen. receptor	ORF	CAG	12 až 34	40 až 62	P
Spinicelebrální ataxie 1	AD		postižení míšních provazců a mozečku	6p22	SCA1	ataxin 1	ORF	CAG	6 až 39	40 až 80	P



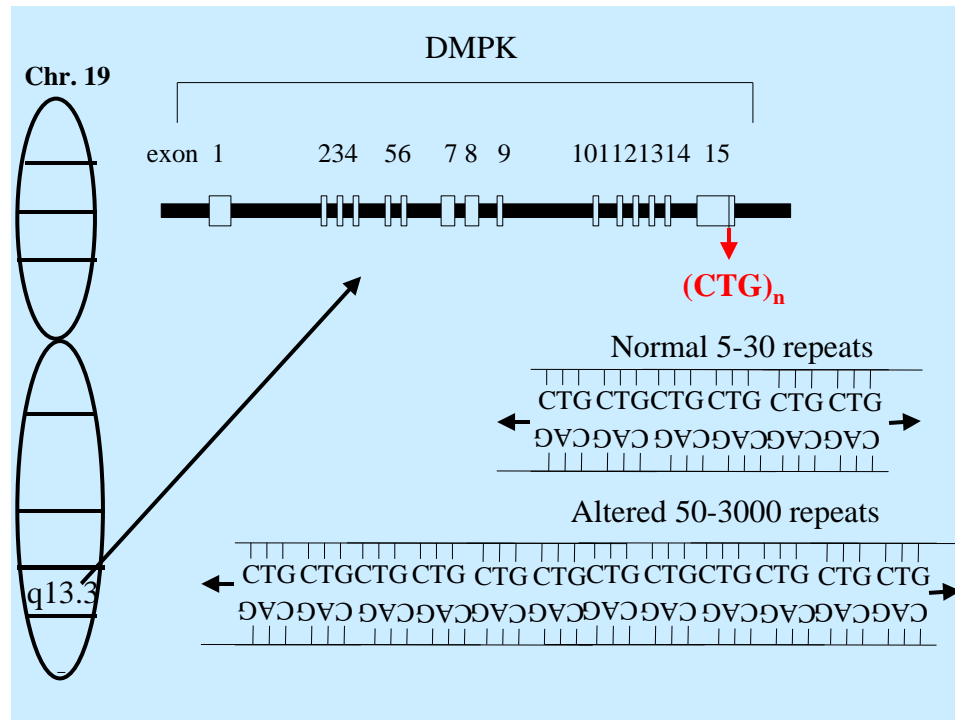
# Myotonická dystrofie typu 1

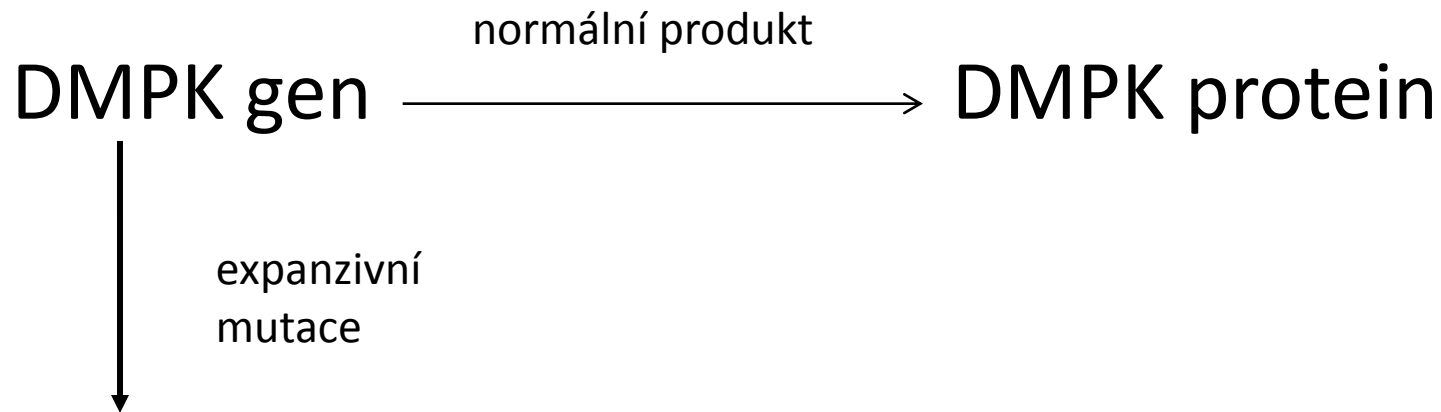
expanze trinukleotidu CTG

ve 3' UTR (3' untranslated region)

genu DMPK (myotonic dystrophy protein kinase gene).

lokus 19q13.3





## neovlivněná funkce DMPK proteinu

vznik patologického fenotypu neobjasněn

pravděpodobné příčiny vzniku MD:

- narušený transport a úprava mRNA
- narušení struktury chromatinu expandovaným repetitivním traktem  $\rightarrow$  porucha exprese genů lokalizovaných v okolí genu DMPK
- vysycení DNA vazebných proteinů  $\rightarrow$  narušení funkce genů v okolí genu DMPK

# Alely genu DMPK

## **Normální alela**

**5 - 35 CTG repetice      stabilní z generace na generaci**

## **Premutantní alela**

**35 – 49 CTG repetice      může expandovat během gametogeneze,  
transmise alely s delší trinukleotidovou  
repetice než má rodič**

## **Mutantní alela**

**50 a více CTG repetice      asociováno s manifestací choroby  
u 100% jedinců s MD1**

# Klinická anticipace

spojená s expanzivním prodlužováním  
trinukleotidových repetit



asymptomatický prarodič  
(MD1 : 5 - 50 CTG repetit)



rodič s mírným klinickým projevem  
(MD1: 100 CTG repetit)



potomek s těžkým průběhem choroby  
(MD: 1500 CTG repetit)



# Korelace genotypu a fenotypu u MD1

	premutace	klinická forma myotonické dystrofie		
		mírná	klasická	neonatální
počet CTG trinukleotidů	35 - cca. 49	50 - cca. 150	100 - 1000 až 1500	1000 až cca. 3000
propuknutí choroby ve věku	-	21 - 40 let	11 - 20 let	od narození do cca. 10 let
průměrná délka života	normální	64 let	48 - 55 let	přežije neonatální období až do 45 let
klinické projevy	žádné postižení vyjímečně katarakta	katarakta  mírná myotonie	svalová slabost  myotonie katarakta  předčasné srdeční aritmie postižení endokrinního systému další	těžká hypotonie  respirační problémy postižení srdce  mentální retardace další typický výraz obličeje "maska"

# Kongenitální MD (CMD)

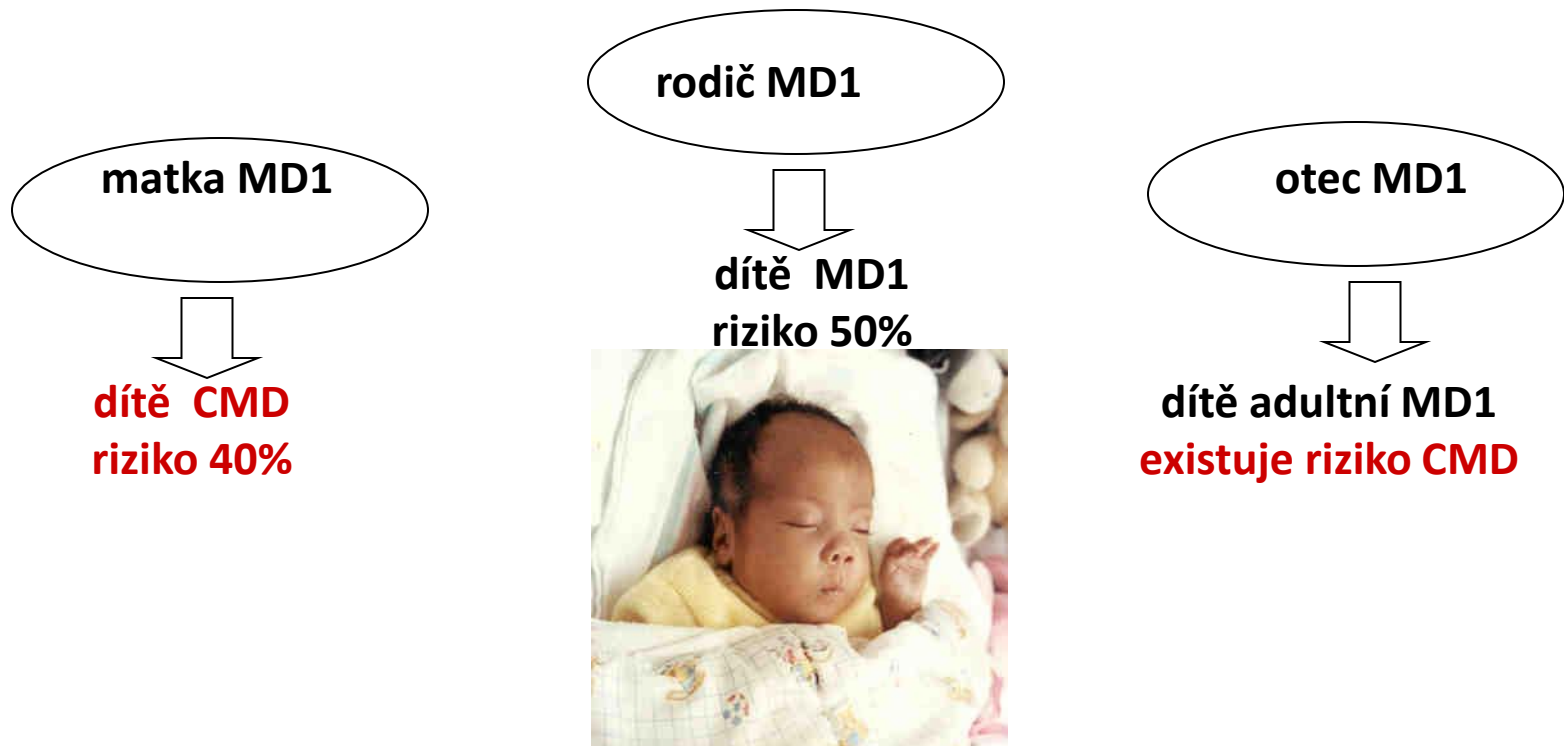
CMD je považována za subtyp MD,  
ale symptomy a rozvoj choroby je odlišný od MD

- ochablost svalstva
  - těžká hypotonie
  - obličejová ochablost
  - respirační problémy
  - postižení srdce
  - mentální retardace
  - strabismus
- neprojevuje se myotonie  
katarakta      rozvíjí se později



# Kongenitální MD (CMD)

- nejzávažnější forma MD
- popsána pouze u MD typu 1
- dědí se převážně maternální cestou
- popsány případy CMD po přenosu expandované alely od otce



# Pohlavím ovlivněné efekty na transmisi CMD

expandované alely se dědí od otce i od matky



nestabilita alel je převážně maternální



CMD se dědí převážně maternální cestou

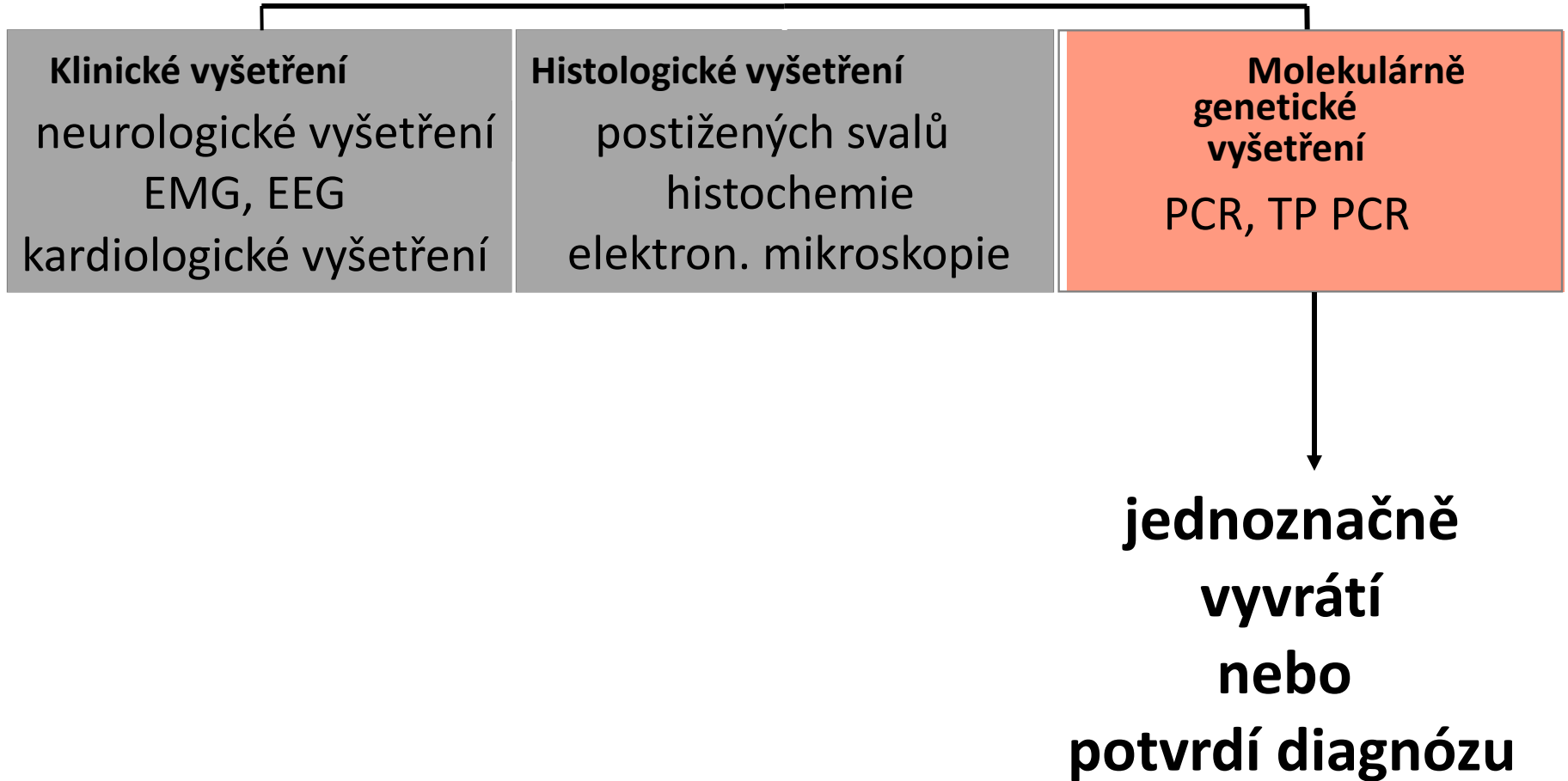


příčina

- snížená fertilita mužů s adultní formou MD1
- kontrakce repetitivního traktu během transmise mužských gamet
- maternální dědičnost abnormalit mitochondriální DNA, která interaguje s produktem genu DMPK
- maternální imprinting
- transplacentární faktory



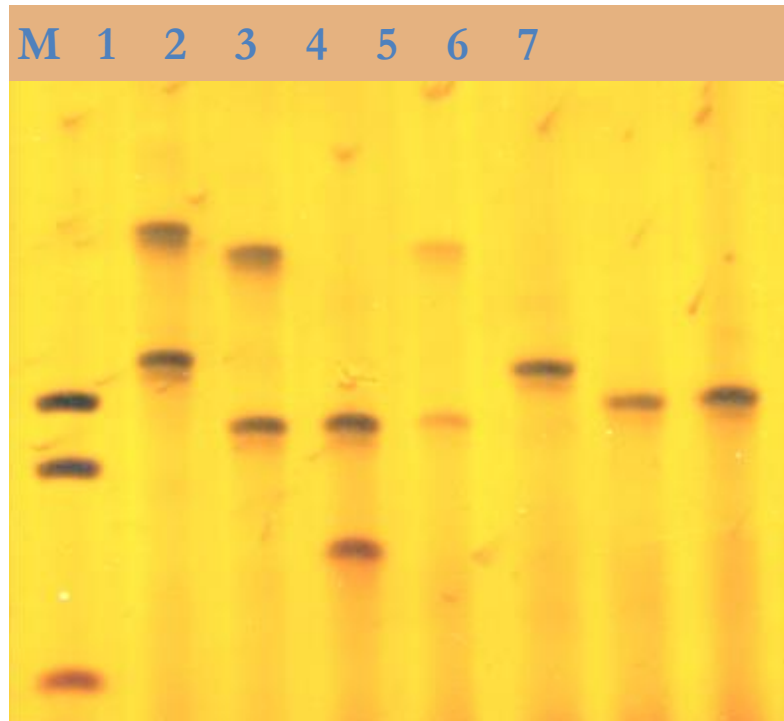
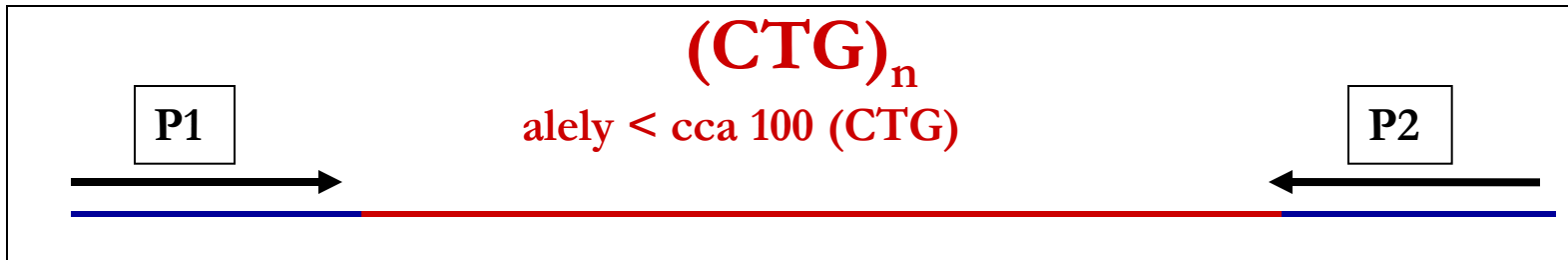
# Diagnostika MD1



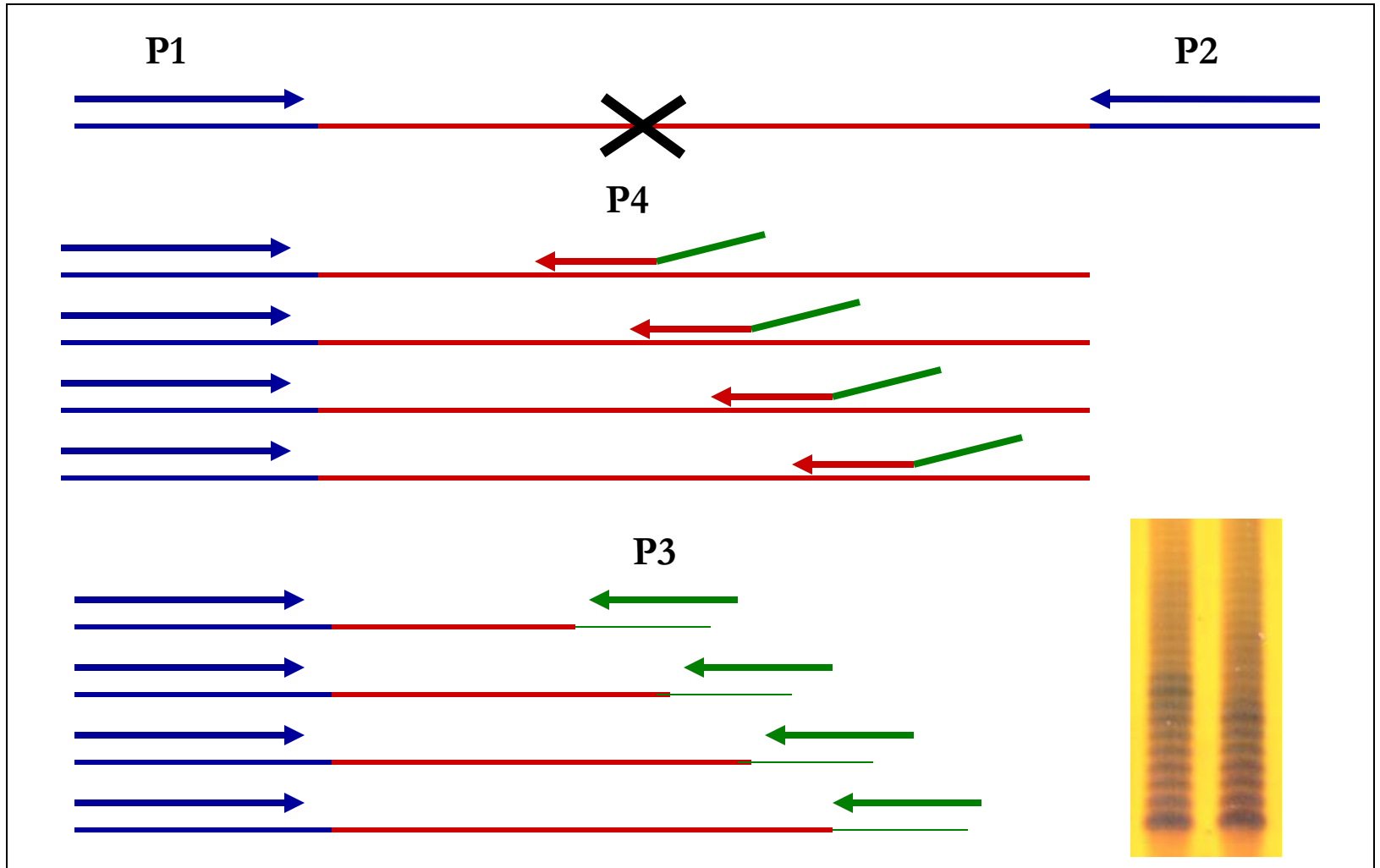
# Diagnostika MD1

- prováděna u členů rodiny se zátěží MD1
- analýza DNA extrahované z fetálních buněk získané
  - amniocentéza (14.-19.tg)
  - biopsie choriových klků (10.-12.tg)
- z lymfocytů periferní krve
- testování přítomnosti expandované alely DMPK
- jednoduchý PCR systém zahrnující 2 PCR reakce

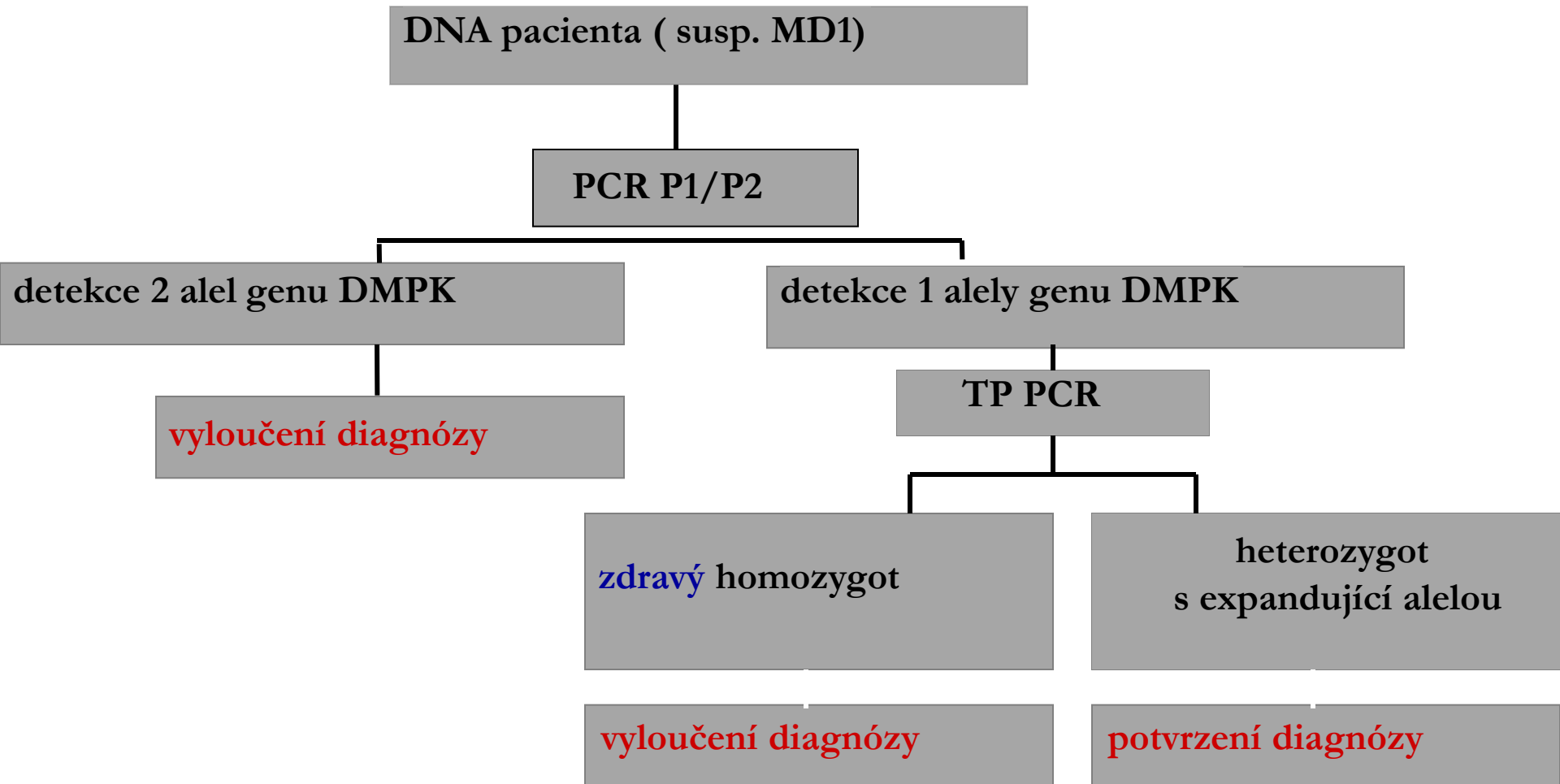
# PCR P1/P2



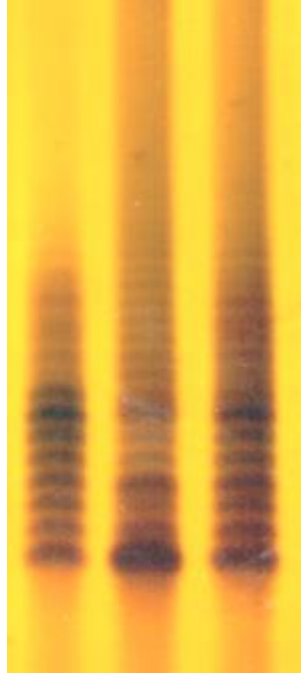
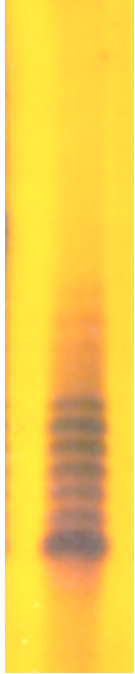
# Triplet Primed PCR



# Strategie molekulárně genetického vyšetření MD1

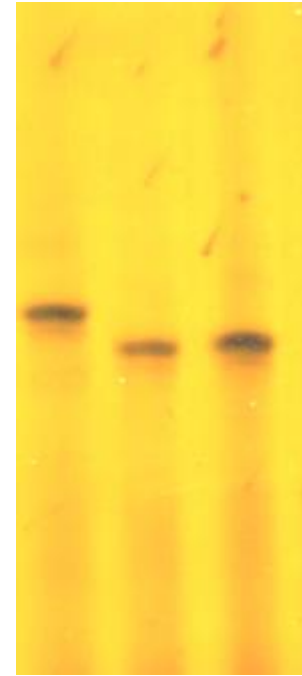


TP PCR

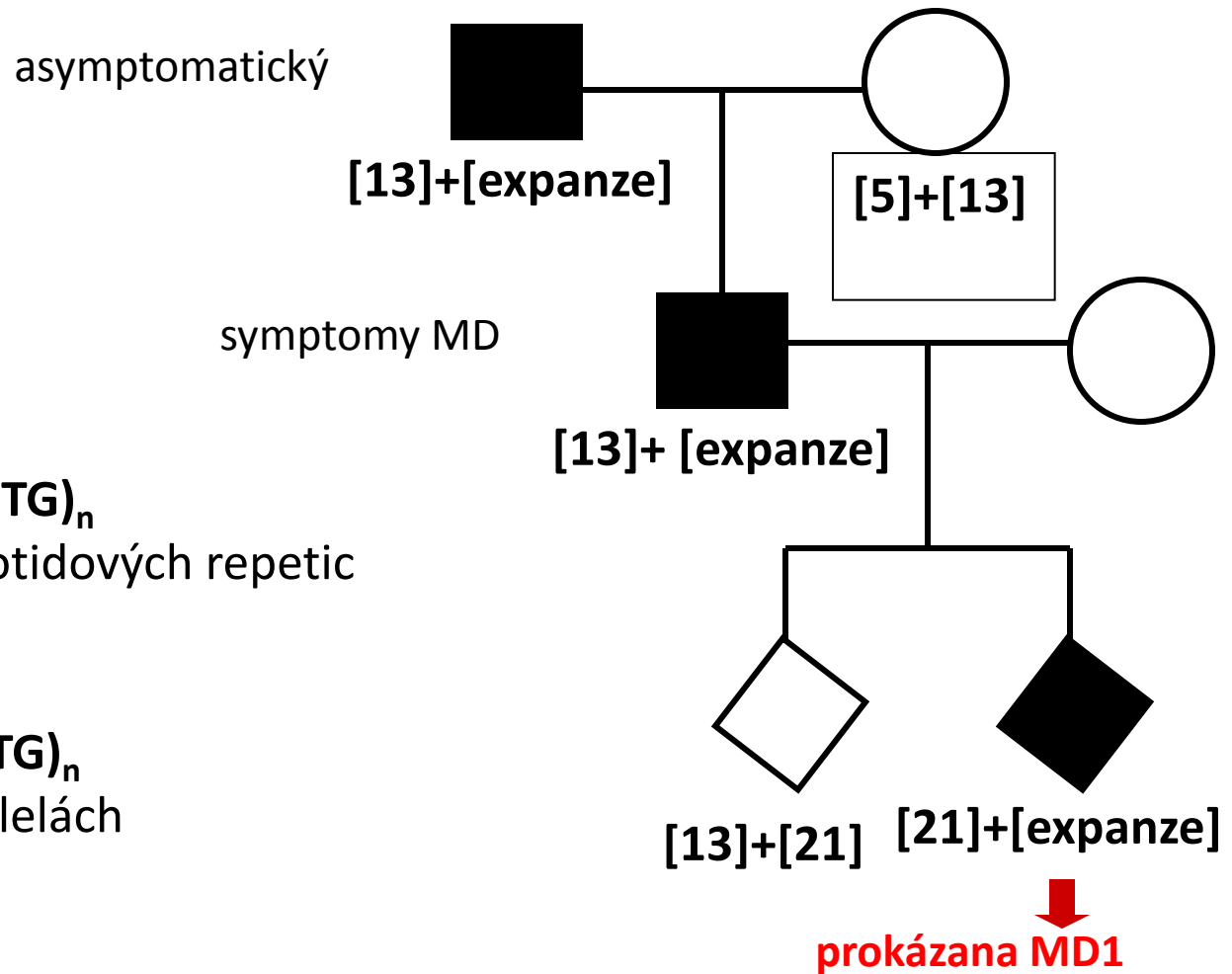


\* \*

PCR ( P1/P2)



# Stanovení dg. MD1 při prenatálním vyšetření

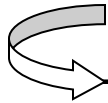


**[13];[expanze]** - genotyp (CTG)<sub>n</sub>  
prokázána expanze trinukleotidových repetit  
na jedné alele genu DMPK

**[5-13];[13-21]** - genotyp (CTG)<sub>n</sub>  
velikost repetit je na obou alelách  
ve fyziologickém rozhraní

# Průkaz expanze CTG repetice v genu DMPK metodou TP-PCR

- **nemůže být stanoven věk nástupu nemoci a její závažnost**



**expanze CTG repeticí asociována se 3 fenotypy**  
**-možnost somatického mozaicismu**



- **přesné určení délky expanze: 730-1000 a více repetic**  
velmi pravděpodobná asociace s CMD
- **ultrazvukové vyšetření ve 2. a 3. trimestru může odhalit CMD:**
  - zmenšený fetální pohyb
  - polyhydroamnion



# Myotonická dystrofie typu 1

## Léčba

Příčinná léčba nemoci není, je možné pouze zmírnit některé příznaky.

Vhodná je pravidelná rehabilitace.

Myotonie se může zmírnit podáváním některých léků.

Poruchy srdečního rytmu lze řešit buď léky, nebo implantací pacemakeru

V případě endokrinopatie je možná substituce některých hormonů.

Případnou kataraktu (šedý zákal) lze operovat.

# Huntingtonova choroba též Huntingtonova chorea (HD – Huntington's Disease)

Je porucha poprvé popsaná v roce 1872 americkým lékařem *Georgem Huntingtonem*.

Jedná se o neurodegenerativní autosomálně dominantně dědičné onemocnění

patří mezi polyglutaminové poruchy

Má incidenci 4–10 na 100 000.

Manifestuje se nejčastěji ve středním věku.

Mezi příznaky dominuje porucha motoriky, změny osobnosti, progredující demence a nakonec smrt.

# Huntingtonova choroba též Huntingtonova chorea (HD – Huntington's Disease)

Asociována s **genem *HTT*** (objeven v roce 1993).

Gen kóduje protein **huntingtin**.

- Přesná funkce proteinu stále není známa, predominantně je exprimován v CNS.
- Interaguje s řadou transkripčních faktorů, je tedy pravděpodobná jeho významná role při normálním vývoji CNS,
- rovněž byla demonstrována jeho důležitost pro normální průběh mitózy v CNS

# Huntingtonova choroba též Huntingtonova chorea (HD – Huntington's Disease)

## **Příčina onemocnění**

zmnožené opakování tripletů CAG, což je kodon pro glutamin

- normální jedinci nesou ve svém genu 9–35 repetitivních CAG,
- postižení jedinci jich mají více než 40.

Čím je počet repetitivních větších, tím je nástup onemocnění časnější.

**Expandovaná repetitivce** se dědí od postiženého rodiče.

Při přenosu ovšem někdy dochází během replikace před tvorbou gamety k další expanzi této repetitivce.

Může proto nastat situace, kdy má rodič počet repetitivních při **horní hranici normy - premutace**, tj. je zdravý, potomek však získává alelu expandovanou, takže u něj nemoc propukne.

Expanze se u HD objevuje častěji během mužské gametogeneze

což je důvod, proč jsou těžké, časně se objevující formy s počtem repetitivních 70–120 děděny od otce.

Mohou se objevit i **nové mutace** – asi 25 % pacientů má negativní rodinnou anamnézu.

# Huntingtonova choroba též Huntingtonova chorea (HD – Huntington's Disease)

**HD je typickou chorobou s pozdním nástupem (*late onset disease*).**

Většina nositelů mutované alely onemocní okolo 40. roku věku,  
ale vzácně se příznaky mohou objevit prakticky kdykoliv (ve 2 či v 80 letech).

Během přenosu choroby v rodině může docházet k progresi dynamické mutace  
– tedy zmnožení již patologického množství tripletů - **anticipace**.

.

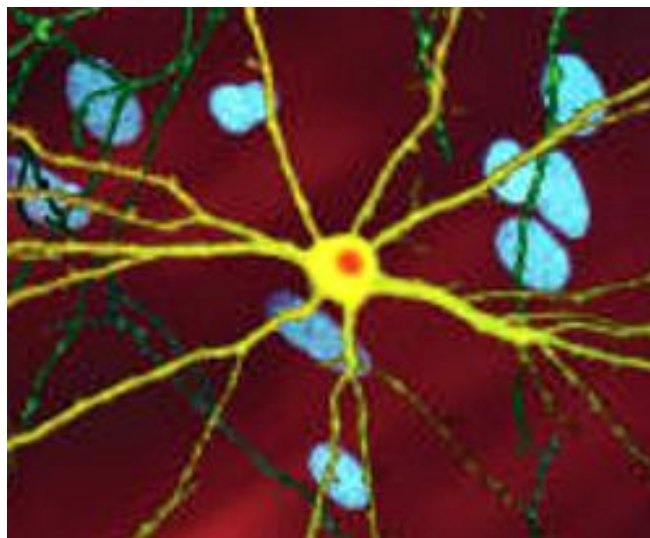
Pacienti trpí: choreou – mimovolnými rychlými pohyby, které postihují různé části těla.  
Objevuje se deprese, psychóza, paranoia a progresivní demence.

Nemoc trvá 10–30 let.

Mezi příčiny smrti patří aspirační pneumonie, následky pádů nebo sebevražda.

# Huntingtonova choroba též Huntingtonova chorea (HD – Huntington's Disease)

HD je charakterizovaná **selektivní ztrátou neuronů** v bazálních gangliích, která se podílí na koordinaci pohybů.



Oranžové inkluzní tělíčko v jádře postiženého neuronu v popředí,  
modrá jádra zdravých neuronů v pozadí

# Huntingtonova choroba též Huntingtonova chorea (HD – Huntington's Disease)



Mechanismus poškození neuronů není zcela jasný.

Uvažuje se

- přetížení neuronů glutamátovou neurotransmisí,
- snížení antiapoptotických účinků normálního huntingtinu
- mitochondriální dysfunkce (pacienti mají nižší metabolickou aktivitu v postižených oblastech).

MRI: mozková atrofie, zejména zmenšení bazálních ganglií,

# Huntingtonova choroba též Huntingtonova chorea (HD – Huntington's Disease)

K dispozici je přímé **genetické testování** na přítomnost expanze v genu *HTT*

- zjištění statutu pacienta v genetickém riziku
- prenatální
- preimplantační diagnostice

Vzhledem k neexistenci léčby je testování spojeno s *psychickými a etickými problémy*

- hrozí psychická traumatizace pacienta,
- deprese
- v krajním případě i sebevražda.

Proto je k testování třeba přistupovat s rozvahou a pečlivě informovat pacienta o veškerých aspektech testování.

Před prediktivním (presymptomatickým) molekulárně genetickým vyšetřením na HD se postupuje podle speciálního protokolu, který kromě opakovaných konzultací s klinickým genetikem zahrnuje také vyšetření neurologické, psychiatrické a psychologické.

Vyšetření dětí a nezletilých osob v riziku na základě zájmu/žádosti jejich rodičů je nepřípustné (zachování **práva nevědět**).



# Huntingtonova choroba též Huntingtonova chorea (HD – Huntington's Disease) Léčba

Léčba HD v současné době **neexistuje**.

Zkoumají se látky, které by mohly působit neuroprotektivně  
Většina z nich však nepřinesla signifikantní výsledky.

Nadějně vypadají transplantace nových zdrojů neuronů.

Problém - HD postihuje více oblastí mozku,  
etické otázky