

# Molekulární patologie

---

K. Kaňková

# Program

---

## □ I. část:

- definice molekulární patologie
- funkční klasifikace mutací
- rozdělení a charakteristika efektů

## □ II. část – příklady:

- genetická analýza imunoglobulinového receptoru
  - molekulární patogeneze přetížení železem
-

# Patologie (=klasická patologie, patologická anatomie)

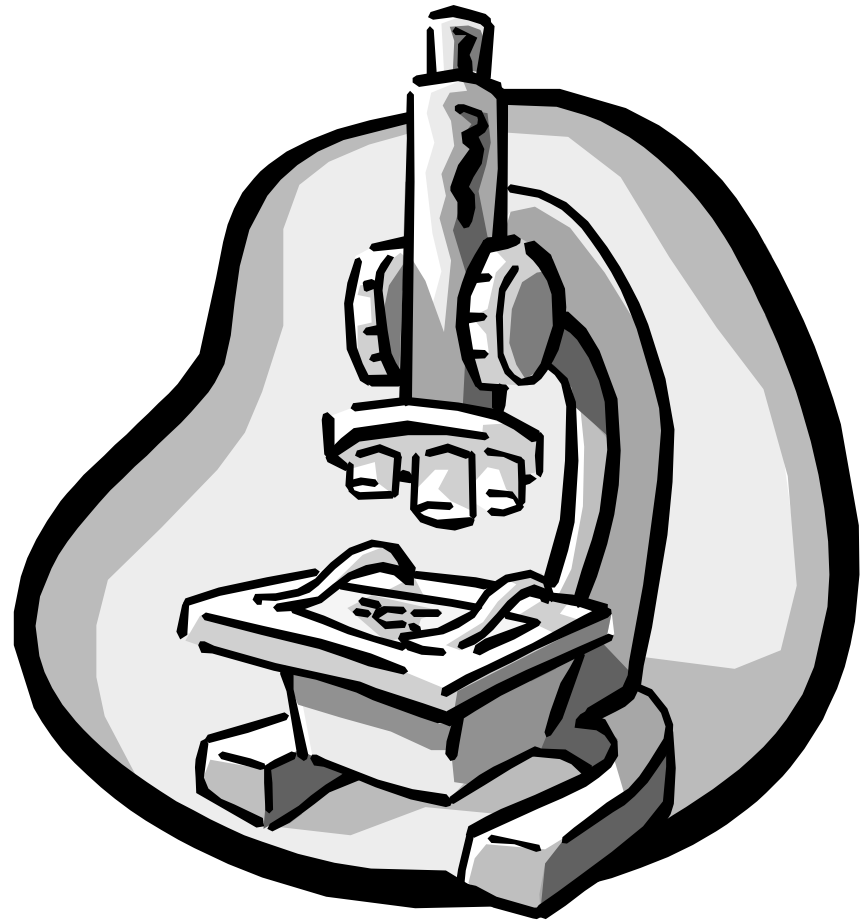
---

- obor studující patogenezi nemocí a jejich etiologii
    - patogeneze nemoci = soubor dějů, které provází vznik nemoci a vývoj chorobného stavu, soubor morfologických a funkčních změn
    - morfologické a funkční změny nelze striktně oddělit (patologická anatomie vs. patologická fyziologie)
  - diagnostický obor zabývající se diagnostikou nemocí a příčin úmrtí na makro- a mikroskopické úrovni
    - na úrovni organismu, orgánů, tkání a buněk
-

# Metody klasické patologie

---

- pitva – inspekce
- nekropsie (post mortem)
- biopsie (in vivo)
  - (imuno)histochemie
  - mikroskopie
    - světelná
    - elektronová
    - fluorescenční



# Molekulární patologie

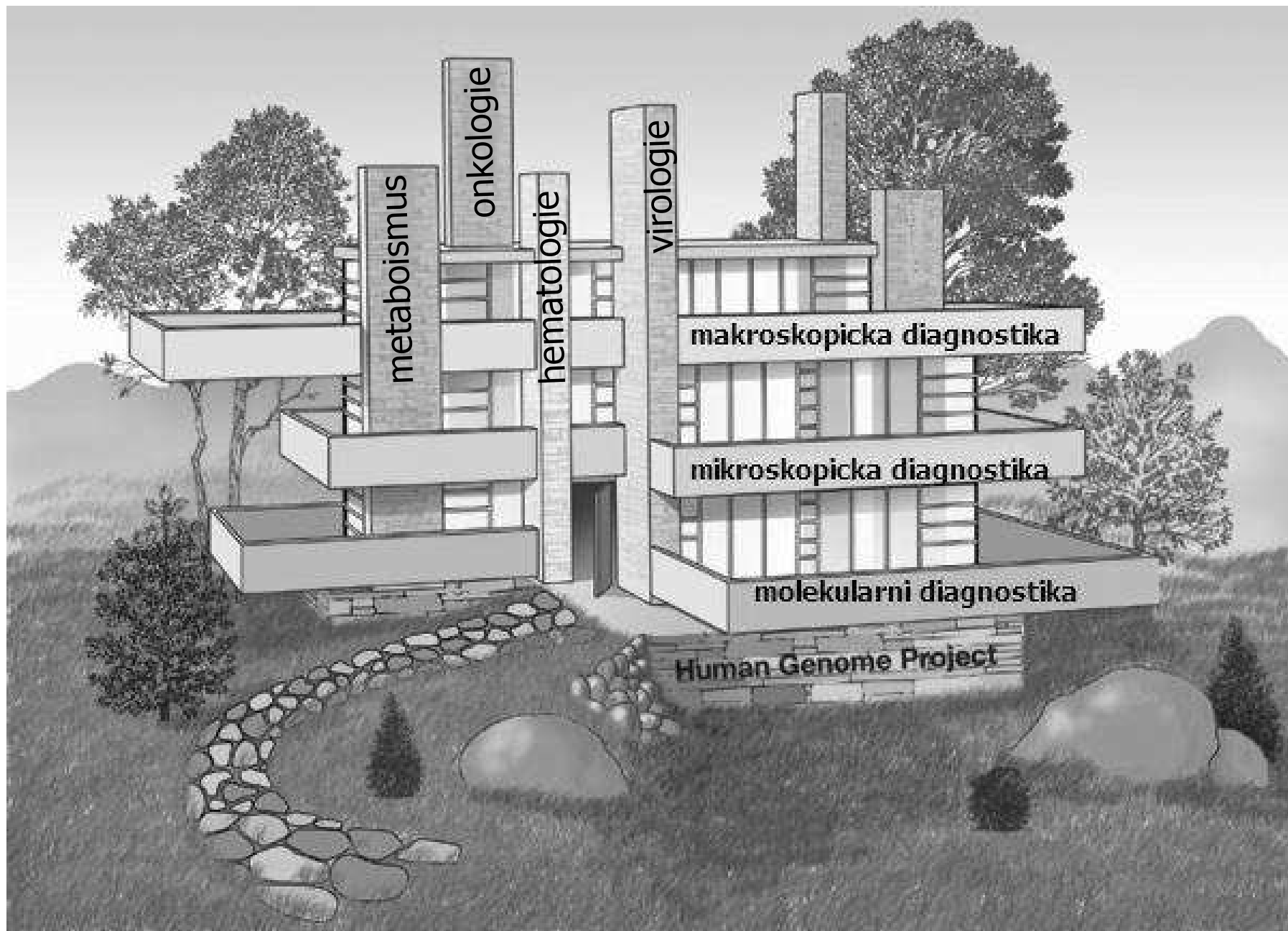
---

- studium patogeneze (a diagnostika) nemocí na molekulární úrovni
    - nukleové kyseliny
    - proteiny
  - objasnění proč a jakým mechanismem vede změna sekvence DNA ke konkrétním patologickým projevům
-

# Lékařská genetika

---

- obor zabývající se většinou monogenními (mendelisticky děděnými), vrozenými nemocemi
    - geny velkého účinku (1 gen = 1 nemoc)
      - ale např. CF cca 500 mutací!!!!!!
  - náplň oboru:
    - patogeneze
    - diagnostika a predikce
    - poradenství
    - screening
-



# Metody molekulární patologie

---

- PCR
  - + RFLP, heteroduplexy, SSCP, DGGE, .....
- sekvenování
- microarrays
- hybridizace
- RNA/real time PCR
- klonování, transfekce, mutagenese
- izolace, separace proteinů, blotting, .....
- detekce apoptózy
  - DNA fragmentation
  - TUNEL, .....





# Lokalizace mutací / pozice v genu

---

- 5' UTR (promotor)
    - kvantitativní efekt?
  - exon
    - kvalitativní, kvantitativní efekt?
  - intron
    - kvalitativní, kvantitativní efekt?
  - 3' UTR
    - stabilita mRNA?
-

# Klasifikace mutací - strukturní

---

- delece (1bp – MB)
  - inzerce (+ duplikace)
  - záměny bází (ev. SNP)
    - missense (záměna AK)
    - nonsense (stop kodon)
    - splice site (exon/intron splicing site)
  
  - všechny typy mohou vést k posunu čtecího rámce (frameshift)
-

# Klasifikace mutací - funkční

---

- ztráta funkce (loss-of-function)
    - produkt genu je nefunkční či je jeho funkce nedostatečná
  - získání nové funkce (gain-of-function)
    - produkt genu má abnormální funkci
  - gene dosage effect
    - odstupňovaný efekt podle množství produktu
-

# “Loss-of-function” mutace

---

- recesivní fenotyp
    - 50% množství produktu stačí
    - většina vrozených chorob metabolismu
      - nemocní/přenašeči
  - celá řada DNA změn může vést k loss-of-function efektu
-

# Mechanismy vzniku "loss-of-function" efektu

---

- delece celého genu
  - delece části genu
  - porušení struktury
    - translokace
    - inverze
  - inserce do genu
  - porucha transkripce
  - promotorová mutace snižující mRNA
  - pokles stability mRNA
  - inaktivace místa sestřihu
  - vytvoření alternativního místa sestřihu
  - frameshift translace
  - nonsense mutace
  - missense mutace
  - porucha posttranslační modifikace
  - porucha celulární lokalizace
  - porucha parenterálního imprintingu a metylace
-

# “Gain-of-function” mutace

---

- změna DNA, která vede k vytvoření nějaké nové kvality
  - dominantní fenotyp
    - typicky během maligní transformace (mutace onkogenů vs. supresorů)
  - dominantně negativní
    - nejen ztráta funkce produktu jedné alely, ale navíc blokáda funkce produktu normálního
-

# Mechanismy vzniku "gain-of-function" efektu

---

- změna afinity k substrátu, event. vazba jiného substrátu
  - overexprese genu
  - receptor nedegradován, trvale obsazen
  - iontový kanál neustále otevřen
  - expanze trinukleotidového repeatu (CAG)<sub>n</sub>
  - strukturální abnormalita multimerických proteinů
  - vznik chimerického genu
  - neznámý
-

# “Gene dosage” mutace

---

- týká se většinou genu, jehož produkt:
    - je součástí signálních nebo metabolických kaskád
    - soutěží s jinými během embryonálního vývoje a v metabolismu
    - funguje ve stochiometrickém poměru s jinými
  - na X-chromozom vázané nemoci
    - např. hemofilie
  - chromozmální numerické aberace
-



# Důsledky numerických aberací chromozomů

---

## □ polyploidie

### ■ triploidie (69, XXX, XXY, XYY)

- cca 2% početí, časný potrat

## □ aneuploidie

### ■ gonozomální

- XXX, XXY, XYY

- normální očekávaná délka života, poruchy fertility

- 45, X

- 99% letální, jinak poruchy fertility a fyzické změny
-

---

## ■ autozomální

□ nulisomie (chybění páru chromozomů)

■ preimplantačně letální

□ monosomie (chybění 1 chromozomu)

■ embryonalně letální

□ trisomie (1 chromozom navíc)

■ až na výjimky většinou embryonálně či fetálně letální

▪ trisomie 13 (Patauův syndrom) - časně poporodní úmrtí

▪ trisomie 18 (Edwardův syndrom) - časně poporodní úmrtí

▪ trisomie 21 (Downův syndrom) – dožití cca 40 let

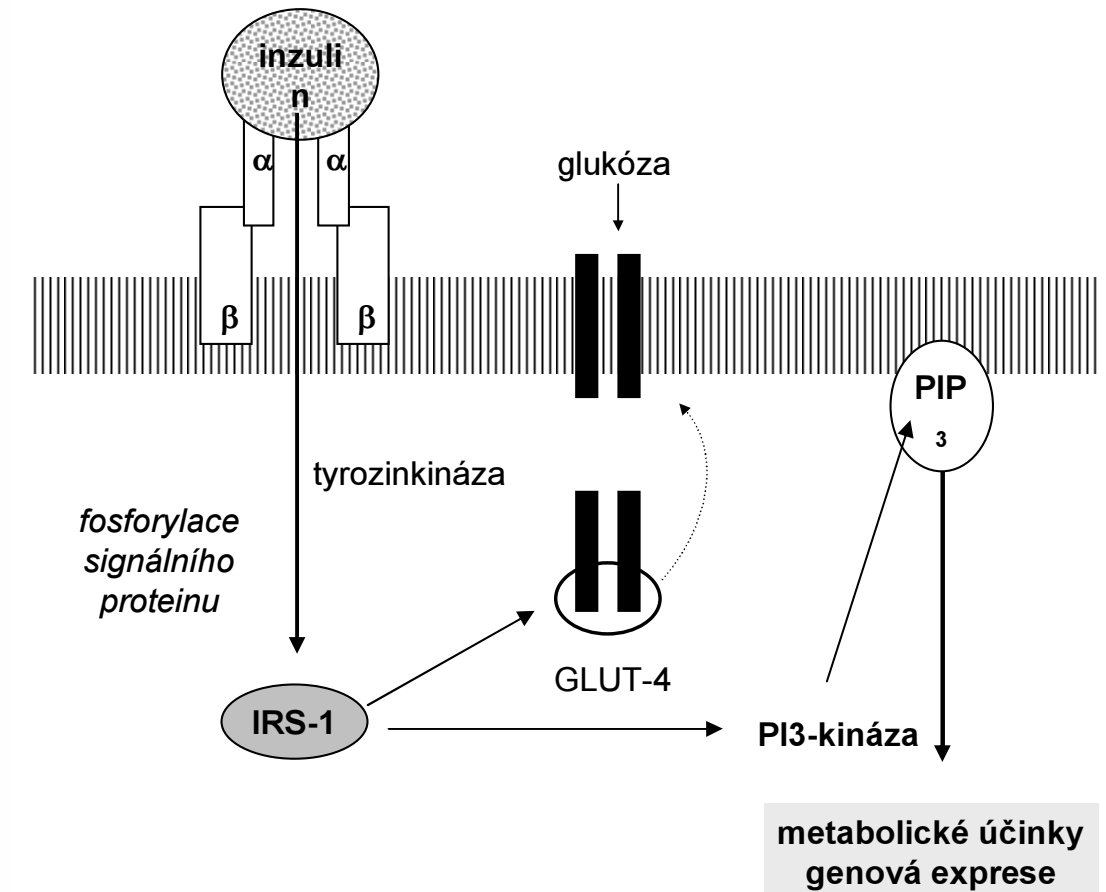
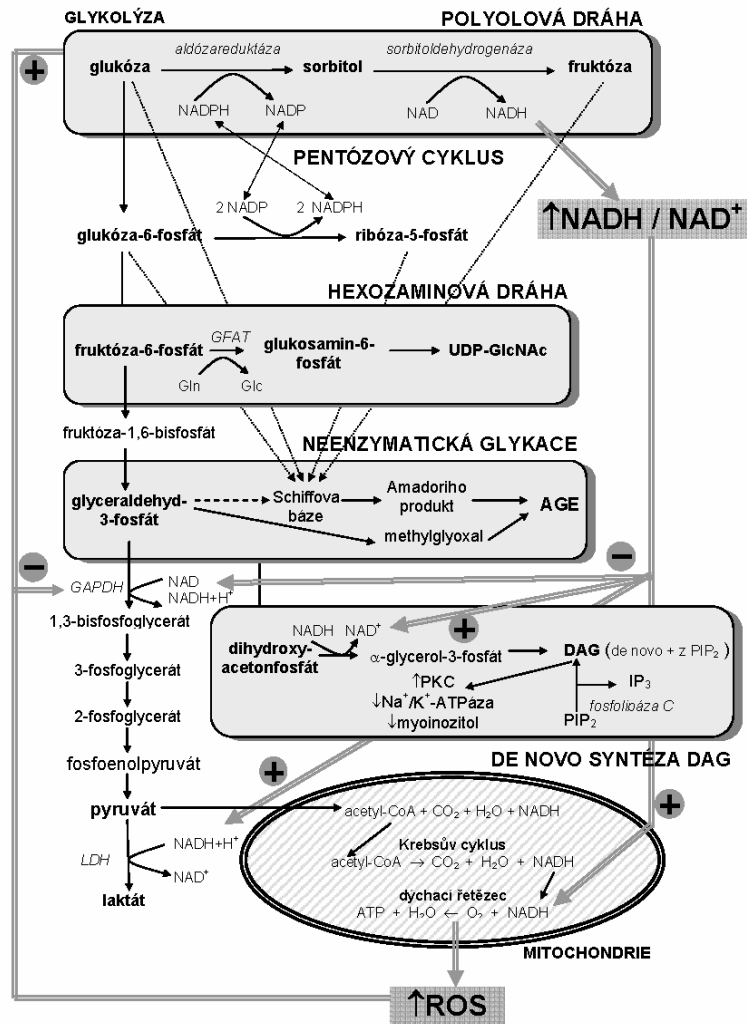
---

# Vztah mezi mutacemi a syndromy

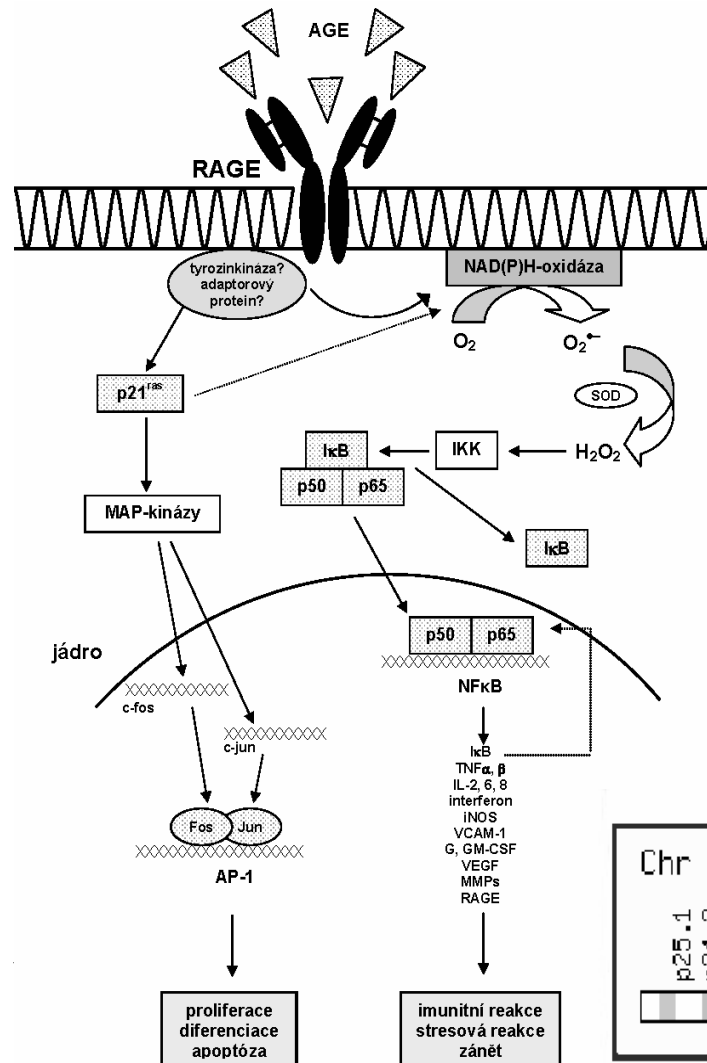
---

- klinicky jednotný syndrom:
    - heterogenita lokusů
    - alelická heterogenita
-

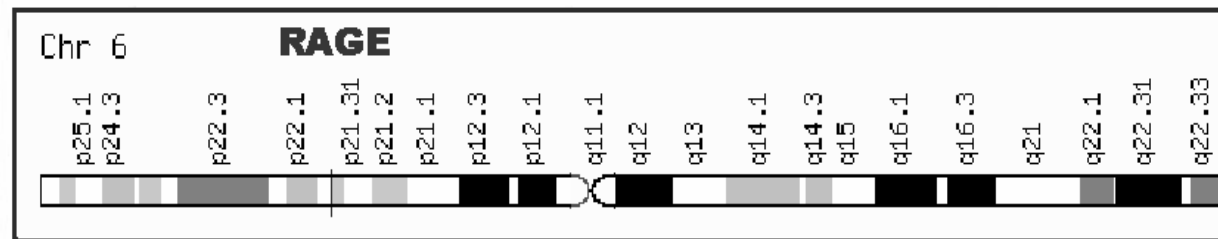
# Syndrom diabetes mellitus vs. jeho genetická dispozice – příklad 1



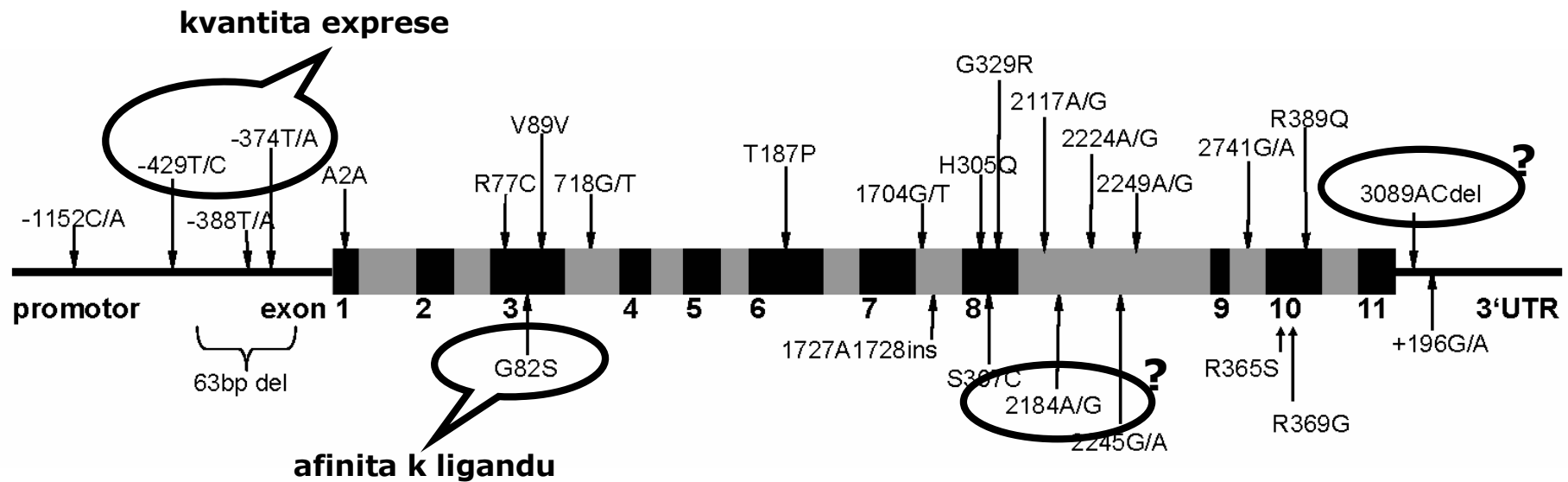
# Experimentální molekulární patologie – příklad 2



- gen pro imunoglobulinový receptor
- vazba ligandu, který je zvýšeně přítomen u nemocných
- aktivace signální kaskády
- kooperace s jinými receptory a enzymy



# SNP mapa genu pro receptor



- genotyp / haplotyp
  - = souhrn alel na jednom chromozomu
- složení heterozygoti
  - výsledný efekt všech záměn v cis / trans pozici??????

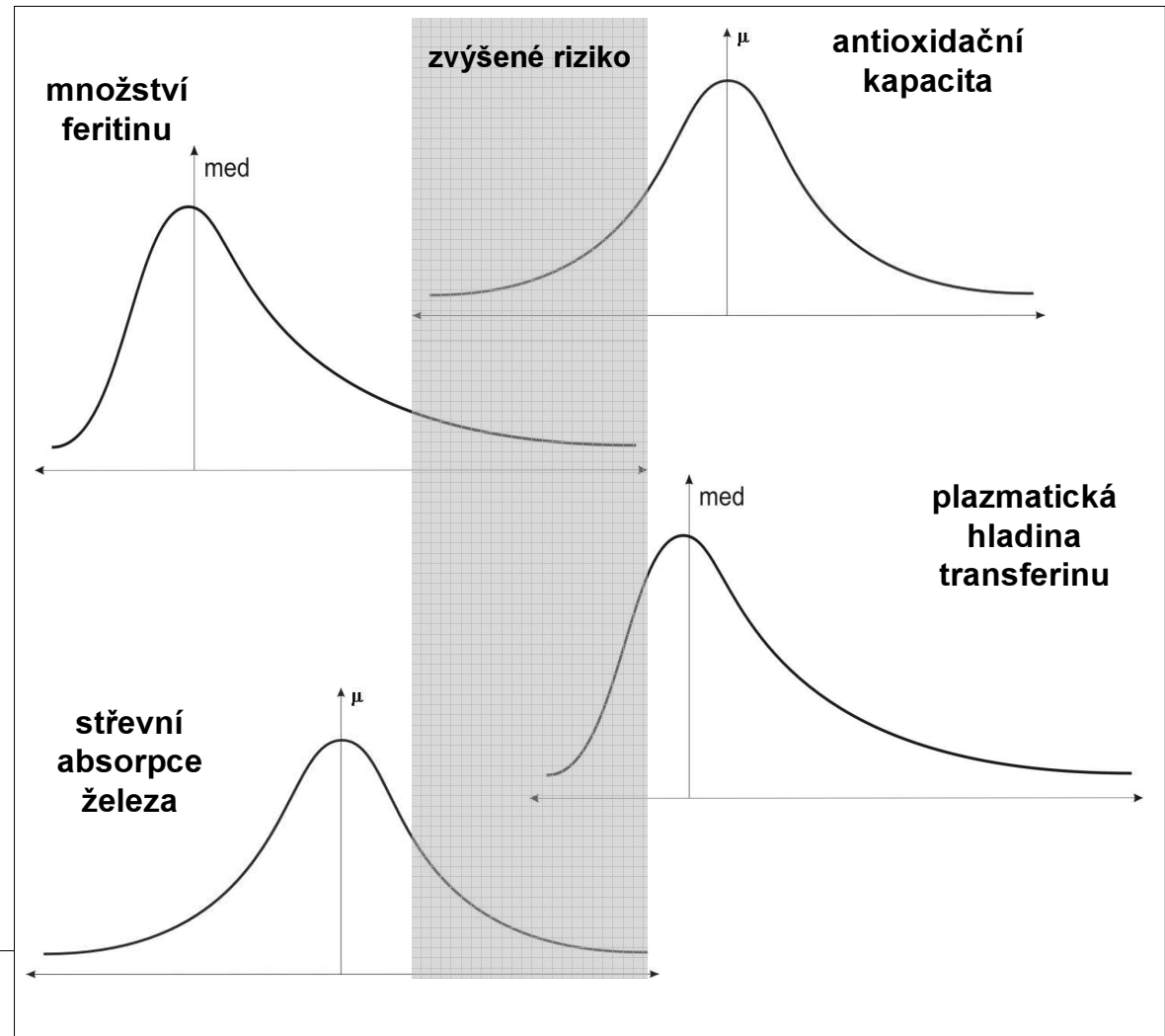
# Co z toho vyplývá ???

---

- výsledky
    - různá frekvence mutací u nemocných a zdravých
    - různé frekvence kombinací genotypů (resp. haplotypů) u nemocných a zdravých
  - interpretace výsledků
    - rizikovost jednotlivých alel a celých haplotypů
    - rozdílné přežívání nemocných (= prognostické využití)
    - jiná odpověď na terapii (= farmakogenomika)
-

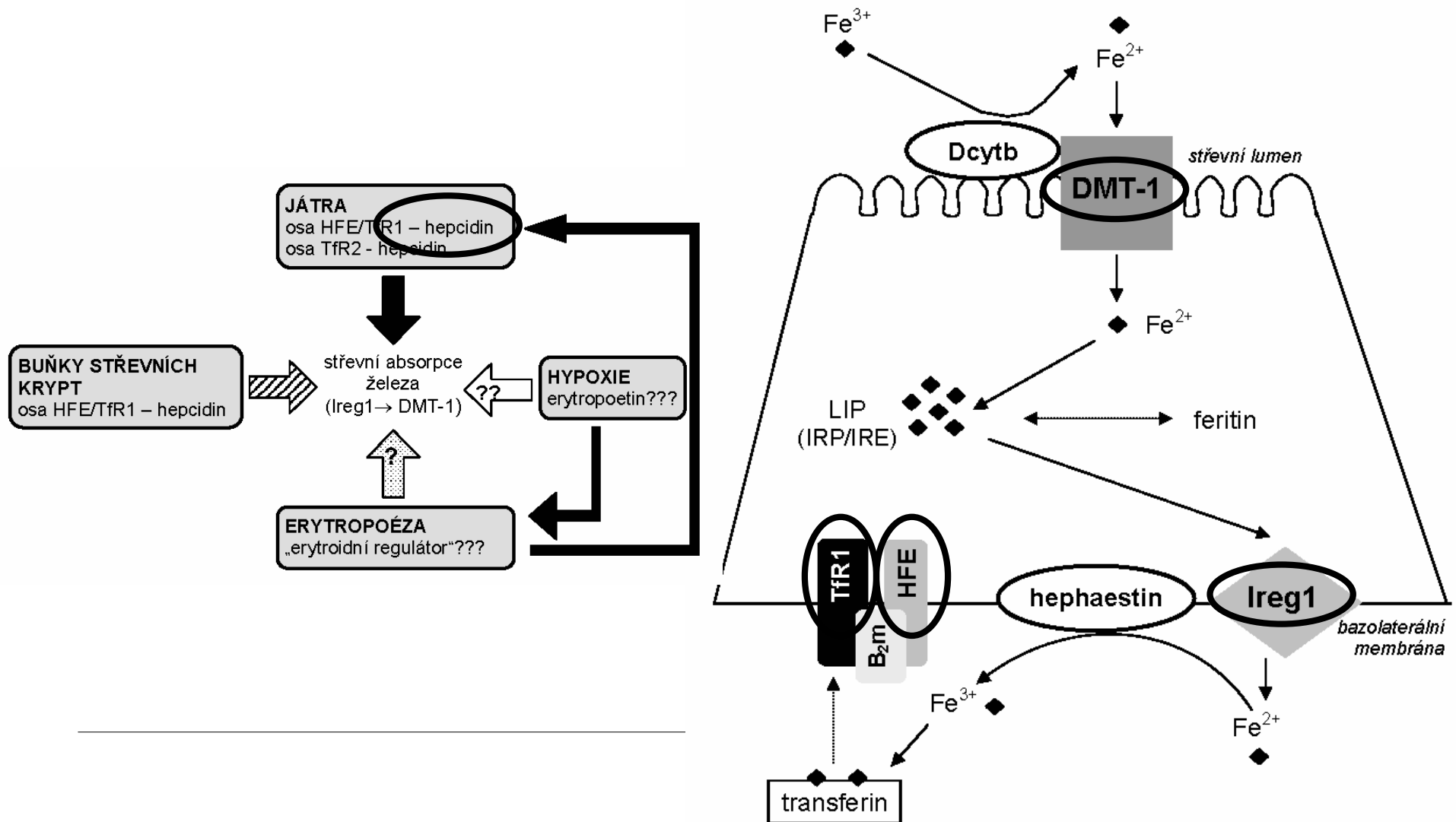
# Molekulární patologie přetížení železem – příklad 3

- plynulá distribuce hladin železa v populaci
  - polygenní znak
- osoby s hereditární hemochromatózou
  - monogenní nemoc

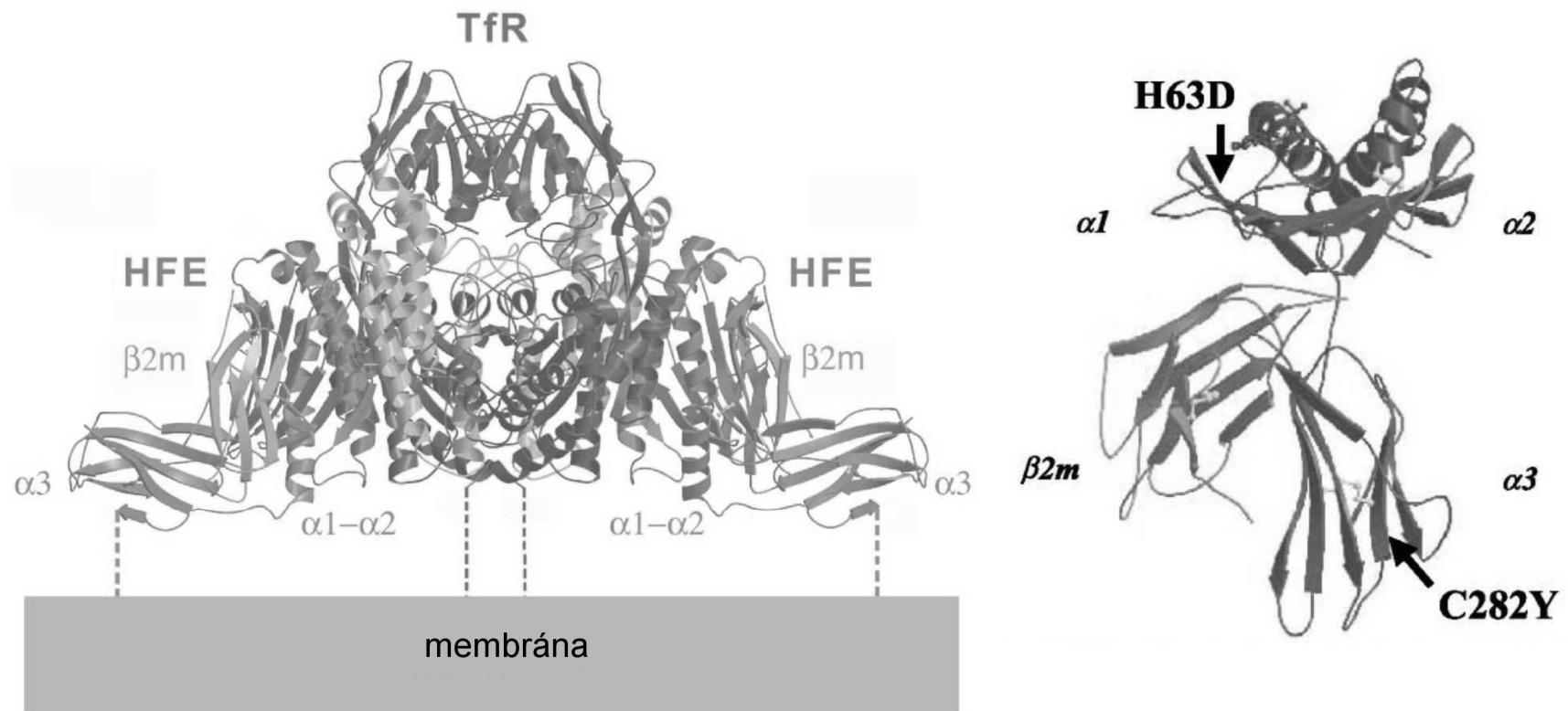




# Regulace příjmu železa a mechanismus střevní absorpce



# Mutace v HFE genu



# Mutace / polymorfismy v kandidátních genech

---

- souhrn všech variant vytváří polygenní kvantitativní znak = plynulou distribuci hladin železa v organismu
  - homozygotní mutace C282Y v HFE genu charakteru „loss-of-function“ vede k monogenní chorobě – hereditární hemochromatóze
-

# Diagnostické využití molekulární patologie

---

## onkologie

- detekce zbytkové choroby po chemoterapii (MRD) a relapsu
- zpřesnění klasifikace tumorů
  - chromosomální translokace, mutace onkogenů, supresorových a reparačních genů
- RT-PCR detekce bcr-abl mRNA (t(9;22))
- mozaicismus po allogenní BMT

## hematologie

- familiární trombofilie
    - Factor V Leiden, protrombin 20210A, C677T  
MTHFR,
-

---

- mikrobiologie

- detekce virů

- EBV, CMV, HIV, HVB, C, .....

- detekce bakteriálních patogenů

- Helicobacter pylori, Mycoplasma tuberculosis, ...

- metabolismus a kardiologie

- I/D ACE, MTHFR, apo(a), apoB, LDL receptor,

- .....

- diabetologie

- HLA DB, DQ

---