Molekulární patologie

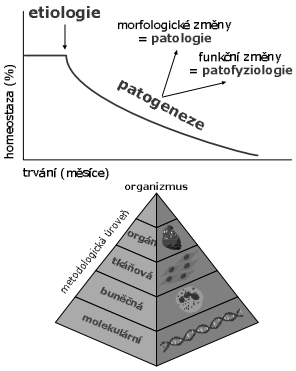
Kateřina Kaňková

Program

- I. část:
  - definice a vymezení molekulární patologie
  - funkční klasifikace mutací
  - rozdělení a charakteristika efektů mutací
- II. část – příklady:
  - diagnostický a terapeutický přínos molekulární patologie
    - diabetes mellitus typu 1
  - prediktivní význam molekulární patologie pro stanovení prognózy a plánování léčby
    - familiární hypercholesterolemie

Definice patologie

- obor studující patogenezi a etiologii nemocí
  - etiologie = příčina vzniku nemoci
  - patogeneze = soubor dějů provázejících vývoj nemoci
    - soubor morfologických a funkčních změn, které nelze striktně oddělit (pat. anatomie vs. fyziologie)
- v klasickém pojetí rovněž 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

Metody molekulární patologie

- objasnění proč a jakým mechanismem vede změna sekvence DNA, RNA či proteinu ke konkrétním patologickým projevům
- diagnostika na molekulární úrovni
  - nukleové kyseliny
  - proteiny
    - PCR + RFLP, heteroduplexy, SSCP, DGGE, sekvenování
    - microarrays
    - hybridizace
    - RNA/real time PCR
    - klonovani, transfekce, mutageneze
    - izolace, separace proteinů, blotting, ...
    - detekce apoptózy - DNA fragmentation TUNEL, ...

Lékařská genetika

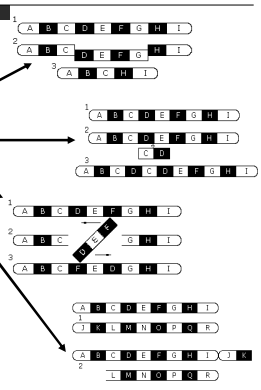
- obor zabývající se většinou monogenními (mendelisticky děděnými), vrozenými nemocemi
  - geny velkého účinku (1 gen = 1 nemoc)
    - ale např. CF cca 500 mutací!!!!!!
- náplň oboru:
  - patogeneze
  - diagnostika a predikce
  - poradenství
  - screening

Diagnostické využití mol. patologie

- Onkologie a hematologie
  - detekce zbytkové choroby po chemoterapii (MRD) a relapsu
  - zpřesnění klasifikace tumorů
    - chromosomální translokace (RT-PCR detekce bcr-abl mRNA, t(9;22)
    - mutace onkogenů, supresorových a reparačních genů
  - mozaicismus po allogenní BMT
  - 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, diabetologie a kardiologie
  - I/D ACE, HLA DB, DQ, MTHFR, apo(a), apoB, LDL receptor, …….
- Forenzní patologie
  - DNA fingerprinting
  - DNA profiling
  - paternita

Klasifikace mutací - strukturní

- **podle mechanizmu vzniku**
  - délkové
    - delece (1bp – MB)
    - inzerce + duplikace
    - inverze
    - translokace
  - bodové mutace a SNP
    - missense (záměna AK)
    - nonsense (stop kodon)
    - splice site (exon/intron splicing site)
- všechny typy mohou vést k posunu čtecího rámce (frameshift)



Vztah lokalizace mutací vs. efekt

- **podle pozice v genu**
- 5’ UTR (promotor)
  - kvantitativní efekt?
- exony
  - kvalitativní, kvantitativní efekt?
- introny
  - kvalitativní, kvantitativní efekt?
- 3’ UTR
  - stabilita mRNA?

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
- inzerce 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 normální alely

Mechanismy vzniku "gain-of-function" efektu

- změna afinity k substrátu, popř. vazba jiného substrátu
- overexprese genu
- receptor není degradován, trvale obsazen
- iontový kanál neustále otevřen
- expanze trinukleotidového repeatu $(CAG)_n$
- strukturální abnormalita multimerických proteinů
- vznik chimerického genu
- neznámý

"Gene dosage" mutace

- týká se většinou genů, jejichž produkty:
  - jsou součástí signálních nebo metabolických kaskád
  - soutěží s jinými během embryonálního vývoje a v metabolismu
  - fungují ve stochiometrickém poměru s jinými
- na X-chromozom vázané nemoci
  - např. hemofilie
- chromozmální numerické aberace

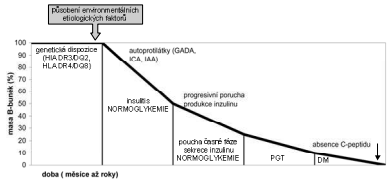
Numerické aberace chromozomů

- polyploidie
  - triploidie (69 XXX, XXY, XYY)
    - cca 2% všech 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) - časné poporodní úmrtí
        - trisomie 18 (Edwardův syndrom) - časné poporodní úmrtí
        - trisomie 21 (Downův syndrom) – dožití cca 40 let

Molekulární patologie T1DM – příklad 1

- onemocnění je důsledkem **absolutního deficitu inzulinu**
- v důsledku zničení β-buněk Langerhansových ostrůvků slinivky břišní
- destrukce je způsobena autoimunitním procesem u geneticky predisponovaných osob za významné spoluúčasti faktorů zevního prostředí
- autoimunitní proces je vysoce specifický a zasahuje pouze β-buňky

Etiopatogeneze T1DM

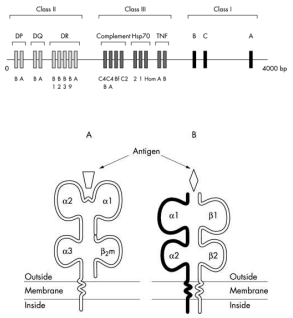


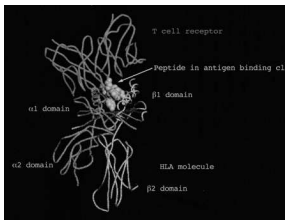
- hyperglykémie, ketoacidóza, event. koma
- porušená glukózová tolerance
- virová infekce, dieta, stres
- autoimunitní proces – pozitivita protilátek GADA, ICA, IAA
- Th1-zprostředkovaná cytotoxicita
- familiární výskyt, konkordance u dvojčat - genetická dispozice

Genetická dispozice

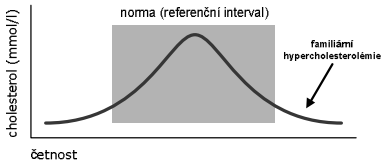
- *IDDM1*
  - chromozom 6p21 – oblast MHC
    - cca 3.5MB, cca 200 genů
    - II. třída (HLA-D)
  - rizikové haplotypy DR3-DQ2 a DR4-DQ8
    - nejvyšší riziko heterozygotní genotyp DR3-DQ2/DR4-DQ8
  - protektivní haplotyp DQ6.2
- *IDDM2*
  - chromozomu 11p15 - gen pro inzulin
  - minisatelitní polymorfizmus (VNTR – variabilní počet tandemových 14-15 bp repeticí) v promotoru genu
    - 20 – 63 repetic
      - rizikový !!
    - 64 – 139 repetic
    - 140 – 210 repetic
      - protektivní

Role haplotypů DR3-DQ2 a DR4-DQ8 v etiopatogenezi T1DM





Hyperlipoproteinemie – příklad 2



- plynulá distribuce hladin cholesterolu v populaci
  - kvantitativní znak
- osoby s FH
  - monogenní nemoc

Familiární hypercholesterolemie

- způsobena mutacemi v genu pro LDL receptor
- popsáno více než 700 různých mutací
- heterozygoti se vyskytují s frekvencí 1:500, homozygoti 1:1 mil.
- z funkčního hlediska - **„gene-dosage" efekt**:
  - úplná ztráta receptoru (17% případů)
  - porucha transportu do pl. membrány (54%)
  - porucha vazby LDL
  - porucha internalizace receptoru po vazbě LDL
  - porucha uvolnění z endozomu po internalizaci a návratu do plazmatické membrány (22%)