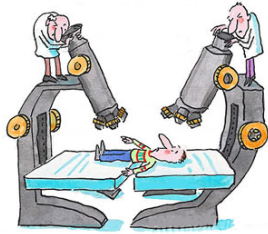


Molekulární patologie

Kateřina Kaňková



1

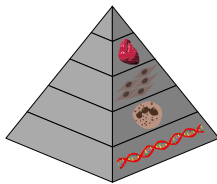
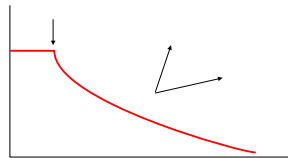
Program

- 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

2

Definice patologie

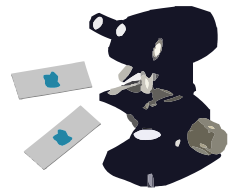
- studuje **etiopatogenezi** nemocí
 - **etiologie** = příčina vzniku nemocí (vyvolávající činitel)
 - **patogeneze** = soubor dějů provázejících vývoj nemocí
 - soubor morfologických a funkčních změn, které nelze striktně oddělit (pat. anatomie vs. fyziologie)
- v klasickém pojetí rovněž diagnostický obor zabývající se diagnostikou nemocí a příčin úmrtí na makro- a mikroskopické úrovni
 - na úrovni organismu, orgánů, tkání a buněk



3

Metody klasické patologie

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



4

Metody molekulární patologie

- objasnění proč a jakým mechanismem vede změna sekvence DNA, RNA či proteinu ke konkrétním patologickým projevům
 - změna většinou získaná, v somatických bb. nebo vrozené u tzv. **komplexních nemocí**
- diagnostika na molekulární úrovni
 - nukleové kyseliny
 - proteiny
 - cytogenetika, FISH
 - PCR + RFLP, heteroduplexy, SSCP, DGGÉ, sekvenování
 - microarrays
 - hybridizace
 - RNA/real time PCR
 - klonování, transfekce, mutagenese
 - izolace, separace proteinů, blotting,
 - detekce apoptózy - DNA fragmentation TUNEL,

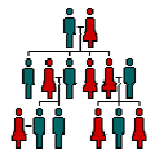
metody molekulární patologie



5

Lékařská genetika

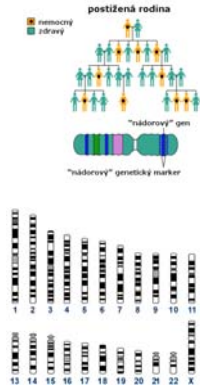
- obor zabývající se většinou **monogenními, vrozenými** nemocemi
 - mendelistická dědičnost
 - tzv. geny velkého účinku (1 gen = 1 nemoc)
 - ale např. CF ~500 mutací!!!!!!
 - LDL receptor >700 mutací
- náplň oboru:
 - patogeneze
 - diagnostika a predikce
 - poradenství
 - screening



6

Diag. využití mol. patologie

- Onkologie
 - detekce zbytkové choroby po chemoterapii (MRD) a relapsu
 - zpřesnění klasifikace tumoru
 - chromosomální translokace (RT-PCR detekce bcr-abl mRNA, t(9;22))
 - mutace onkogenní, supresorových a reparačních genů
 - mozaicismus po allogenní BMT
- Hematologie
 - koagulopatie (poruchy kr. srážení)
 - hemofilie, von Willebrandova choroba, ...
 - familiární trombofilie
 - Factor V Leiden, protrombin 20210A, C677T MTHFR, ...
 - andemie/přetížení železem
 - hereditární hemochromatóza
- Mikrobiologie
 - detekce virů
 - EBV, CMV, HIV, HVB, C, ...
 - detekce bakteriálních patogenů
 - Helicobacter pylori, Mycoplasma tuberculosis, ...
- Metabolismus, diabetologie a kardiologie
 - identifikace rizikových markerů nemocí
 - I/D ACE, HLA DB, DQ, MTHFR, apo(a), apoB, LDL receptor, ...
 - identifikace genet. faktorů ovlivňujících efekty faktorů prostředí
 - MTHFR, ...
 - identifikace genet. faktorů ovlivňujících efekt léčby
 - cytochrom P450 (CYP2D6, ...)
- Forenzní patologie
 - DNA fingerprinting
 - DNA profiling
 - paternita

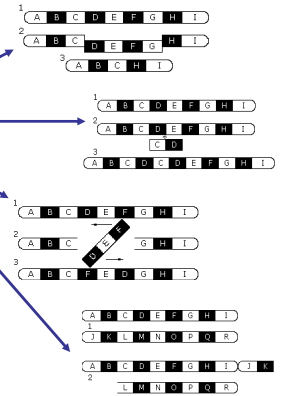


7

Klasifikace mutací - strukturní

podle mechanismu vzniku

- **délkové**
 - delece (1bp – MB)
 - inzerce + duplikace
 - inverze
 - translokace
- **bodové mutace a SNP**
 - silent (žádný efekt)
 - missense (záměna AK)
 - nonsense (stop kodon)
 - splice site (exon/intron splicing site)



8

Vztah lokalizace mutací vs. efekt

- podle pozice v genu
 - 5' UTR (tj. promotor genu)
 - kvantitativní efekt (např. různá intenzita transkripce)
 - exony
 - kvalitativní efekt (např. různá sekundární a terciární struktura, aktivita, afinita, ...)
 - introny
 - kvalitativní efekt (změna sestřihového místa)
 - kvantitativní efekt ? (vazba represorů nebo enhancerů)
 - 3' UTR
 - efekt na stabilitu mRNA

9

Klasifikace mutací - funkční

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

10

"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

11

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

12

"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

13

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

14

"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
 - muži nemocní / ženy přenašečky (ale!!!)
 - inaktivace jednoho z páru X-chrom. vede k různě vyjádřenému onem. i žen
- chromozomální numerické aberace

15

Numerické aberace

- 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)
 - embryonálně 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

16

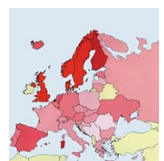
Využití mol. patologie k pochopení etiopatogeneze nemocí

- Příklady
 - (1) diabetes mellitus typu 1 (T1DM)
 - (2) maturity-onset diabetes of the young (MODY)
 - (3) familiární hypercholesterolemie

17

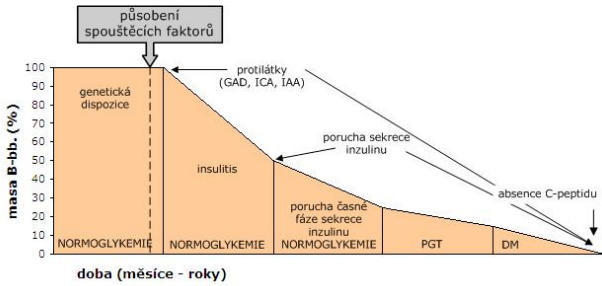
T1DM – příklad 1

- v důsledku autoimunitní destrukce β-bb. LO u **geneticky disponovaných** jedinců
 - 30 - 50% konkordance u MZT, 15% u DZT
- **cytotoxická autoimunita** (Th1) zprostředkovaná T-lymfocyty vede k postupné destrukci až úplnému chybění β-bb. a tím produkce inzulínu
- **spouštěcí faktory** autoimunity – časová a geografická variabilita!!!
 - virová infekce
 - zardénky, spalničky, coxsackie B, CMV, EBV, enteroviry, retroviry)
 - zevní faktory
 - proteiny kravského mléka příliš brzy
 - nedostatek vitamínu D (severojižní gradient)
 - toxiny (dieta, voda, bakterie)
- dynamika
 - manifestace obvykle v dětství, ve většině případů autoimunita dokončena, absolutní závislost na exogenním inzulínu



18

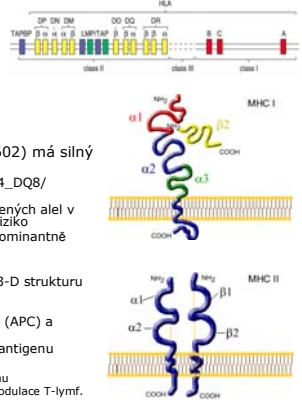
T1DM



19

Genetika T1DM

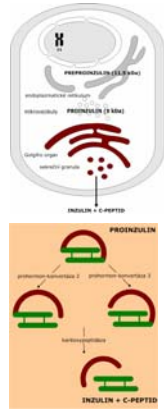
- IDDM1 (HLA II lokus, 6p21)**
 - asociace je výsledkem mnohočetných **vazebných studií**
 - hlavní **rizikové determinanty** (alely) u bělochů jsou **DRB1** a **DQB1** geny
 - DRB1*04_DQ8
 - DRB1*03_DQ2
 - cca 10% je non DRB1*04/DRB1*03
 - jiné HLA II haplotypy
 - DQ6 antigen** (DQA1*0102 a DQB1*0602) má silný **protektivní efekt**
 - nejvyšší riziko nese genotyp DRB1*04_DQ8/DRB1*03_DQ2
 - heterozygotnost pro jednu z výše uvedených alel v kombinaci s jinými představuje menší riziko
 - jákovikv genotyp obsahující DQ6 má dominantně protektivní efekt
- molekulární podstata asociace**
 - rizikové a protektivní varianty HLA II mění 3-D strukturu povrchového antigenu (kryystalografie)
 - antigen-binding dleť
 - rozdíly v selektivitě prezentovaných peptidů (APC) a stabilitě komplexu antigen/molekula HLA II
 - protektivní molekuly mají stabilnější vazbu antigenu
 - hypotézy
 - nedostatečná delece autoreaktivních T v thymu
 - rozdílná vzáha na TCR a tím rozdílná imunomodulace T-lymf. (proliferující x regulující)



20

Genetika T1DM

- IDDM2 (INS lokus, 11p15)**
 - asociace je výsledkem **vazebných studií**
 - minisatelit (VNTR) v 5'UTR
 - repetice 14-15bp:
 - alela 1 (26 - 63 repetit) - **riziková**
 - alela 2 (64 - 139 repetit)
 - alela 3 (140 - 210 repetit) - **protektivní (AD)**
 - asociace není tak jednoznačná jako u HLA II
 - náznaky paternální transmise (maternální imprinting)
- molekulární podstata asociace**
 - insulin jako autoantigen
 - riziková varianta vede k nižší expresi genu a tím navození menší imunotolerance???



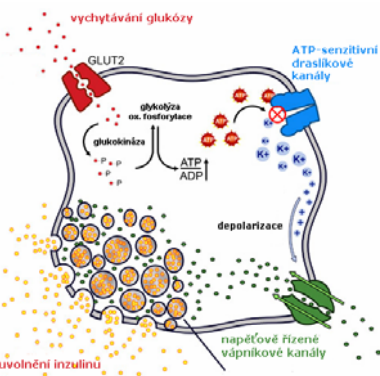
21

MODY (Maturity-onset diabetes of the young) – příklad 2

- cca 1% všech diabetiků v populaci
- skupina **monogenních** diabetů s familiárním výskytem a dobře definovaným mendelickým způsobem dědičnosti (zpravidla AD), časnou manifestací (dětství, adolescenci či časná dospělost) a bez vztahu k obezitě
- cca 6 typů (MODY1-6)
- patofyziologie: geneticky podmíněná **dysfunkce β-buněk** ale dlouhodobě měřitelný C-peptid bez známek autoimunity
- dvě podskupiny
 - MODY v důsledku mutací v **glukokináze** (MODY2)
 - glukokináza = "glukózový senzor" (vázne uvolňování a produkce inzulínu)
 - lehčí forma bez výrazného rizika pozdních komplikací
 - MODY v důsledku mutací v **transkripčních faktorech** (ostatních 5 typů)
 - těžké defekty β-buněk progresivně vedoucí k diabetu se závažnými následky
 - poškozená glukózou stimulovaná tvorba a uvolnění inzulínu a proliferace a diferenciace β-buněk

MODY	lokus	gen	produkt	prim. defekt	závažnost	komplikace
1	20q	HNF4A	hepatocyte nuclear factor-4α	pankreas	vysoká	časté
2	7p	GCK	glukokináza	pankreas/játra	mírná	vzácné
3	12q	TCF1 (HNF1A)	hepatocyte nuclear factor-1α	pankreas/ledviny	vysoká	časté
4	13q	IPF1	insulin promoter factor-1	pankreas	vysoká	?
5	17q	TCF2 (HNF4B)	hepatocyte nuclear factor-1β	pankreas/ledviny	vysoká	renální
6	2q32	NEUROD1	NEUROD1	pankreas	vysoká	?

Funkční význam asociací

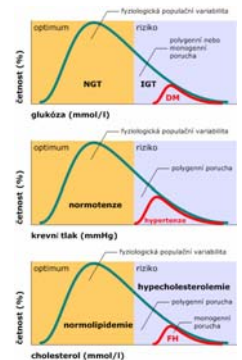


- HNF**
 - většina transkripčních faktorů původně popsanych ve spojení s jaterním metabolismem je rovněž zapojena ve vývoji pankreatu a B-bb.
- IPF1 a NEUROD1**
 - ovlivňují transkripci inzulínu

22

(Familiární) hypercholesterolemie – příklad 3

- plynulá distribuce znaku - hladin cholesterolu - v populaci
 - kvantitativní znak (QTL)
- osoby s FH
 - monogenní nemoc



24

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%)

