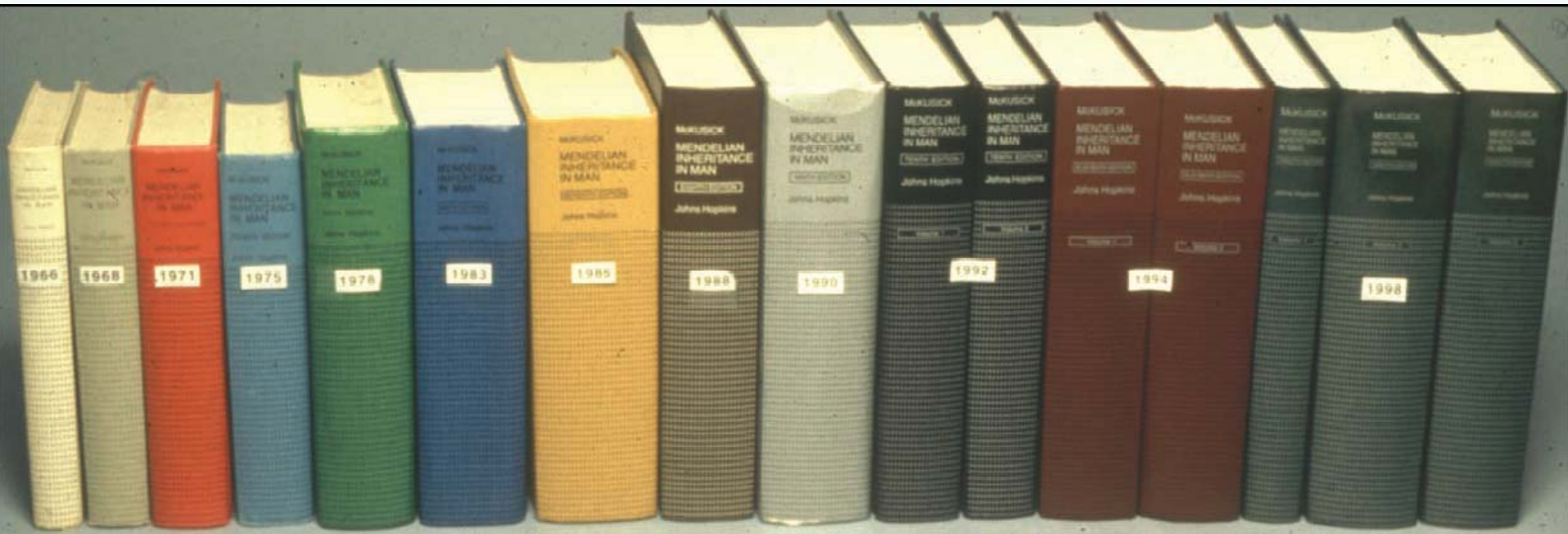


# Molekulárny aspekt monogénných ochorení

- Nomenklatúra lokusov, alel a mutácií
- Typy mutácií, zapríčiňujúcich monogénne ochorenia
- Mutácie v kódujúcich sekvenciách
  - model: Hb varianty
- Mutácie v nekódujúcich sekvenciách
  - model: talasémie
- Lokusová a alelová heterogenita monogénných ochorení
- Príklady monogénných ochorení

Základný zdroj info: OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man  
(V. McKusick), [www.nslj-genetics.org/search\\_omim.html](http://www.nslj-genetics.org/search_omim.html)

# V.A.McKusick: Mendelian Inheritance in Man (MIM)



12 knižných vydání 1966 - 1998

# OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man

OMIM - HEMOCHROMATOSIS; HFE - Microsoft Internet Explorer

Address <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=235200>

NCBI

OMIM  
Online Mendelian Inheritance in Man  
Johns Hopkins University

Published Nucleotide Protein Genome Structure PopSet Taxonomy OMIM

Search OMIM for  Go Clear

Limits Preview/Index History Clipboard Details

Display Detailed Show: 20 Send to File

[\\*235200](#) [Links](#)

**HEMOCHROMATOSIS; HFE**

*Alternative titles; symbols*

**HLAH**  
**HEMOCHROMATOSIS, HEREDITARY; HH**  
**HEMOCHROMATOSIS GENE, INCLUDED; HFE GENE, INCLUDED**

Gene map locus [6p21.3](#)

**TEXT**

**DESCRIPTION**

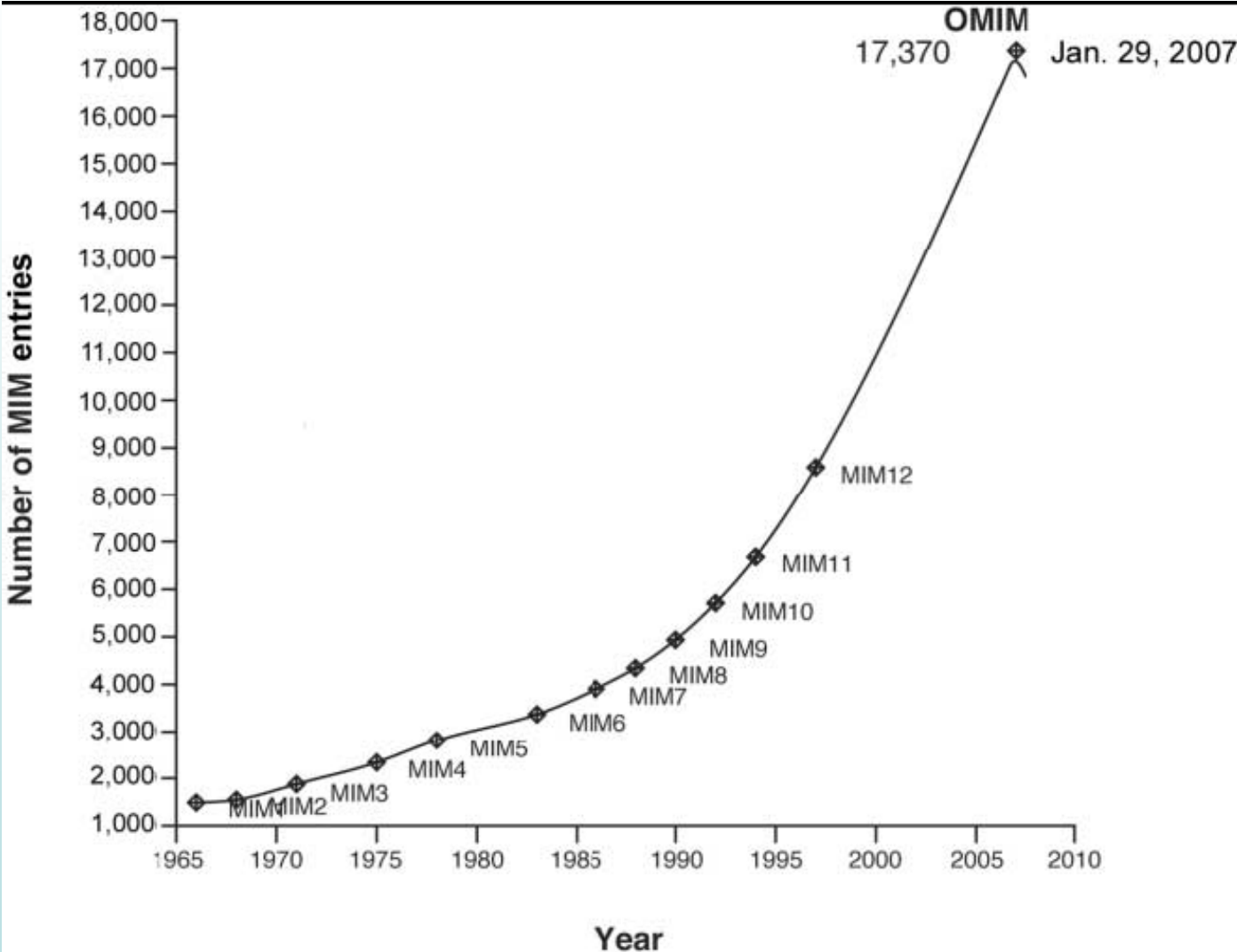
The features of hemochromatosis include cirrhosis of the liver, diabetes, hypermelanotic pigmentation of the skin, and heart failure. Primary hepatocellular carcinoma (HCC; [114550](#)), complicating cirrhosis, is responsible for about one-third of deaths in affected homozygotes. Since hemochromatosis is a relatively easily treated disorder if diagnosed, this is a form of preventable cancer. 💡

View List  
See Also  
References  
Contributors  
Creation Date  
Edit History  
Clinical Synopsis  
Gene map

LocusLink  
Nomenclature

Internet

# Rast počtu údajov v databáze OMIM: 1966-2007



V OMIME je všetko! (Ak ak tam niečo nie je, je to inde na webe)

# Nomenklatúra lokusov a alel

- **Gény:** skratka hlavnej funkcie alebo génového produktu
  - *HBA1* hemoglobín alfa, lokus 1
  - *COL5A2* kolagén typ 5, alfa 2 polypeptid
- **Pseudogény:** symbol génu + „P“
  - *HBAP1* pseudogén globínového génu alfa 1
  - *ACTBP2* druhý pseudogén aktínového génu beta
- **„Anonymné“ úseky DNA:** symboly „D“  
symboly: 1-22; X; Y – chromozóm
  - N - na viacerých chromozómoch
  - S - jednotková sekv. („single copy“)
  - Z - repetitívna sekv. na jednom chromozóme
  - F - repetitívna sekv. na viacerých chrom. („family“)
  - D14S63 - 63. identifikovaný úsek DNA na chromozóme 14
  - DXS12 - 12. identifikovaný segment chromozómu X
  - DNF3 - 3. identifikovaná rodina repet. sekvencií na viacerých chromozómoch

Základná [www stránka](http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature): [www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature](http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature)

# Nomenklatúra mutácií

## Human Gene Mutation Database:

[www.hgmd.org](http://www.hgmd.org)

### Hlavné triedy mutácií

- **delécie**  
od 1 bp po megabázy
- **inzercie**  
vrátane duplikácií
- **jednobázové substitúcie**  
missense            transverzie  
nonsense            tranzície  
splice site
- **posunové (frameshift)**  
v dôsledku delécií, inzercií, chýb splicingu
- **„dynamické“ (expansion rep. sekv.)**  
tandemové repetície, ktoré často expandujú počas meiózy

### Podľa sekvencie:

- v kódujúcej sekvencii
- v nekódujúcej sekvencii

### Nomenklatúra mutácií

- **Substitúcie aminokyselín**  
(jedno- alebo trojpísmenové symboly)
  - R117H alebo Arg117His: substitúcia arg za his na AA 117
  - G542X: glycín 542 nahradený stop-kodónom
- **Substitúcie nukleotidov**  
(A z inic. kodónu ATG je vždy +1)
  - 1162G>A: výmena G na pozícii 1162 za A
  - IVS4+2G>T: zámena G za T v druhej báze intrónu 4
- **Delécie a inzercie**  
(symboly del resp. ins)
  - F508del: delécia fenylalanínu 508
  - 622-626del: delécia 5 nt začínajúc 622
  - 409-410insC: vloženie C medzi 409 a 410

HGMD: Human Gene Mutation Database  
(Cardiff, UK): [www.hgmd.org](http://www.hgmd.org)



# Klasifikácia mutácií z hľadiska efektu na génový produkt

## 1. Produkt so zníženou až nulovou funkciou (*loss-of-function*)

- najčastejšie ak je produktom génu enzým
- častým typom mutácie je delécia génu

## 2. Produkt s abnormálnou funkciou (*gain-of-function*)

- najčastejšie je produktom neenzymatický proteín
- časté u nádorov (somat. mutácie), zriedkavé u monogén. chorôb
- delécia génu sa neuplatňuje (nevedie k novej funkcii)

všeobecne mutácie typu 1 sú najčastejšie recesívne, typu 2 dominantné

- u niektorých génov sú známe oba typy (výsledkom je *alelová heterogenita*)

niekedy ťažko rozhodnúť: ak mutácia zmení vlastnosti iónového kanála - zanikla stará alebo vznikla nová funkcia?

### - *haploinsuficiencia*

- dominantný fenotyp, lebo 50% produktu nestačí (napr. elastín)
- dominantne-negatívny efekt: produkt mutácie nielen stratí funkciu ale aj blokuje funkciu normálnej alely (napr. kolagén)



# Mechanizmy zníženia/eliminácie funkcie gén. produktu

- delécia celého génu ( $\alpha$ -thalasémie)
- *delécia časti génu* (Duchenneova svalová dystrofia, DMD)
- *prerušenie štruktúry génu*
  - *chrom. translokáciou* (DMD u žien)
  - *inverziou* (gén *F8C* u hemofílie A)
- *inzercia do génu* (LINE-1 do génu *F8* u hemofílie A)
- *inhibícia transkripcie* (expanzia (CGG)<sub>n</sub> u FRAXA)
- *promótorová mutácia* (redukuje mRNA: talasémie)
- *znížená stabilita mRNA* (Hb-Constant Spring)
- *inaktivácia donorového zosteriového miesta* (prepis intrónu do mRNA)
- *inaktivácia akceptorového zosteriového miesta* (preskočenie exónu)
- *aktivácia kryptického zosteriového miesta* (strata/získanie kódujúcej sekvencie)
- *posunová mutácia (frameshift)*
- *vznik stop kodónu (nonsense)*
- *zámena esenciálnej aminokyseliny*
- *zábrana posttranskripčných úprav*
- *zábrana správnej lokalizácie produktu v bunke* (delF508 u CF)

## Mechanizmy pôsobenia produktov s abnormálnou funkciou

- získanie nového substrátu (*deficiencia  $\alpha$ 1-antitripsínu*)
- nadprodukcia (overexpresia) (*duplikácia PMP22 u choroby Charcot-Marie-Tooth*)
- permanentne “zapnutý” receptor
- nesprávna funkcia iónového kanála
- štrukturálne abnormálne multiméry (*COL2A1 - osteogenesis imperfecta*)
- chimérický proteín (*BCR-ABL pri chronickej myeloidnej leukémii, farboslepost'*)
- agregácia proteínu (*expansion (CAG)<sub>n</sub> u Huntingtonovej chorey*)

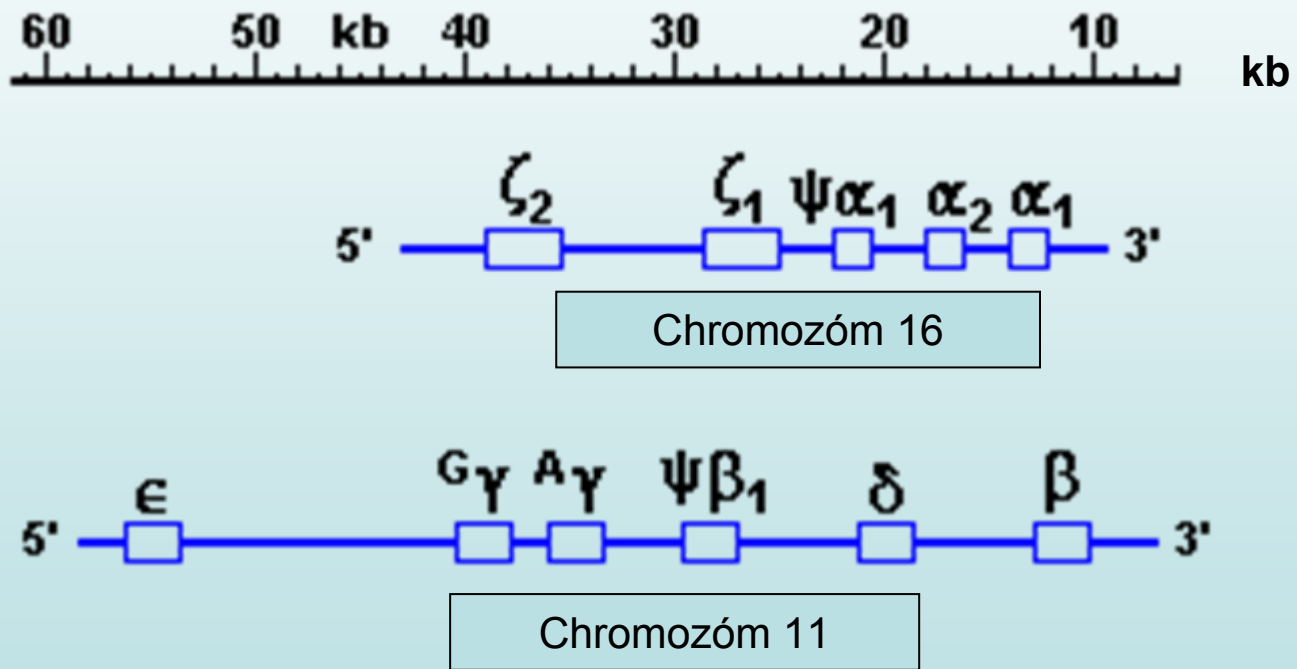
# Distribúcia génov podľa funkcie génového produktu

(923 monogénnych ochorení z OMIM)

<i>Funkcia</i>	<i>Podiel v %</i>
1. enzýmy	31
2. modulátory funkcie proteínov	14
3. receptory	10
4. transkripčné faktory	9
5. intracelulárna matrix	6
6. extracelulárna matrix	6
7. transmembránové transportéry	5
8. kanály	4
9. bunková signalizácia	4
10. hormóny	3
11. extracelulárne transportéry	2
12. imunoglobulíny	2
13. iné	4

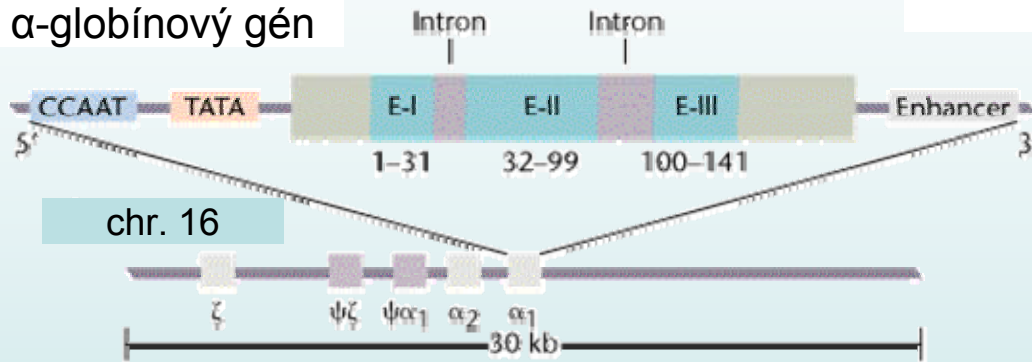
<i>Dedičnosť:</i>	F u n k c i a g é n u			
	1.	2.	3.	4.
<i>AR</i>	78	45	48	25
<i>AD</i>	12	45	48	65
<i>X</i>	10	10	4	10

# Globínové génové rodiny $\alpha$ a $\beta$

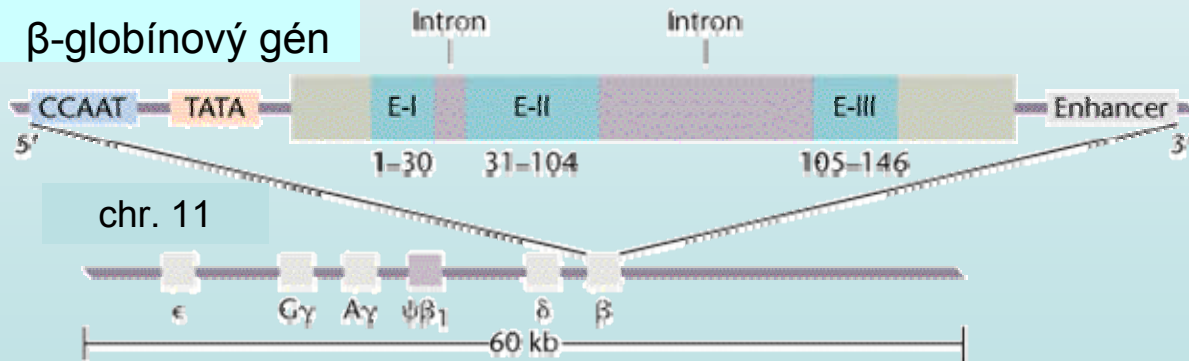


# Štruktúra globínových génov

$\alpha$ -globínový gén

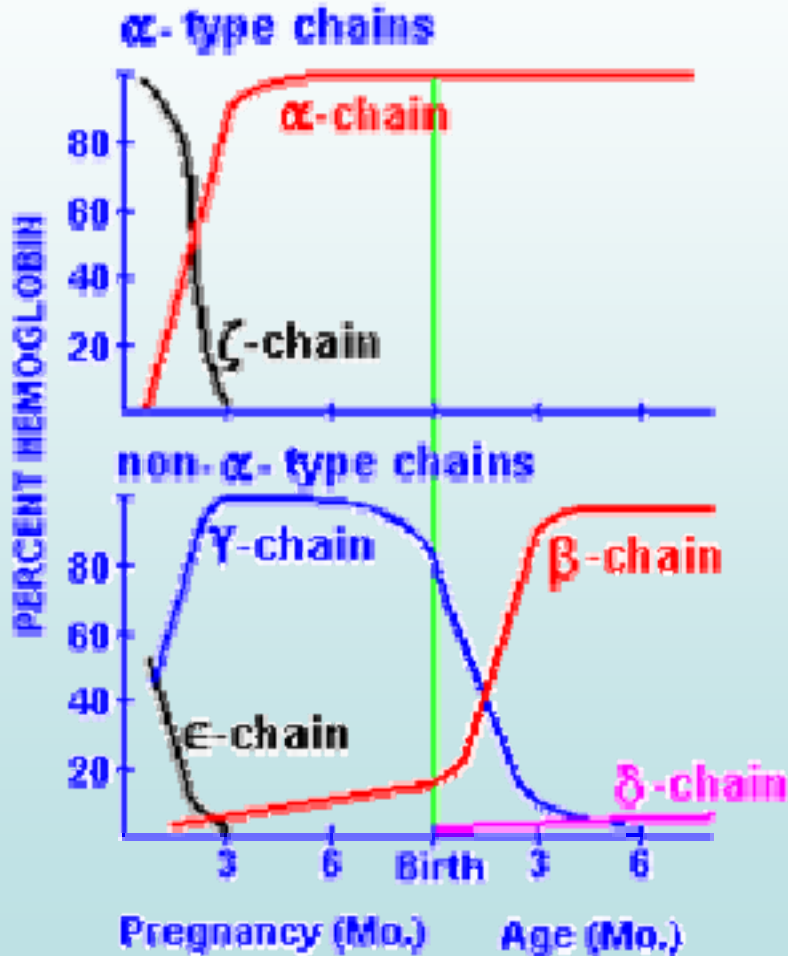
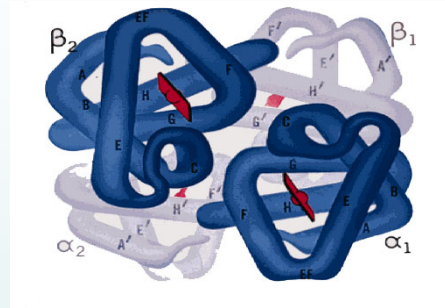


$\beta$ -globínový gén



# Expresia Hb génov v ontogenéze

Hb molekula:



Typy hemoglobínu

embryonálny **HbE** =  $\zeta_2 \varepsilon_2$

fetálny **HbF** =  $\alpha_2 \gamma_2$

adultný typ A, **HbA** =  $\alpha_2 \beta_2$

adultný typ A<sub>2</sub>, **HbA<sub>2</sub>** =  $\alpha_2 \delta_2$

# Hemoglobinopatie: zmeny štruktúry alebo kvantity Hb reťazcov

abnormálne hemoglobíny  
(zmena štruktúry)

- HbS: kosáčiková anémia



beta-globínový gén  
**Glu6Val**

- HbC: **Glu6Lys**
- HbE: **Glu26Lys**
- HbD: **Glu121Gln**

a niekoľko 100 ďalších

príčinou je mutácia v kódujúcej  
sekvencii

talasémie (väčšinou zmena  
intenzity syntézy)

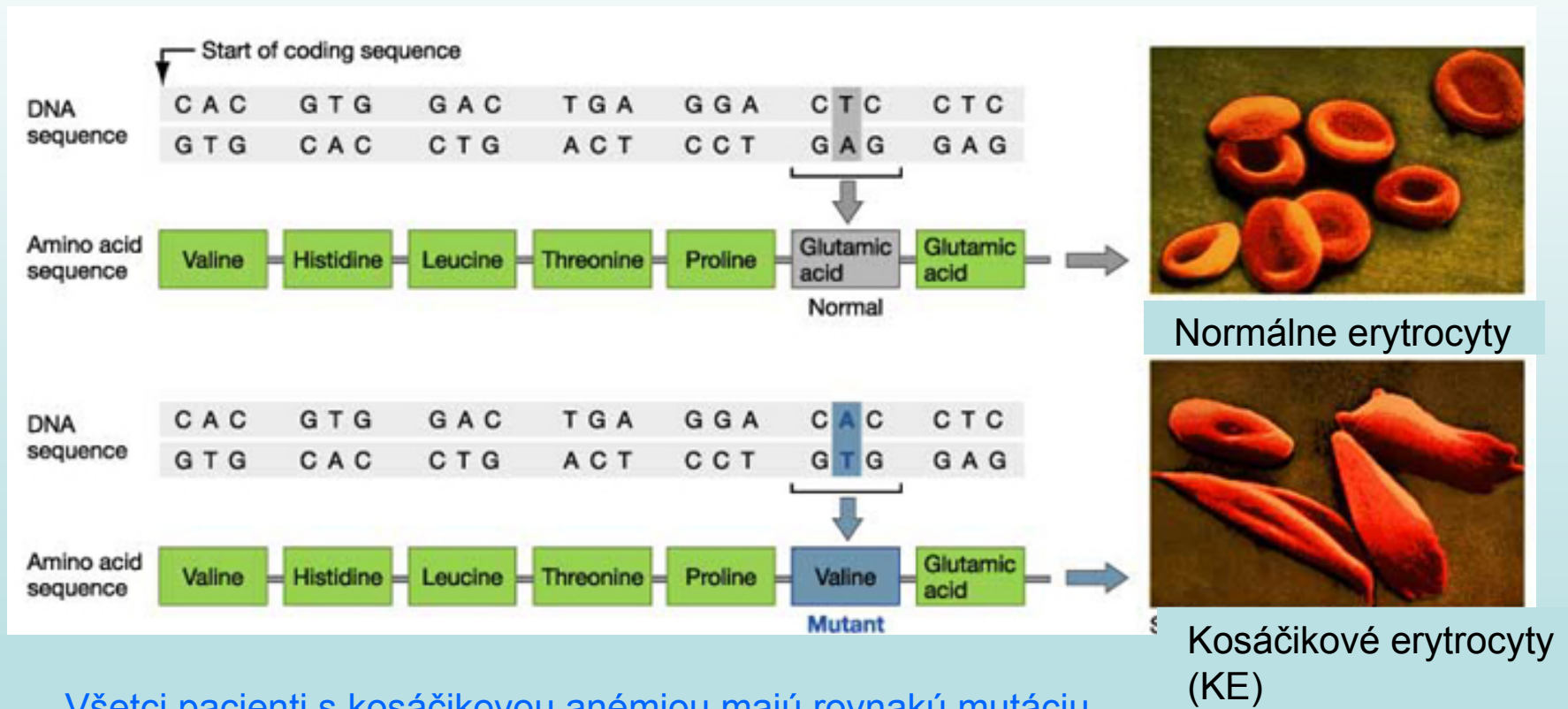
- nulová tvorba Hb polypeptidu
- znížená tvorba Hb polypeptidu
- nevyvážená tvorba polypeptidov

talasémie:  $\begin{matrix} / & \text{alfa} \\ - & \text{beta} \end{matrix}$

typy: „nula“ ( $\alpha_0$  alebo  $\beta_0$ )  
„plus“ ( $\alpha^+$  alebo  $\beta^+$ )

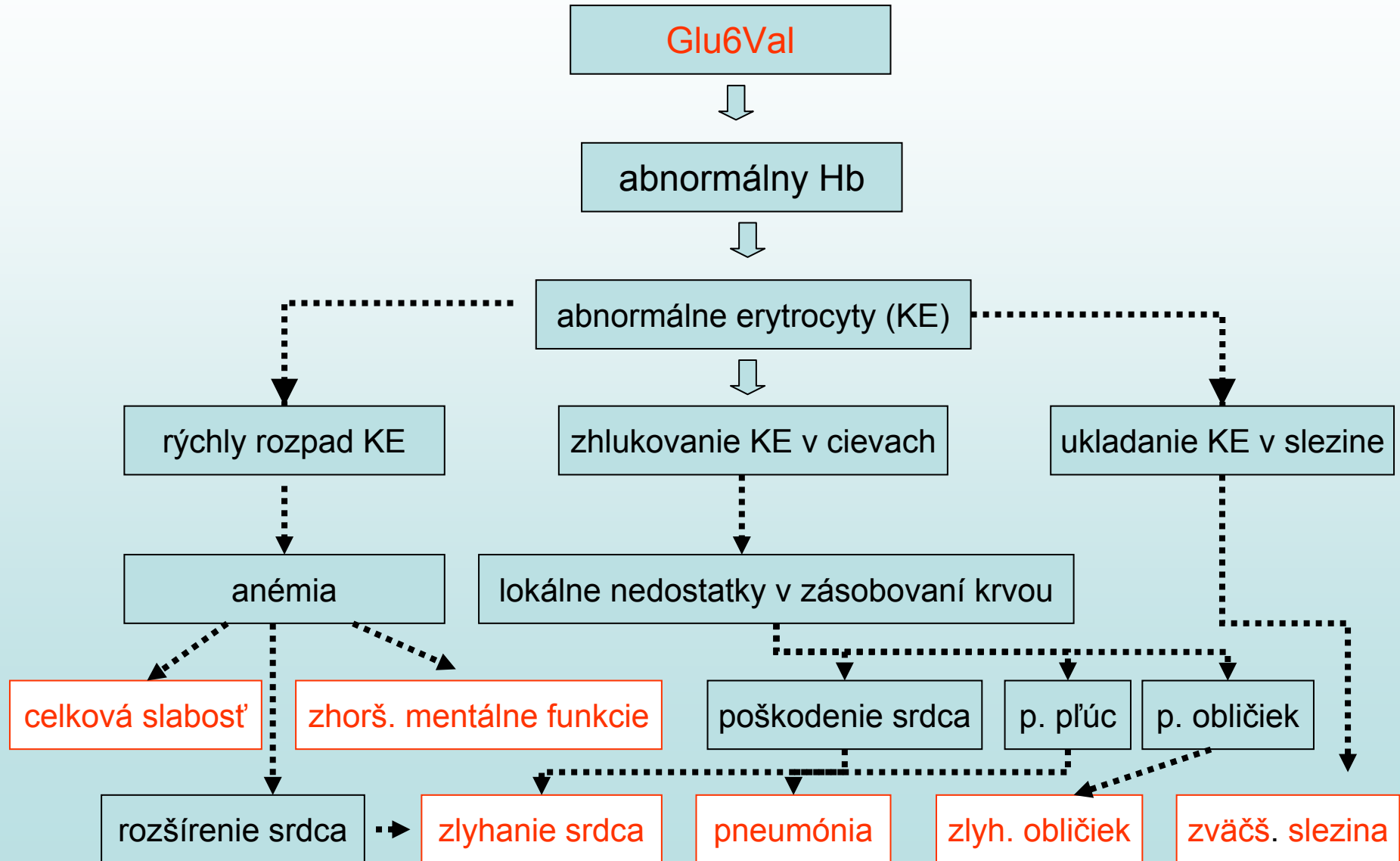
príčinou je najčastejšie  
mutácia mimo kódujúcej  
sekvencie 15

# Mutácia **Glu6Val** (E6V) v beta-globínovom géne a kosáčiková anémia



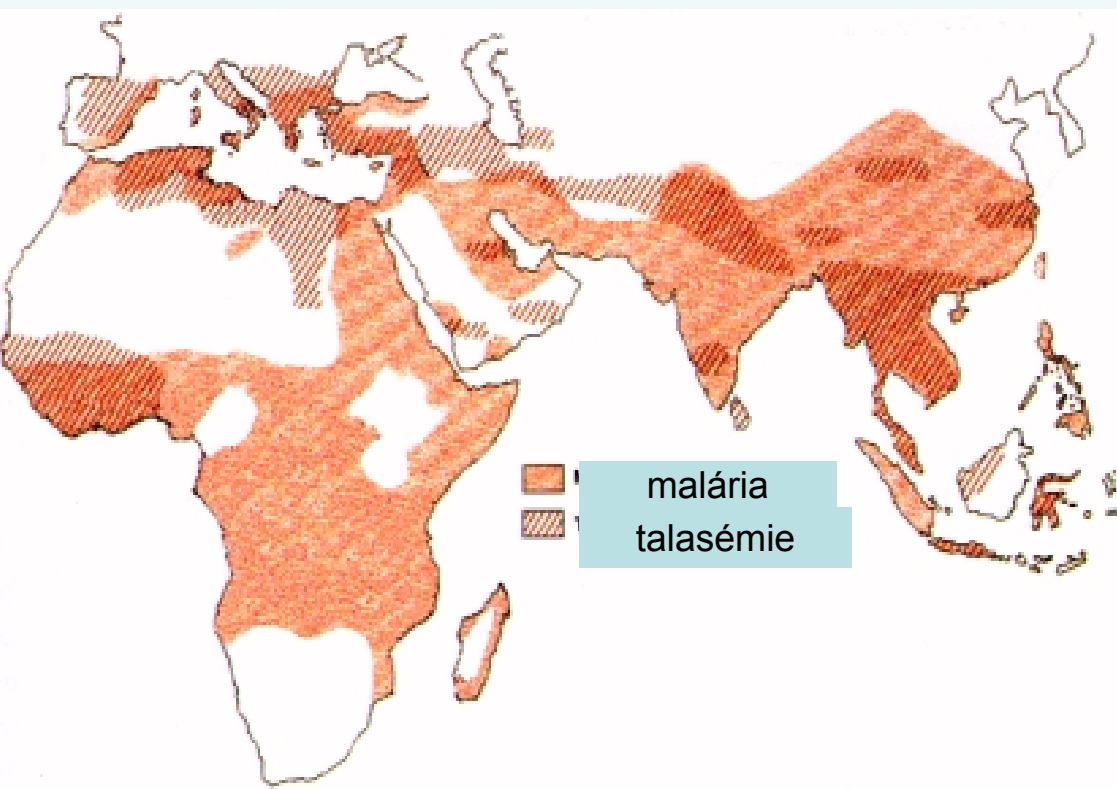


# Mutácia **Glu6Val** (E6V) v beta-globínovom géne a kosáčiková anémia: **pleiotropia**

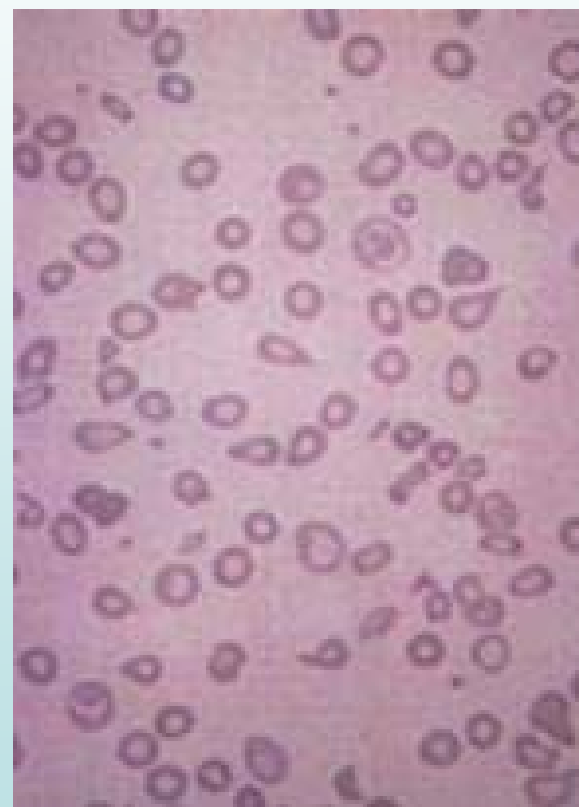


# Talasémie a malária vo svete

Talasémie a malária



Erythrocyty pri  $\beta$ -talasémii



# Typy mutácií vedúcich k talasémii 1

- **Term.** (skrátia Hb-reťazec)

... 37 38 39 40 ... pozícia AA

... His Lys Tyr His .. normálny beta-reťazec

.. CACAAGUAUCAC.. mRNA

.. CACAAGUAA mRNA s mutáciou

.. His Lys | stop

$\beta_0$ -talasémia

- **Term.** (predĺžia reťazec)

..... UAA (stop)

C A G C  
Gln Lys Glu Ser + ďalšie AA

Hb Constant Spring

C-S talasémia

# Typy mutácií vedúcich k talasémii 2

- **Frameshift**

... Ser Ile Thr Lys ... normálny beta-reťazec

.. AGU AUC AGU AAC .. mRNA

del

.. AGU AUC UAA stop

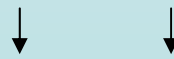
.. Ser Ile | koniec reťazca

$\beta_0$ - talasémia

- **Poruchy zostrihu** (mutácie v akcept. a donor. signálnych sekv.)



... GTGGTTGGT..



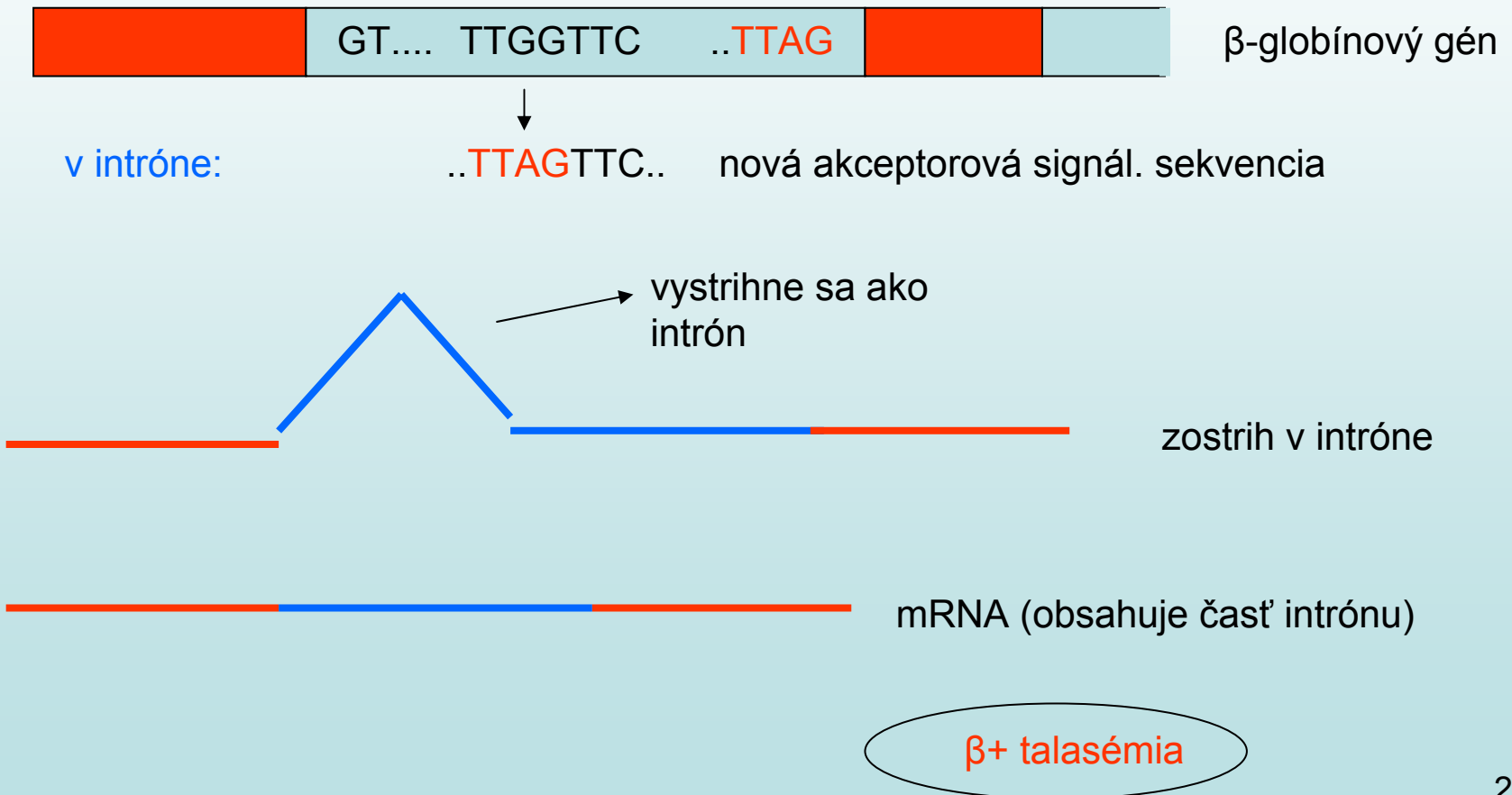
...GTGATTGGC...

$\beta_0$        $\beta^+$

$\beta_0$  alebo  $\beta^+$  talasémie

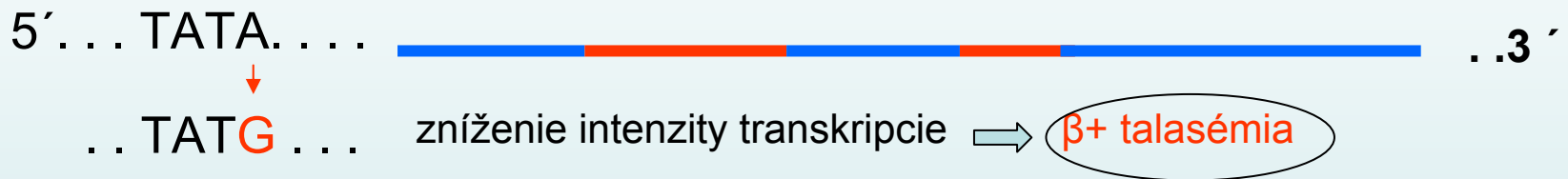
# Typy mutácií vedúcich k talasémii 3

- Vznik zostrihového signálu v intróne alebo v exóne

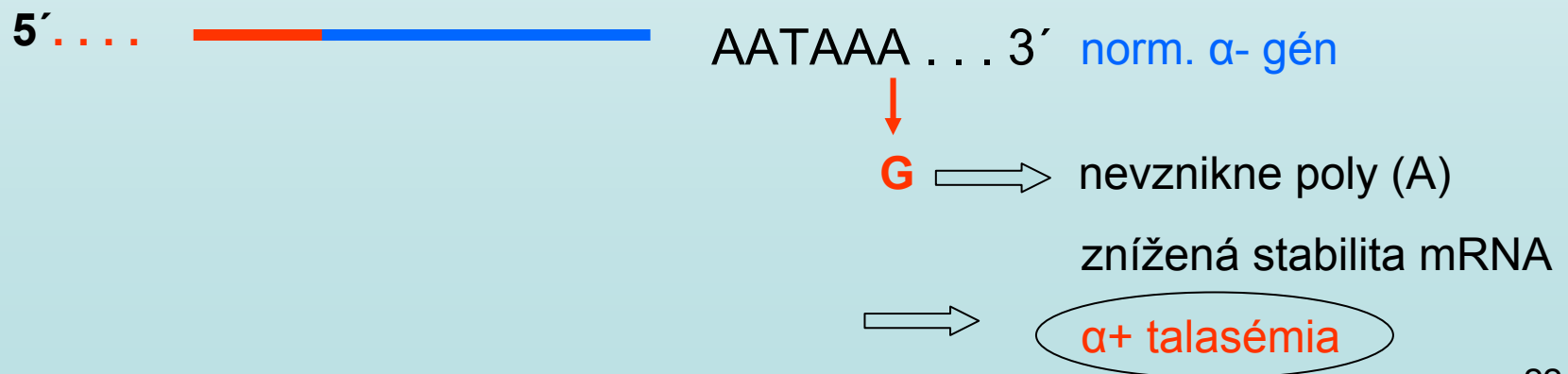


# Typy mutácií vedúcich k talasémii 4

- Mutácie v 5'-signálnych sekvenciách (TATA box, CAAT box...)



- Mutácie v poly-A signále (AATAAA)



# Typy mutácií vedúcich k talasémii 5

- Delécie globínových génov (najmä u alfa-globínov)



Známe delécie (výber):

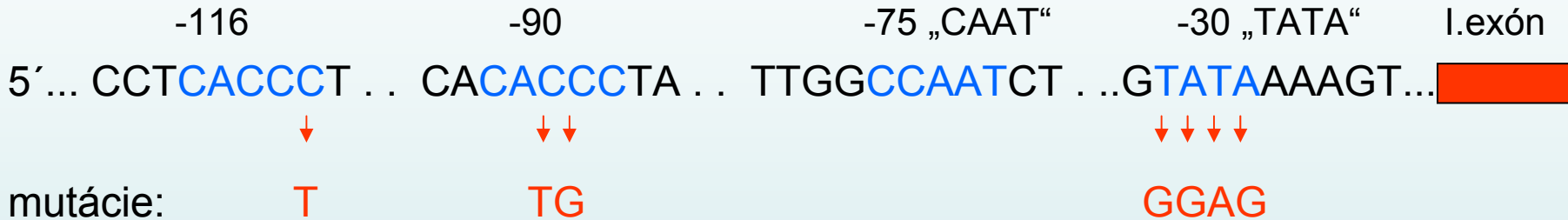


Stupeň závažnosti závisí od toho, koľko alfa-génov delécia vyradí a či je jedinec heterozygot alebo homozygot

# Typy mutácií vedúcich k talasémii 6

- Mutácie v promotorovej oblasti:**

beta-globínový gén



**Dôsledok:** rôzny stupeň redukcie množstva génového produktu → **rôzne β+ talasémie**

- Mutácie vo vzdialených sekvenciách („enhanceroch“):**



**Dôsledok:** žiadna expresia génov! – chýba **DCR** – „dominant control region“ → **β<sub>0</sub> talasémia**



# Hemoglobinopatie: záver

- Veľká **lokusová heterogenita**
- Obrovská **alelová heterogenita**
  - často pri rovnakom fenotypovom (klinickom) prejave
- Väčšina mutácií s fenotypovým (klinickým) prejavom je priamo v géne alebo v jeho tesnej blízkosti (regulačné sekvencie): dôsledok pre génovú terapiu a transgenézu
- **Model** pre iné monogénne ochorenia

# Fenylketonúria - PKU

## Všeobecná charakteristika

*PKU je zapríčinená deficienciou enzýmu fenylalanín – 4-monooxygenázy (PAH), esenciálneho pre premenu fenylalanínu na tyrozín*

- klinický prejav:
  - mentálna retardácia
  - mikrocefalia
  - poruchy správania**ale:** úspešná liečba! (eliminačná diéta)  
preto novorodenecký skríning PKU
- dedičnosť AR
- incidencia - *veľké rozdiely v rámci Európy:*
  - priemer 1 : 10 000
  - severná Európa 1 : 30 – 100 000
  - Turecko 1 : 2 600
  - **slovenskí Rómovia 1 : 1 000**

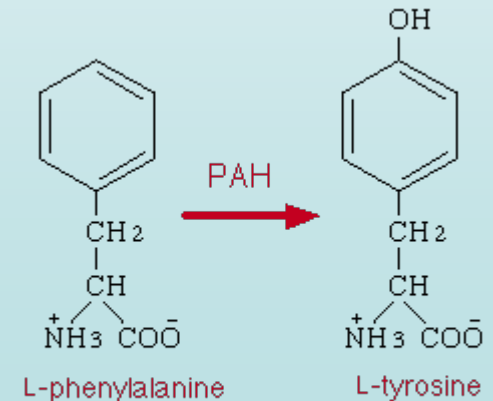


# Molekulárna genetika PKU

- **1982** – klonovanie *PAH* cDNA potkana
- **1985** – klonovaný a sekvenovaný ľudský *PAH* gén (Kvok 1985) – imunoprecipitácia na polyzómoch pomocou protilátky proti *PAH*

## Gén *PAH*

- lokalizácia: **12q22-q24.1**
- dĺžka: **90 kb**
- počet exónov: **13** (57 – 892 bp)
- mRNA: **2,4 kb**
- expresia mRNA: **len v pečeni**
- polypeptid: **fenylalanin - 4 – monooxygenáza**  
(fenylalanínhydroxyláza, **PAH**)
  - dĺžka monoméru: 452 AA (50 – 52 kDa)
  - funkcia: premena fenylalanínu na tyrozín:



# Mutácie v géne *PAH*

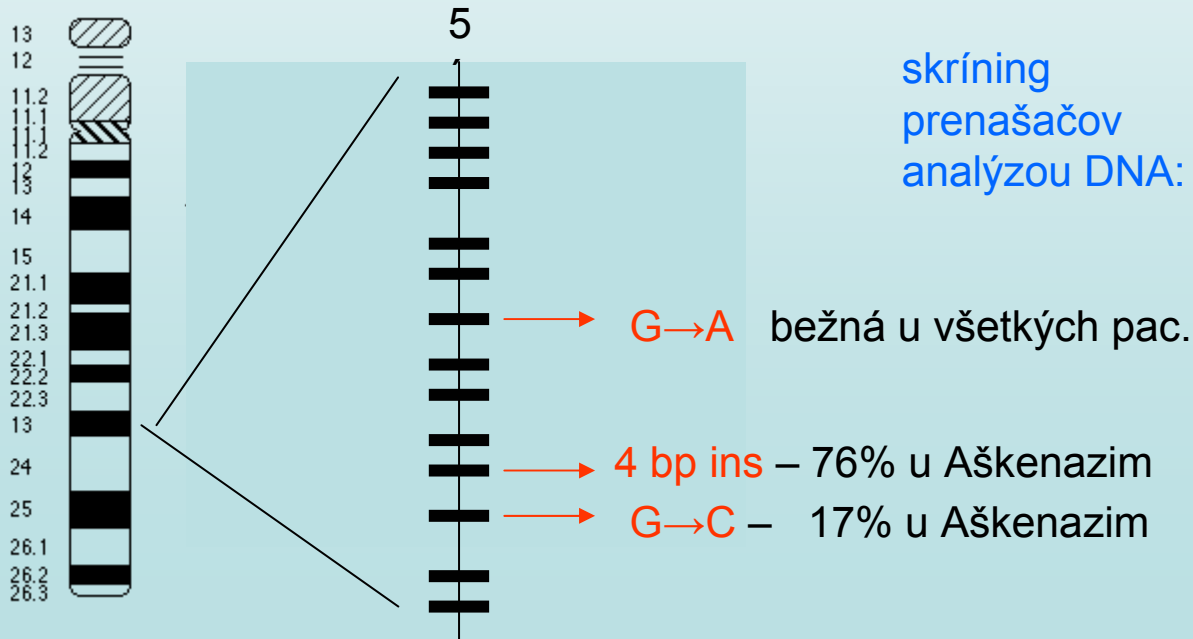
- počet známych mutácií (2004): > 460
  - 63 % meniace zmysel
  - 13 % delécie
  - 11 % zostrihové mutácie
  - 5 % stop mutácie
  - 1 % inzercie
- väčšina mutácií asociovaná s určitým polymorfným DNA haplotypom
- haplotypová analýza: **v Európe aspoň 4 founder populácie:**
  - **IVS12nt1** (3) – škandinávsky pôvod
  - **R408W**
    - haplotyp 1.8 – keltský pôvod (Írsko)
    - haplotyp 2 - balticko-slovanský pôvod
  - **IVS10nt546** (6) - mediteránny pôvod

# Tay-Sachsova choroba (GM2-gangliosidóza)

- dedičnosť: **AR**, letálne ochorenie (3-5 r.)
- početnosť: Aškenazim 1 : 3500 (prenašači 1 : 30), inde zriedkavo
- chýba enzým : beta-hexózoaminidáza–  **$\alpha$**  → gén **HEXA** - **Tay-Sachs**  
 --  **$\beta$**  → gén **HEXB** (Sandhof.ch.)

Gén **HEXA** získaný **imunoprecipitáciou na polyzómoch** → cDNA → sonda pre gDNA knižnice a in situ hybridizáciu (15q23-24)

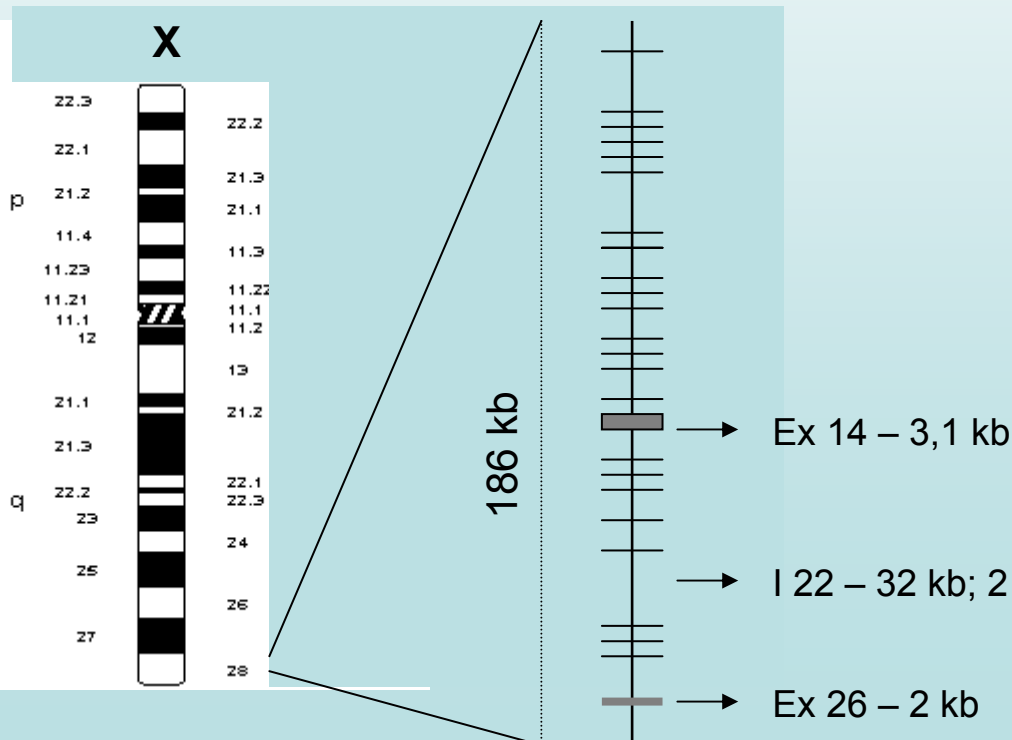
Gén: 35 kb, 14 E, cDNA: 1944 bp → 529 AA



dve časté mutácie v jednej populácii: selekcia? TBC??

# Hemofília A

- dedičnosť: **XR**, donedávna ťažké formy letálne, dnes liečiteľná
- početnosť: cca 1 : 7000 chlapcov
- deficit faktora 8 z kaskády reakcií premeny fibrinogénu na fibrín (zráž. krvi)
- gén **F8** na Xq28, klonovaný v r. 1984 funkčným klonovaním: **186 kb, 26 E**  
od 69 bp po 3106 bp; **cDNA: 9 kb**, najdlhší intrón 32 kb, obsahuje 2 gény a CpG

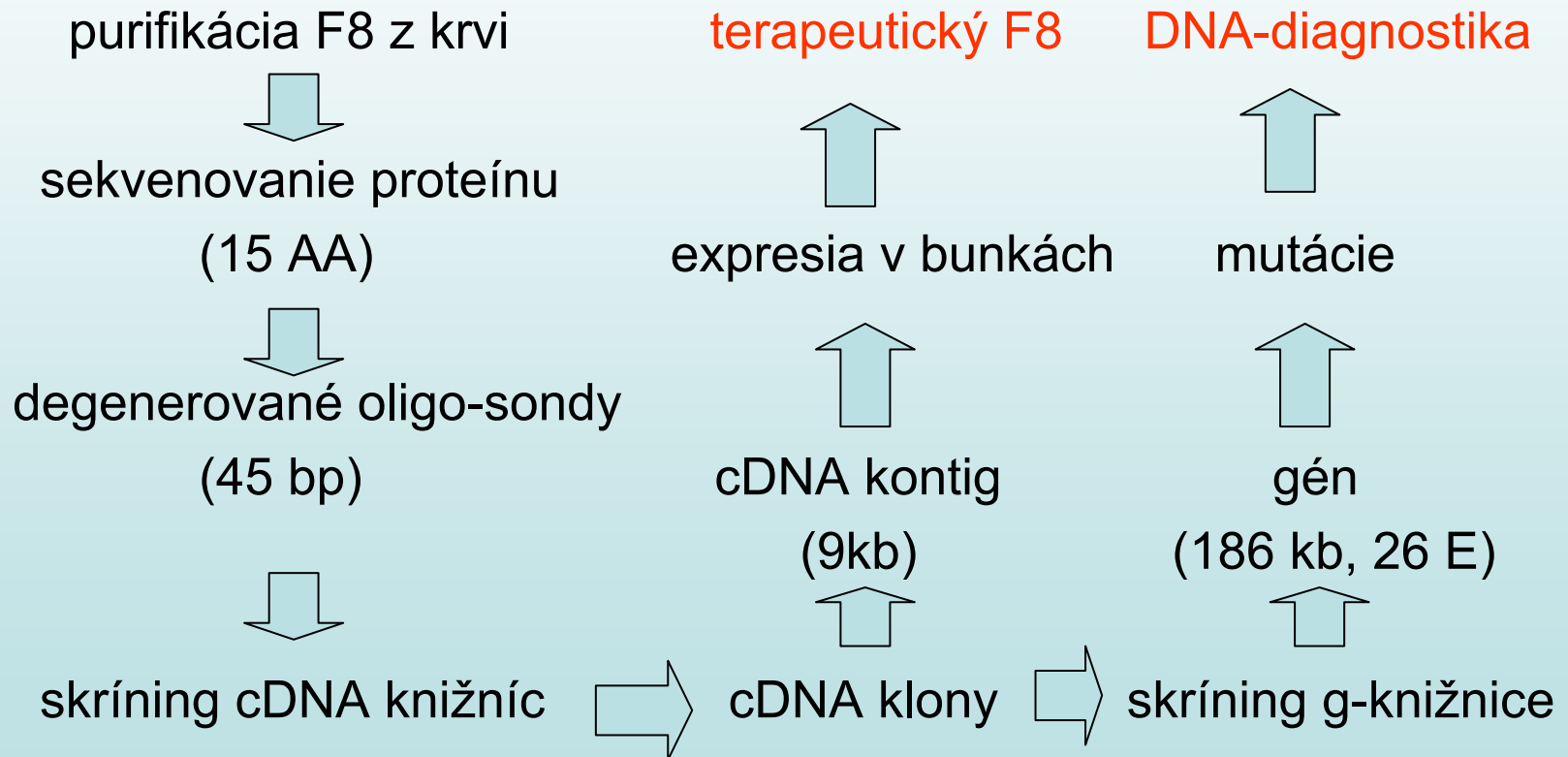


**Mutácie:** tretina prípadov nové mutácie  
**obrovské spektrum**, časté splicingové m  
v intrónoch, známe aj inzercie L1  
sekvencie do exónu

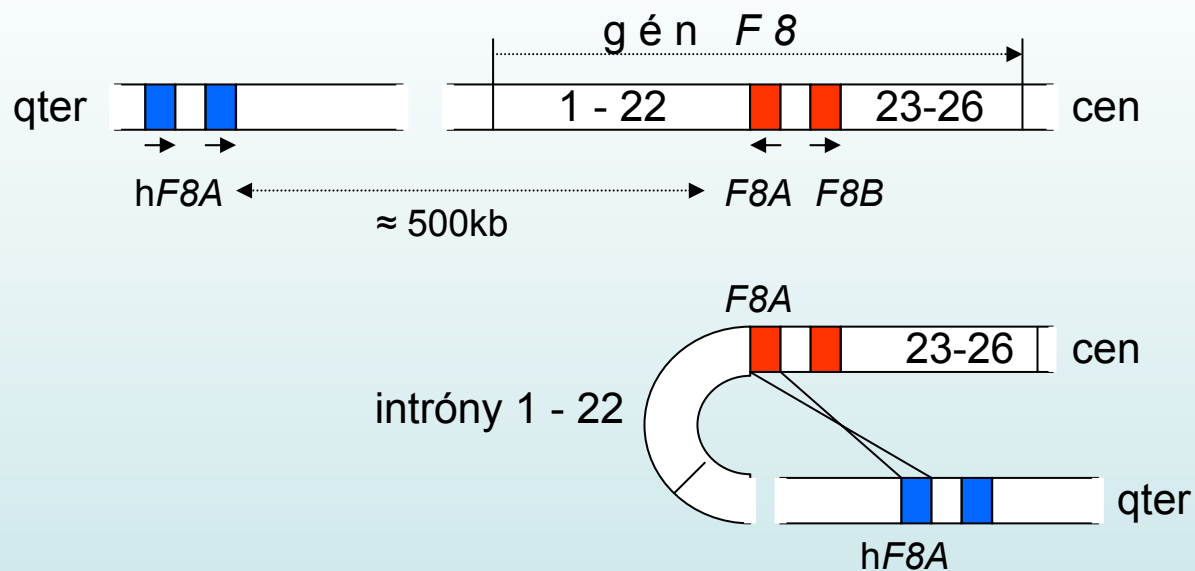
**Najčastejšia mutácia (45%): inverzia**  
časti *F8* génu → rekombinácia medzi  
*F8A* v intróne 22 a *hF8A* 500 kb pred *F8*

# Funkčné klonovanie génu pre faktor F8

(Gitschier et al. 1984)



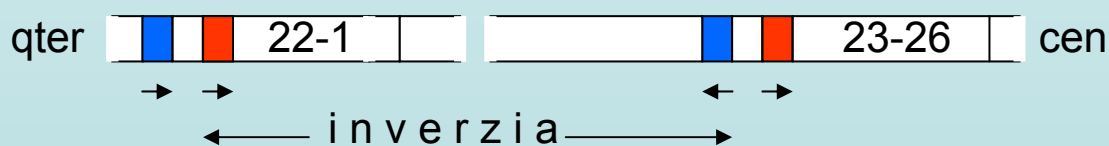
# Inverzia v géne *F8*: najčastejšia príčina hemofílie A



v intróne 22 sú gény *F8A* a *F8B*; 500kb pred génom homológy *F8A* (*hF8A*)

→ ← orientácia génov

vnútrochromatídová rekombinácia medzi *F8A* a *hF8A*

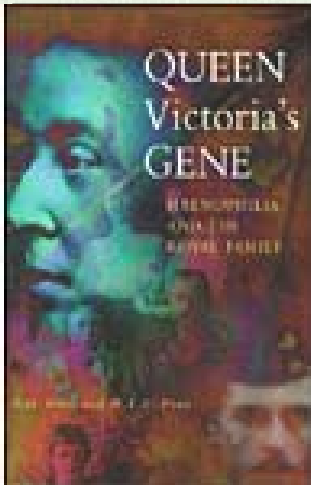
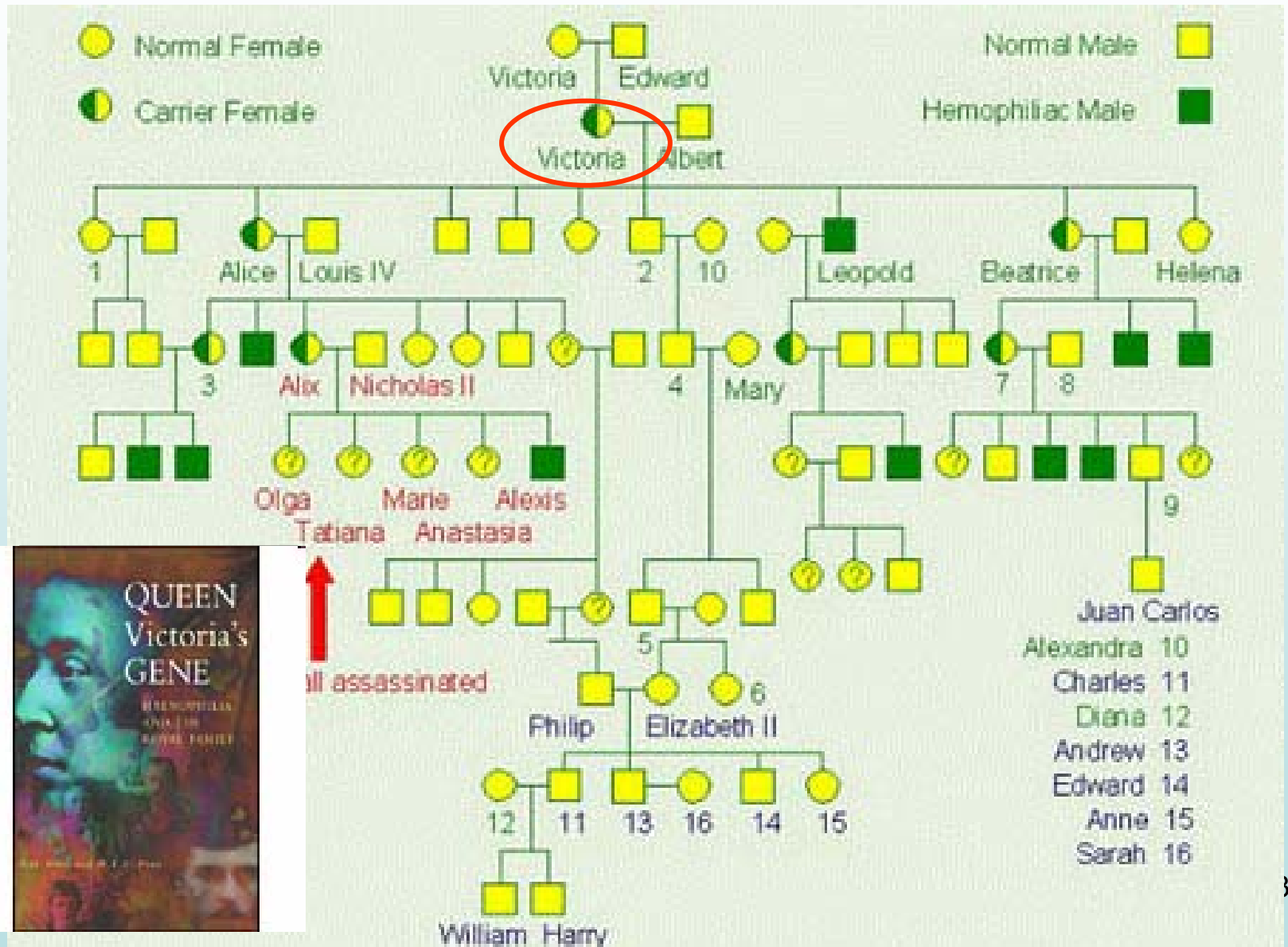


inverzia časti *F8* génu

približne 45% všetkých mutácií *F8* génu pri hemofílii A predstavuje táto inverzia



# Hemofília A u potomkov kráľovnej Viktórie



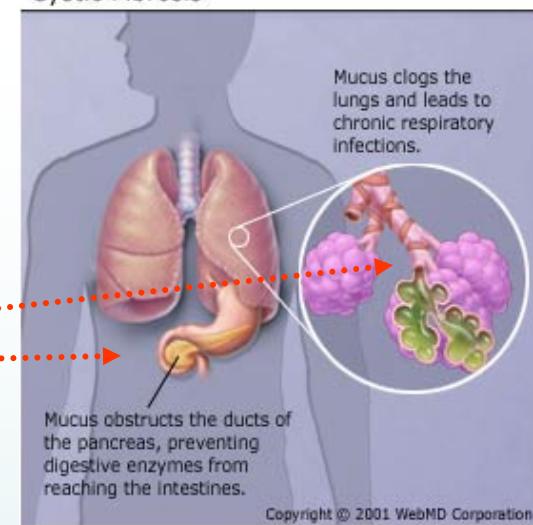
# Cystická fibróza

Dedičnosť: **AR**, početnosť cca **1 : 2000**  
(prenašači 1 : 25)

Väčšinou závažné, geneticky letálne ochorenie

Gén **CFTR** pozične klonovaný r. 1989

## CFTR gén a proteín



gDNA: 250 kb, 27 E

cDNA: 6129 bp

proteín: 1480 AA

**CFTR**: Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator

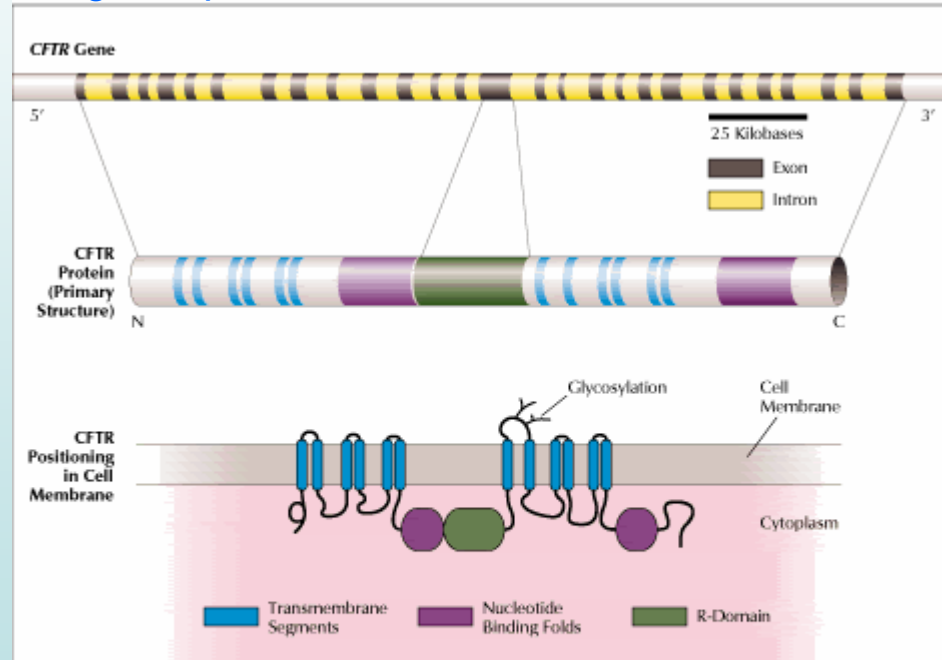
prenos chloridových iónov  
známych >1200 mutácií

2 choroby: **CF** a **CBAVD**

20-90 %: **F508del** ( $\Delta F508$ )

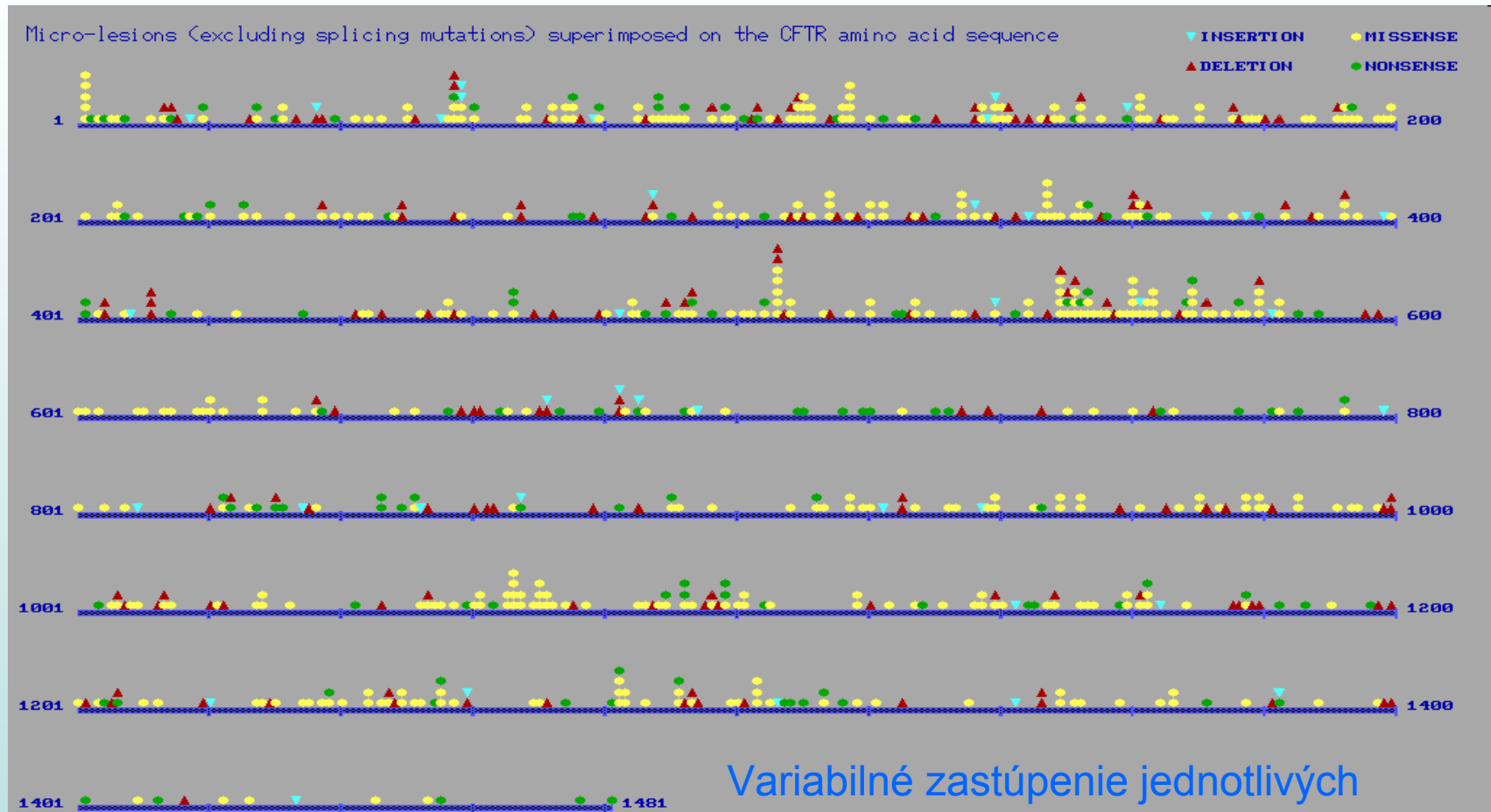
Selekcia v prospech heterozygotov?

Cholera? Týfus?



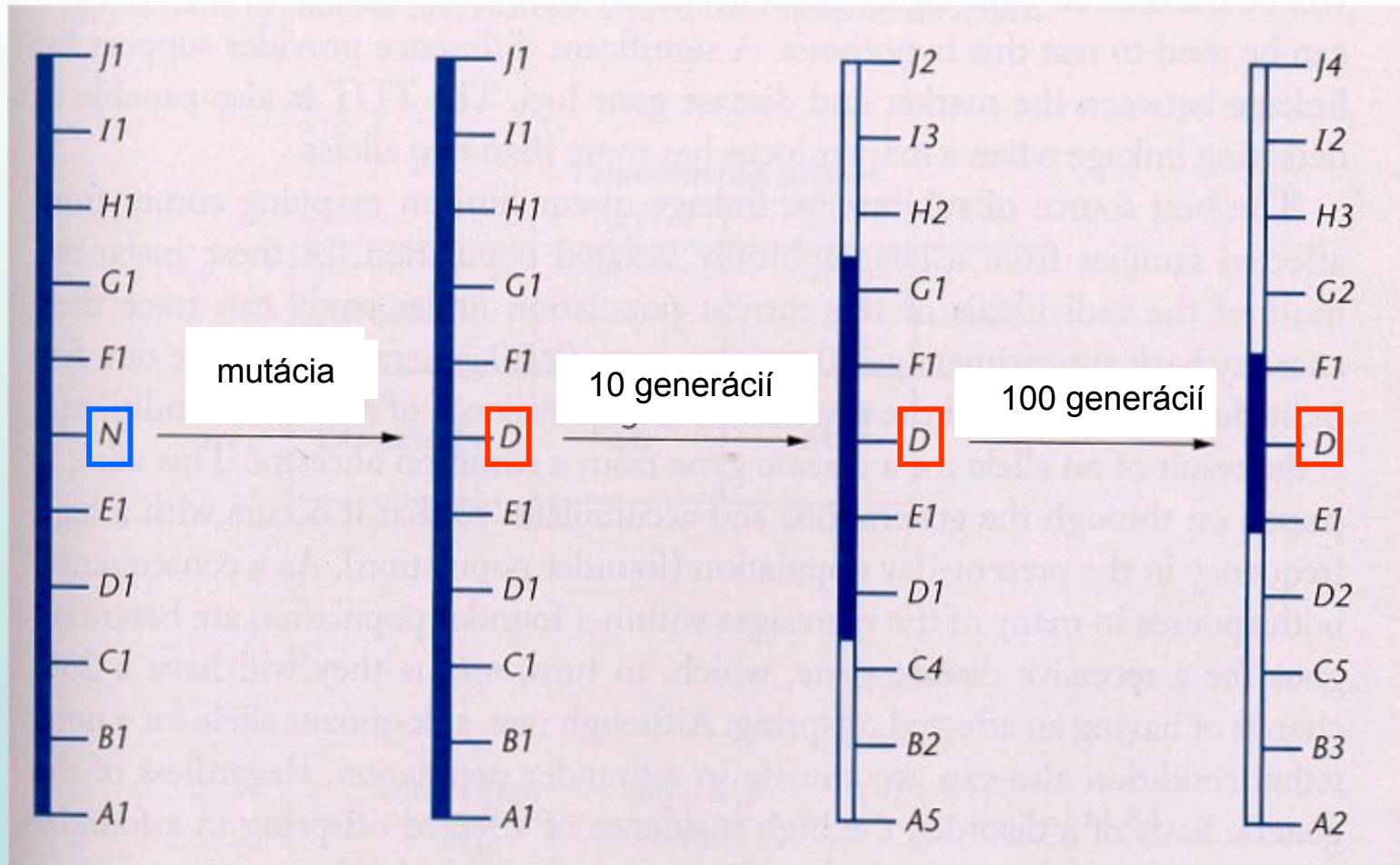
Vek mutácie F508del a haplotypová analýza

# Mutácie v *CFTR* géne pri cystickej fibróze



Variabilné zastúpenie jednotlivých mutácií v rozličných populáciách; napr. **F508del** od **<20%** (Balkán) až po **> 90%** (Škandinávia); u nás cca **60%**

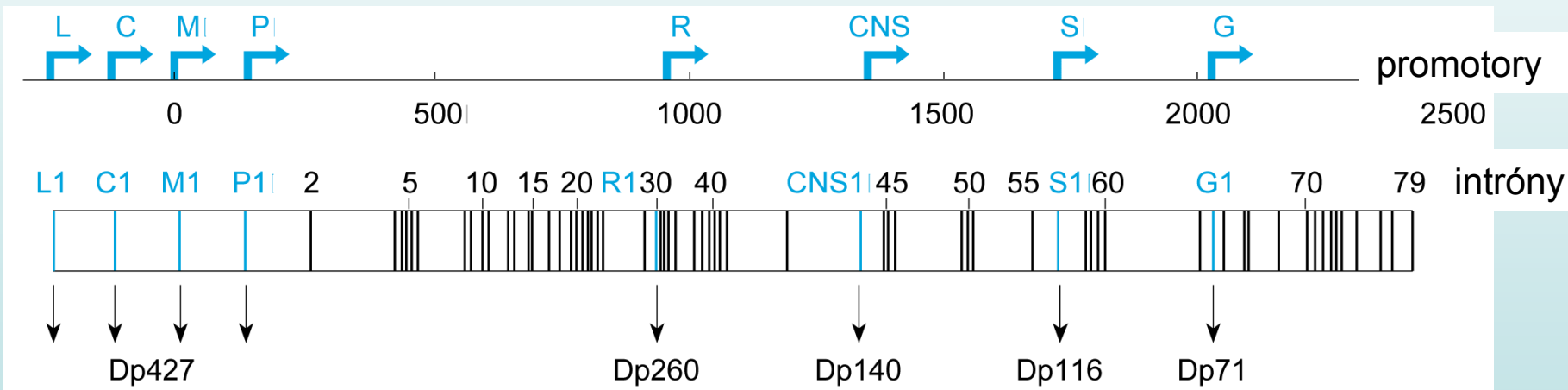
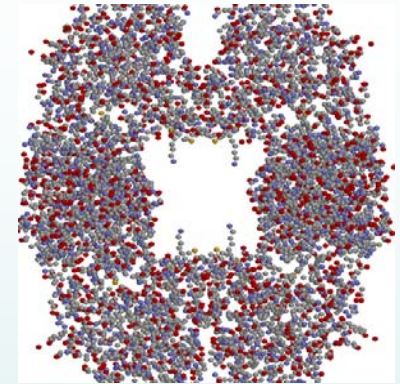
# Princíp odhadu veku mutácie pomocou rozsahu kosegregujúceho DNA haplotypu



A, B, C, ... atď – jednotlivé polymorfné DNA markery v okolí mutácie

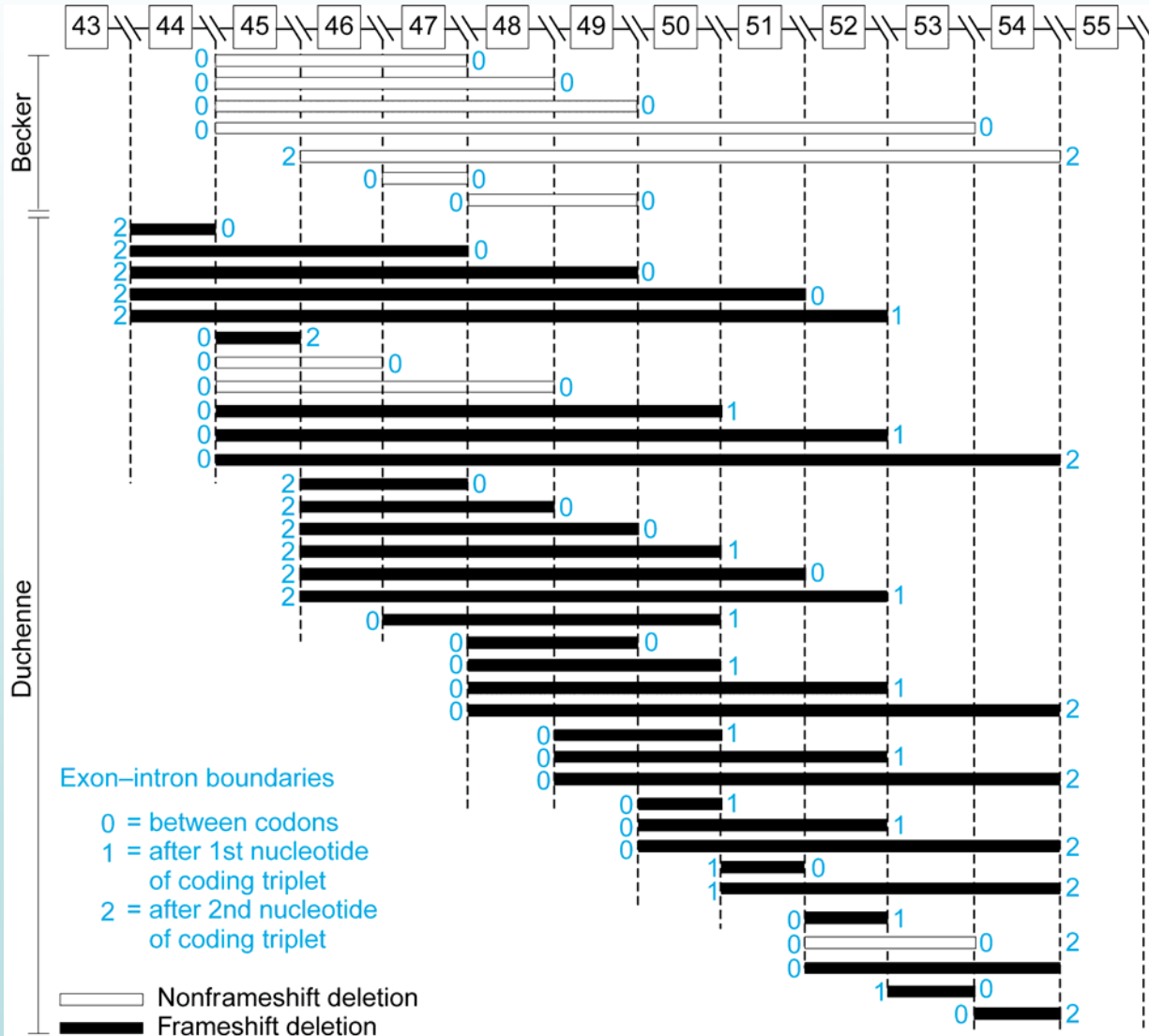
# DMD a BMD: g3n pre dystrof3n a jeho alternat3vny splicing a expresia v rozli3n3ch typoch buniek

- 79 ex3nov; mimoriadne dlh3 intr3ny
- extr3mna d3lka g3nu (2400 kb)
- najmenej 8 promotorov; bunkovo-špecifick3 expresia (alternat3vny splicing)



L – lymfocyty, C – cortex, M – sval, P – Purkyn3ho bunky; R – retina; CNS-CNS Mw dystrof3nov3ch (Dp) izoforiem od 427 kD aŝ po 71 kD

# Duchenneova a Beckerova svalová dystrofia: typy delécií v géne pre dystrofín (Xp21.3)



**DMD:** XR dedičná letálna forma sval. dystrofie, 1:3500 chlapcov

**BMD:** tiež XR, miernejšia, zriedkavá

**gén:** 2400(!) kb, 79 E

**mutácie:** časté *de novo* delécie rôznych dĺžok

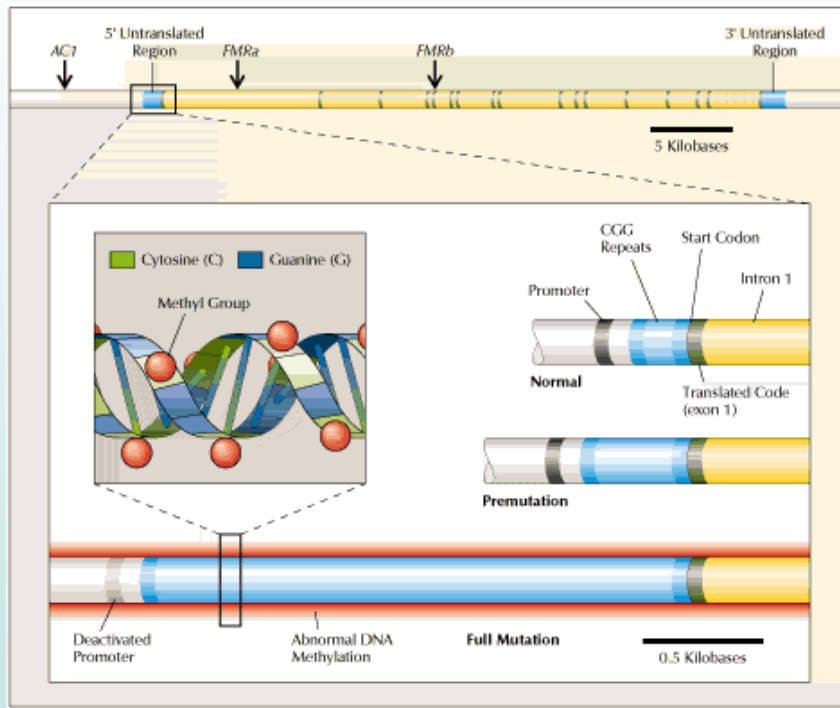
**DMD:** frameshift, **BMD:** in frame

mimoriadne vysoká frekvencia mutácií: je príčinou extrémna dĺžka génu?

# Patogénny potenciál repetitívnych sekvencií

- genóm cicavcov obsahuje veľký podiel repetitívnych sekvencií
- tandemové opakovania krátkych úsekov sa vyskytujú aj v génoch
- tie oblasti sú náchylné na “posunuté párovanie” (*slipped strand mispairing*)
  - VNTR/STR v nekódujúcich oblastiach
  - delécie/adície v kódujúcich oblastiach
- **expanzie** (*ak presahujú určitú hranicu*)
  - zatiaľ popísané len v ľudskom genóme
  - základnou sekvenciou je trinukleotid
  - stabilné a bez patologického efektu v určitom rozmedzí
  - nestabilné s patogénnym efektom po prekročení urč.hranice (mechanizmus expanzie neznámy)
- **anticipácia** - závažnosť ochorenia sa stupňuje (alebo vek nástupu klesá) v generáciách nasledujúcich za sebou (myotonická dystrofia)

# Syndróm fragilného X: gén *FMR1* - expanzia $(CGG)_n$



*FMR1* gén na lokuse **FRAXA** na  
Xq27.3

**norma:** 6 – 54 repetícií tripletu CCG  
v 5'-UTR

**premutácia:** 50 – 200 repetícií,  
nestabilná

**plná mutácia:** 200 - 1700 repetícií;  
somatická variabilita



# Priónové choroby: kuru, CJD, GSS, FFI

Skupina neurodegeneratívnych ochorení (tzv. transmisibilné spongiformné encefalopatie, TSE), vyvolaných „infekčnými“ proteínmi - priónmi

- kuru: kmeň Foré na Papua–Nová Guinea (50.- 60. roky, kanibalizmus)
- Creutzfeldt - Jakobova choroba (CJD): všade, cca 1:10<sup>6</sup>/rok
- Gerstmann - Straussler- Scheinkerova choroba (GSS) – zriedkavá
- fatálna familiárna insomnia (FFI) - zriedkavá

u zvierat: scrapie – ovce, známa od 17. storočia

BSE – kravy, epidémia v UK, 90. roky, 130 000 zvierat

Formy CJD: - dedičná (AD s neúplnou penetranciou) – 10-15%, nižší vek

- sporadická: 1 : 10<sup>6</sup>/rok – 85-90%, vek obyčajne nad 60 r.

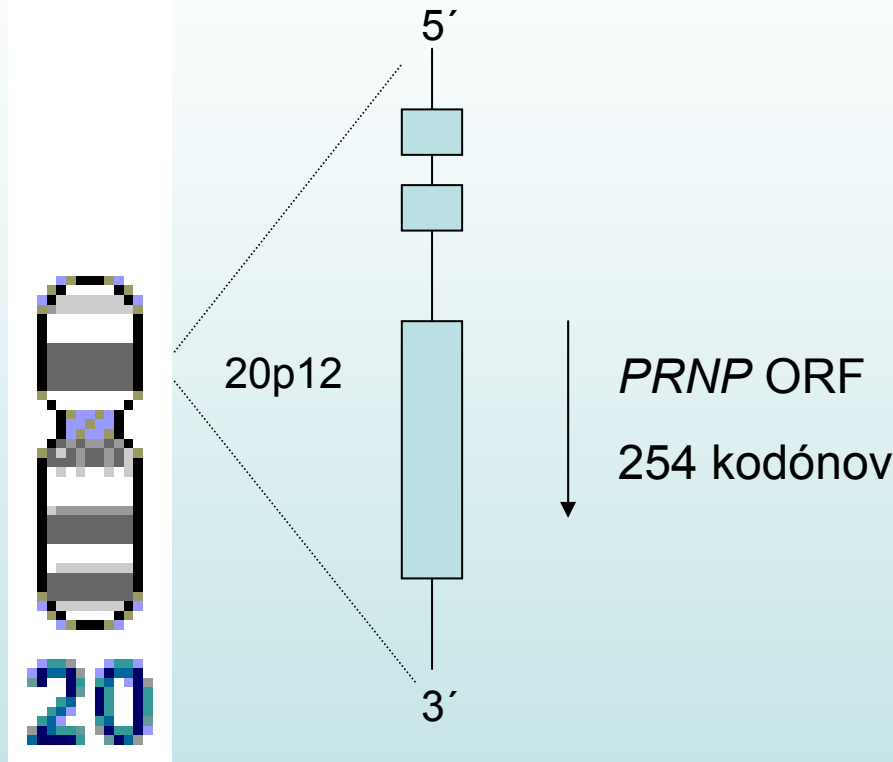
- infekčná: veľmi zriedkavá, hlavne iatrogénny prenos, ale možno aj zo zvierat (mäsom)

# Dedičná forma CJD: mutácia v géne *PRNP*

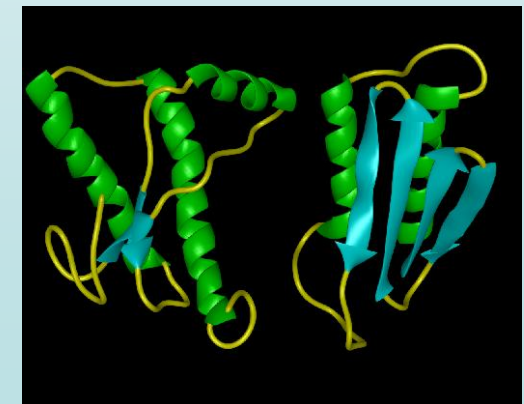
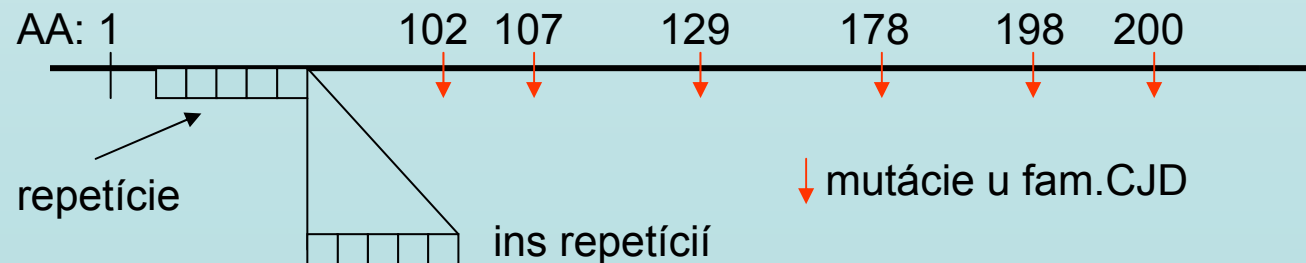
*PRNP* gén bol získaný skríningom cDNA knižníc z CNS degener. oligosondami na základe sekvencie proteínu z ovce

**Génový produkt:** PrPC proteín, exprimovaný na povrchu neurónov a lymfocytov; evolučne konzervovaný

**Mutácia *PRNP* génu** ho zmení na PrPSc proteín (**prión**): ten je infekčný! – mení „na svoj obraz“ ostatné PrPC proteíny



*PRNP* ORF  
254 kodónov



PrPC

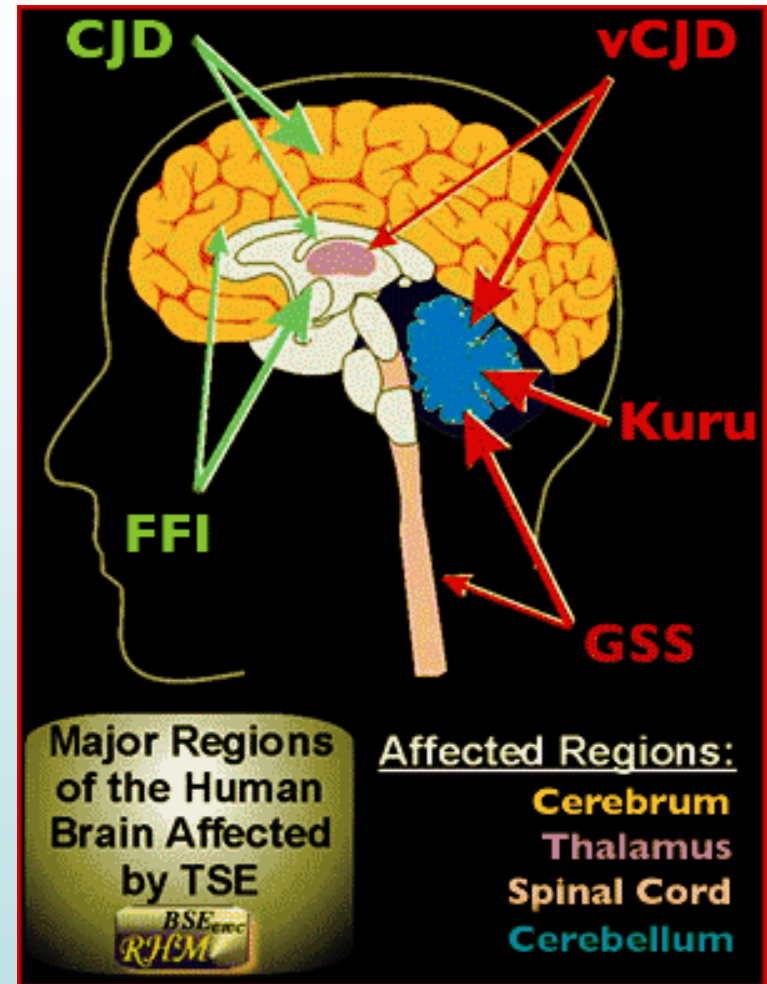
PrPSc

# CJD, GSS, FFI: jeden gén – tri ochorenia

Rozličné mutácie v *PRNP* géne zapríčiňujú buď fam. CJD (najčastejšie, najviac známych mutácií), alebo GSS, príp. FFI: **jeden gén – viac ochorení**

**sporadická forma CJD**: somatická mutácia v *PRNP* géne → vznikne PrP<sup>Sc</sup> proteín, ktorý modifikuje postupne ostatné PrP<sup>C</sup> proteíny v neurónoch na PrP<sup>Sc</sup> → dlhá latencia, vysoký vek nástupu

„infekcia“ zo zvierat (ovce so scrapie, hoväzdí dobytok s BSE): **vCJD** (variantný CJD) ~150 prípadov v GB, mladší vek, zatiaľ nejasná etiológia



**Zaujímavosť**: myši s knock-out *PRNP* génom sú zdravé a neochorejú na TSE 43