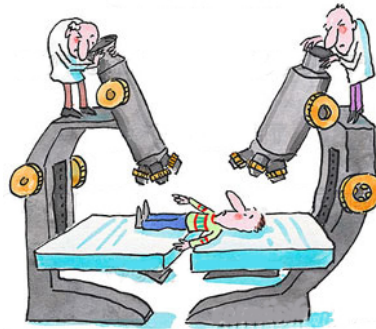


Molekulární patologie

Doc. MUDr. Kateřina Kaňková, PhD.
Ústav patologické fyziologie LF MU
UKB – Kamenice 5 – bud. A18
mail: kankov@med.muni.cz



1

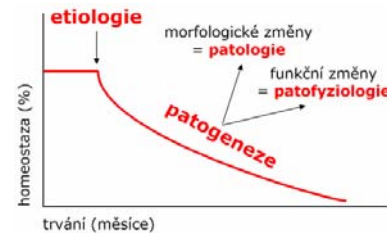
Program

- 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

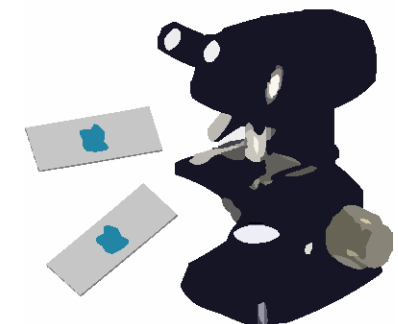


3

Metody klasické patologie

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

metody klasické patologie



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,

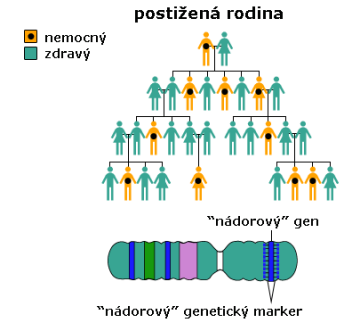
metody molekulární patologie



5

Lékařská genetika

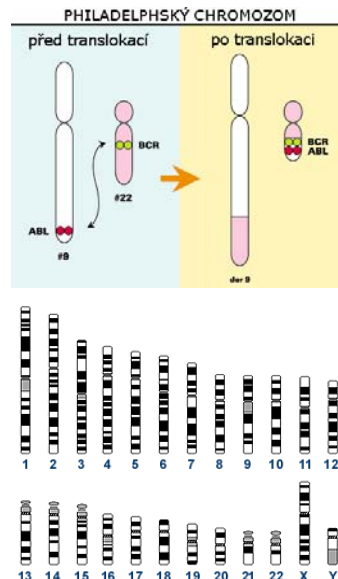
- obor zabývající se převážně **monogenními, vrozenými nemocemi**
 - mendelistická dědičnost
 - autozomální
 - recesivní
 - dominantní
 - kodominantní
 - gonozomální
 - tzv. **geny velkého účinku**
 - 1 gen = 1 nemoc
 - ale např. CF >500 mutací, LDL receptor >700 mutací
- náplň oboru:
 - patogeneze
 - diagnostika a predikce
 - poradenství
 - screening



6

Diag. využití mol. patologie

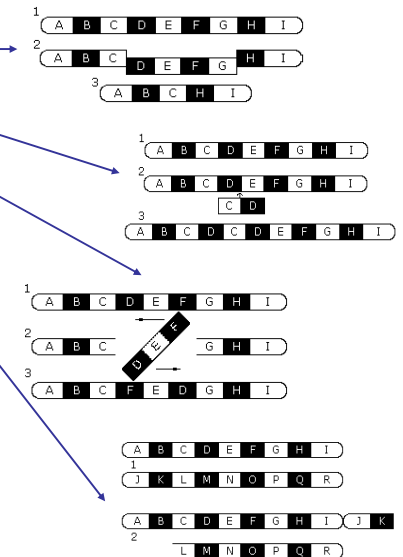
- Onkologie**
 - detekce zbytkové choroby po chemoterapii (MRD) a relapsu
 - zpfesnění klasifikace tumorů
 - chromosomální translokace (RT-PCR detekce bcr-abl mRNA, t(9;22)
 - mutace onkogenů, supresorových a reparačních genů
 - mozaicismus po allogenní BMT
- Hematologie**
 - koagulopatie (poruchy kr. srážení)
 - hemofilie, von Willebrandova choroba, ...
 - familiární trombofilie
 - Factor V Leiden, protrombin 20210A, C677T MTHFR,
 - anemie/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 a diety (= nutrigenetika)
 - MTHFR,
 - identifikace genet. faktorů ovlivňujících efekt léčby (= farmakogenetika)
 - cytochrom P450 (CYP2D6,
- Forenzní patologie**
 - DNA fingerprinting
 - DNA profiling
 - paternita



7

Klasifikace mutací

- (A) **strukturní = podle mechanismu vzniku**
 - dělkové
 - 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)
- (B) **poziční = podle pozice v genu (lokalizace mutace vs. efekt)**
 - 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
- (C) **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



8

Funkční klasifikace mutací

- (1) "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
 - delece celého genu nebo části genu
 - porušení struktury bodovou mutací (missense resp. non-synonymní mutace)
 - translokace, inverze nebo inserce do genu
 - porucha transkripce
 - promotorová mutace snižující mRNA
 - pokles stability mRNA
 - frameshift mutace
 - inaktivace místa sestřihu nebo vytvoření alternativního místa sestřihu nebo nonsense mutace
 - porucha posttranslační modifikace
 - porucha celulární lokalizace
 - porucha parenterálního imprintingu a metylace

9

Funkční klasifikace mutací

- (2) "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

10

Funkční klasifikace mutací

- (3) "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
 - 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

11

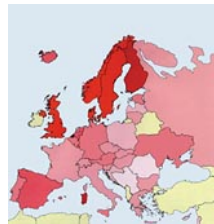
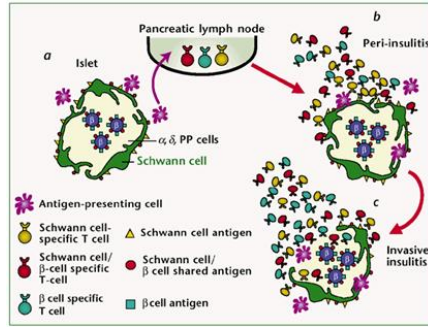
Využití mol. patologie k pochopení etiopatogeneze nemocí

- Příklady
 - (A) diabetes mellitus
 - (příklad 1) typ 1 (T1DM) ~5%
 - (příklad 2) maturity-onset diabetes of the young (MODY) ~1%
 - typ 2 (T2DM) ~90%
 - (B) primární hyperlipoproteinemie
 - (příklad 3) familiární hypercholesterolemie

12

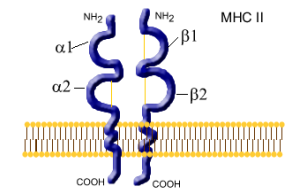
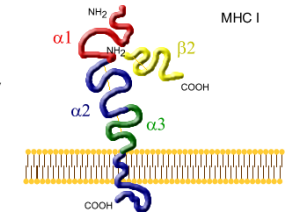
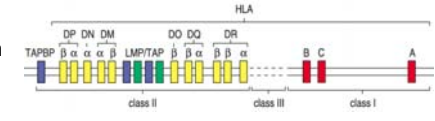
(A) T1DM – příklad 1

- 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
 - zarděnky, spalničky, coxsackie B, CMV, EBV, enteroviry, retroviry)
 - zevní faktory
 - proteiny kravského mléka - příliš brzy!
 - nedostatek vitamínu D (severojižní gradient)
 - sev. Evropa >>> prevalenci než jižní - slunce??
 - toxiny (dieta, voda, bakterie)
- dynamika
 - manifestace obvykle v dětství, ve většině případů autoimunita dokončena, absolutní závislost na exogenním inzulínu

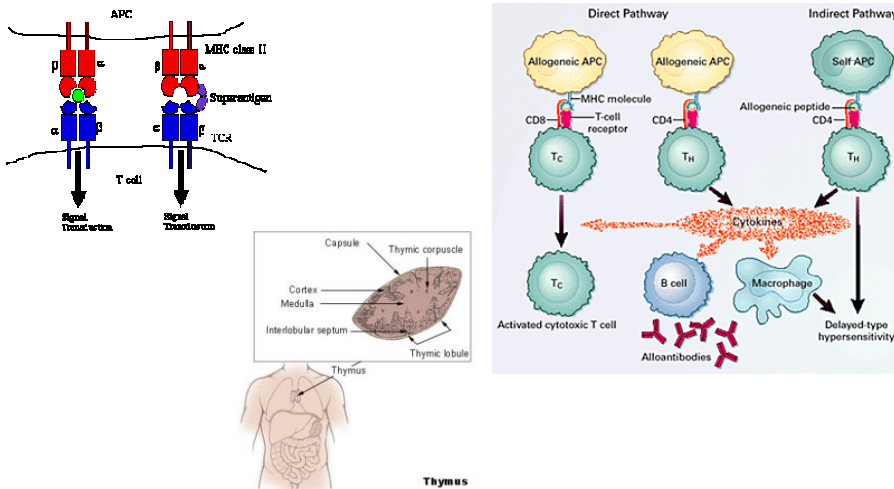


Genetika T1DM

- 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**
 - nejsilnější riziko nese genotyp DRB1*04_DQ8/DRB1*03_DQ2
 - heterozygotnost pro jednu z výše uvedených alel v kombinaci s jinými představuje menší riziko
 - jakýkoliv genotyp obsahující DQ6 má dominantně protektivní efekt
- molekulární podstata asociace**
 - rizikové a protektivní varianty HLA II mění 3-D strukturu povrchového antigenu (krystalografie)
 - antigen-binding cleft
 - rozdíly v selektivitě prezentovaných peptidů (APC) a stabilitě komplexů antigen/molekula HLA II
 - protektivní molekuly mají stabilnější vazbu antigenu
 - hypotézy
 - nedostatečná delece autoreaktivních T v thymu
 - rozdílná vazba na TCR a tím rozdílná imunomodulace T-lymf. (proliferující × regulační)

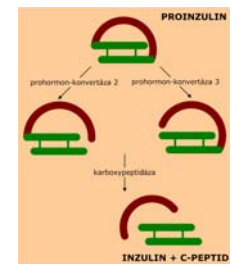
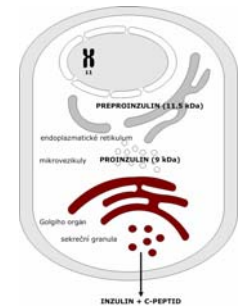


HLA II molekuly – prezentace antigenu - imunotolerance

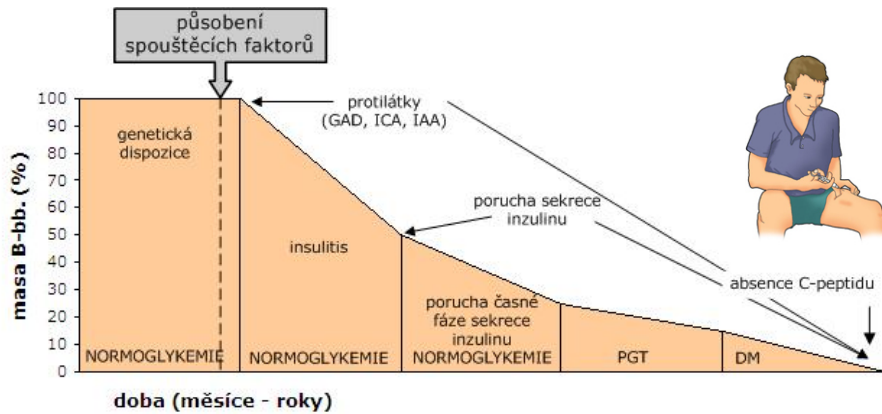


Genetika T1DM

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



Etiopatogeneze T1DM



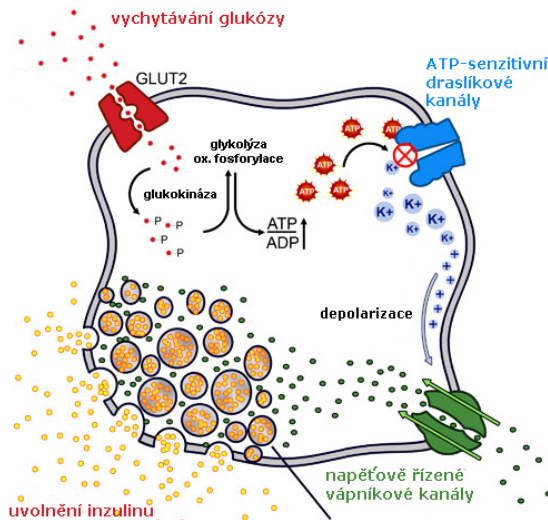
17

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

- cca 1% všech diabetiků v populaci
 - skupina **monogenních** diabetů s familiárním výskytem a dobře definovaným mendelistským 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)
 - 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 pozdními následky
 - postižena glukózou stimulovaná tvorba a uvolnění inzulínu a proliferace a diferenciace β-buněk

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

Funkční význam asociací

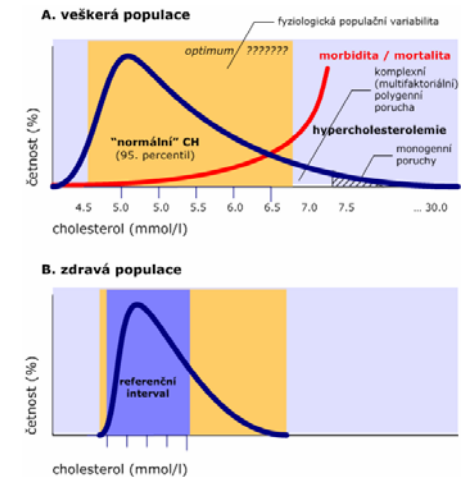


- glukokináza
 - “glukózový senzor” (vázne uvolňování a produkce inzulínu)
- HNF
 - většina transkripčních faktorů původně popsanych ve spojení s jaterním metabolismem je rovněž zapojena ve vývoji pankreatu a B-bb.
- IPF1 a NEUROD1
 - ovlivňují transkripci inzulínu

19

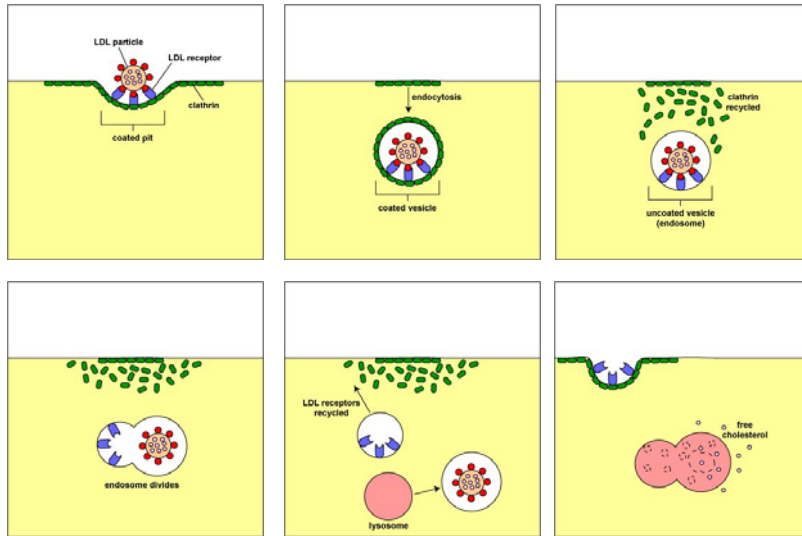
Hyperlipidemie – příklad 3

- etiologicky jsou to onemocnění buď
 - **primární** - geneticky založená
 - **sekundární** - doprovázejí jiná onemocnění
- genetická dispozice
 - polygenní
 - podobně jako u dalších “civilizačních chorob” (tzv. “střadavý” genotyp)
 - na manifestaci poruchy se výraznou měrou podílí faktory zevního prostředí, především dieta
 - monogenní - většina primárních HLP
- plynulá distribuce znaku - hladin cholesterolu - v populaci
 - kvantitativní znak (QTL)
- osoby s FH
 - monogenní nemoc



20

Cholesterol - LDL - LDL receptor



21

Fam. hypercholesterolemie (FH)

- nejčastější primární HLP
 - heterozygoti se vyskytují s frekvencí 1:500
 - homozygoti 1:1 mil.
- FH je způsobena mutací v genu pro LDL receptor (chromosom 19)
 - bylo popsáno více než 700 různých mutací
- **LDL receptor** (spolu s částí membrány – “coated pits”), periodicky (cca 1 × 10min) **recykluje** mezi cytoplazmou a membránou a pohlcuje LDL částice, po jejich uvolnění se vrací zpět do membrány
 - LDL je působením lysozomálních enzymů rozložen na volný cholesterol a AK (z apolipoproteinů, zejm. apoB)
- z funkčního hlediska spadají jednotlivé mutace do jedné z pěti kategorií, podle toho zda vedou k:
 - 1) úplné ztrátě receptoru (17 % případů)
 - 2) poruše transportu receptoru do plazmatické membrány (54 %)
 - 3) poruše vazby LDL
 - 4) poruše internalizace receptoru po vazbě LDL
 - 5) poruše uvolnění z endozomu po internalizaci a návratu do plazmatické membrány (22 %)
- zvýšení plazmatického cholesterolu se liší podle typu mutací a hetero- či homozygotnosti (tzv. „**gene-dosage**“ efekt), ale je vždy značné
 - cca dvojnásobek normálních hladin [$<5.2\text{mmol/l}$] u heterozygotů a čtyř- až pětinašobek u homozygotů
- **důsledky FH**
 - u nemocných se tvoří mnohočetné xantomy, příp. šlachová xantelazmata a arcus corneae
 - ale hlavně nemocní s nerozpoznanou a neléčenou FH jsou zejm. ohroženi **předčasnou aterosklerózou** a časným úmrtím zpravidla na fatální infarkt myokardu
 - u heterozygotů se manifestní kardiovaskulární onemocnění objevuje ve čtvrté dekádě
 - u homozygotů již v dětství a pokud je FH neléčena, vede k úmrtí ve druhé dekádě.
 - mortality of MI in very young age in unrecognised homozygotes, before the 4th decade in heterozygotes
- **molekulárně-genetická diagnostika** suspektních případů a rodin, dispenzarizace nemocných a agresivní hypolipidemická léčba je podstatou sekundární **prevence**



22