

Molekulare Pathologie 2

Peter N. Robinson

Institut für medizinische Genetik
Charité Universitätsmedizin Berlin

28. Juni 2008

Mutationen bei genetischen Krankheiten

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

- Unterschiedliche Funktionsverlustmutation bei dem PAX3-Gen

Ziele der molekularen Pathologie

- Die Auswirkungen von Mutationen zu verstehen
- Hierdurch auch die normalen Funktionen des betroffenen Gens besser verstehen
- Neue Therapieoptionen hiervon ableiten (molekulare Medizin): schwierig, aber gelegentlich erfolgreich

Funktionsverlustmutationen

- Das Proteinprodukt des mutierten Gens hat eine verringerte oder keine Funktion
- Häufig bei rezessiven Krankheiten
- Bei den meisten Proteinen ist die genaue Quantität nicht entscheidend, die halbe Menge ist für die normale, gesunde Funktion der Zelle bzw. des Organismus ausreichend
- Typische Beispiele sind die Enzymopathien

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

- Mangel an Phenylalaninhydroxylase (PAH)
- Monomeres Enzym. Heterozygote Mutationsträger (~50% Enzymaktivität) sind gesund

Funktionsverlustmutationen

- Wenn ein Phänotyp Folge des Funktionsverlustes eines Gens ist, kann man davon ausgehen, dass jede Veränderung, die das Genprodukt inaktiviert, dasselbe klinische Erscheinungsbild hervorruft
- Zum Beispiel kann das Fragile-X-Syndrom durch Repeat-Expansionen oder gelegentlich durch andere Mutationen hervorgerufen werden

Viele Mutationsarten können zum Funktionsverlust führen¹

- Kurze Insertionen/Deletionen, insbesondere mit Leserasterverschiebung
- Nonsense-Mutationen
- Spleißmutationen
- Deletionen des gesamten Gens
- (Bestimmte) Missense-Mutationen

¹s. Tabelle 16.1 in Strachan & Read für eine ausführliche Liste von 11 möglichen Mechanismen, die die Funktion eines Gens einschränken oder zerstören können.

Zystische Fibrose

- Zystische Fibrose = CF = Mukoviszidose
- Dicker Schleim, reduzierte Immunkompetenz ⇒ wiederholte Lungeninfektionen, chronische Lungenkrankheit (COPD)

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

<http://www.learningradiology.com/>

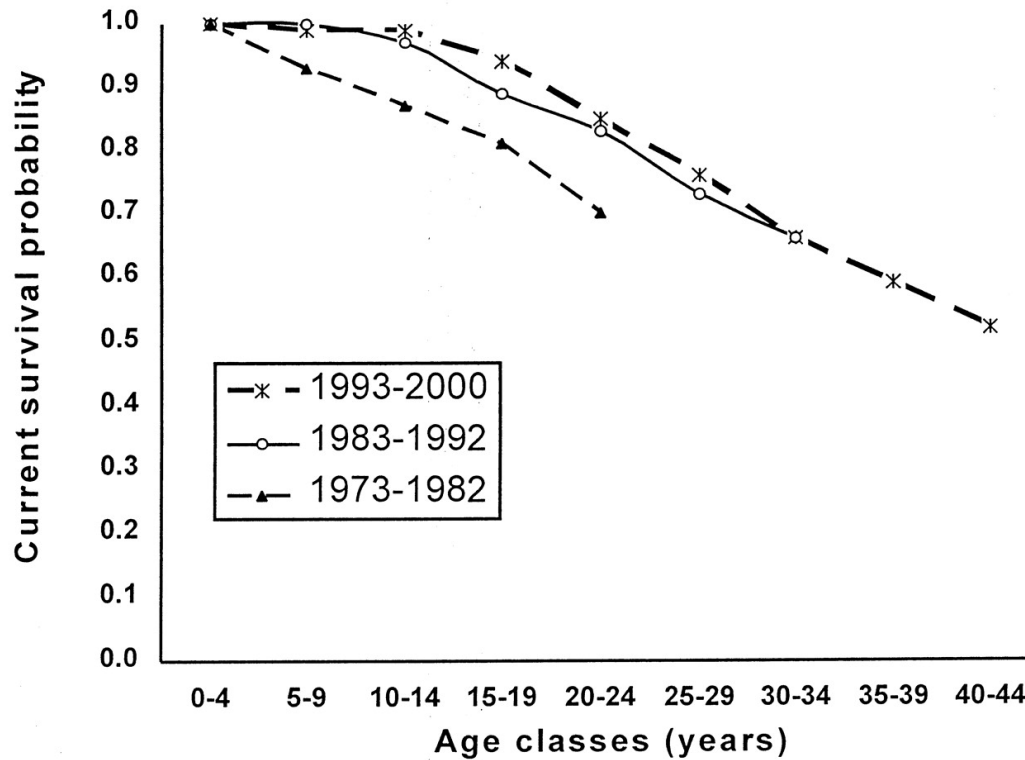


Wikipedia commons



Wikipedia commons

Lebenserwartung



Assael (2002) Epidemiology and Survival Analysis of Cystic Fibrosis... Am J Epidemiol **156**:397–401.

- Durchschnittliche Lebenserwartung stark reduziert

Das CFTR-Gen

- CFTR = "CF transmembrane conductance regulator"
- 7q31
- 230 kb, 27 Exons
- 12 Transmembranbereiche
- 2 ATP-Bindungsdomänen
- 1 regulatorische (R-) Domäne
- cAMP – induzierter Cl^- Kanal

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

Mutationen im CFTR-Gen

- Mutationsanalyse: PCR, DNA-Sequenzierung oder mutationsspezifische Screening-Methoden
- Häufigste Mutation ($\sim 75\%$): $\Delta F508$ in Exon 10 (F = Phenylalanin)
- Allelische, "milde" Mutationen in CFTR mit isolierter Aplasie des Ductus deferens assoziiert
- Ethnische Unterschiede in Mutationshäufigkeit und -verteilung

Verteilung von CFTR-Mutationen

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

BB329 Membranes and Cellular Signalling homepage,

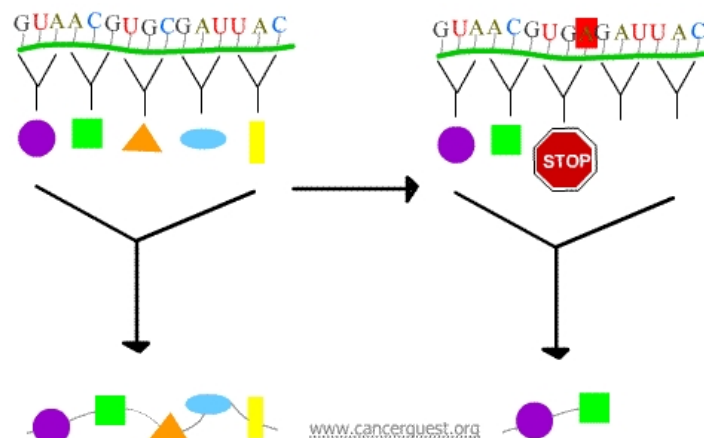
<http://homepages.strath.ac.uk/~dfs99109/BB310/CFgene.html>

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

Kulczycki et al (2003) American Journal of Medical Genetics **116A**:262–267.

CFTR-Mutation Klasse 1

- Nonsense-Mutation bzw. Leserasterverschiebung (frameshift)
- Vorzeitiger Translationsstopp (PTC), Nonsense-mediated decay
- CFTR-Protein nicht gebildet



CFTR-Mutation Klasse 2

- Fehlerhafte Proteinfaltung, Retention im endoplasmatischen Reticulum (ER)
- Das defekte Protein wird nicht an die Zellmembran transportiert

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

CFTR-Mutation Klasse 3 und 4

- 3) Missense-Mutation in der Nukleotidbindungsdomäne \Rightarrow der cAMP-getriggerte Cl^- Kanal kann nicht geöffnet werden
- 4) Kanalkonduktanz durch Missense-Mutation verändert
- Folge: CFTR-Kanal **funktionslos**

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

Source: <http://www.cfgenetherapy.org.uk/cysticfibrosismore.htm>

CF Pathomechanismus

- Alle Mutationsklassen führen zum Funktionsverlust des CFTR-Gens
- Verlust von CFTR beeinträchtigt Salzresorption im Lungenepithel mit reduziertem Flüssigkeitsvolumen, verdicktem Schleim, Versagen des mukoziliaren Transports

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

CF Pathomechanism

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

Haploinsuffizienz

- Bei anderen Genen führt eine Verringerung der Genfunktion um 50% (**Haploinsuffizienz**) zu einem anomalen Phänotyp
- Relativ wenig Gene²
- Dosisabhängigkeit kann insbesondere dann der Fall sein wenn...
 - ▶ das Genprodukt Bestandteil eines quantitativen Signalsystems ist
 - ▶ das Genprodukt kooperiert mit anderen mit einer festgelegten Stöchiometrie
- Hier ist die relative Menge eines Genproduktes von Bedeutung
- Entsprechende Krankheiten folgen einem autosomal dominanten Erbgang
- Gene, deren Produkte allein aktiv sind (z.B. lösliche Enzyme) zeigen selten Dosiseffekte

²s. Tabelle 16.2 in Strachan & Read für eine ausführliche Liste.

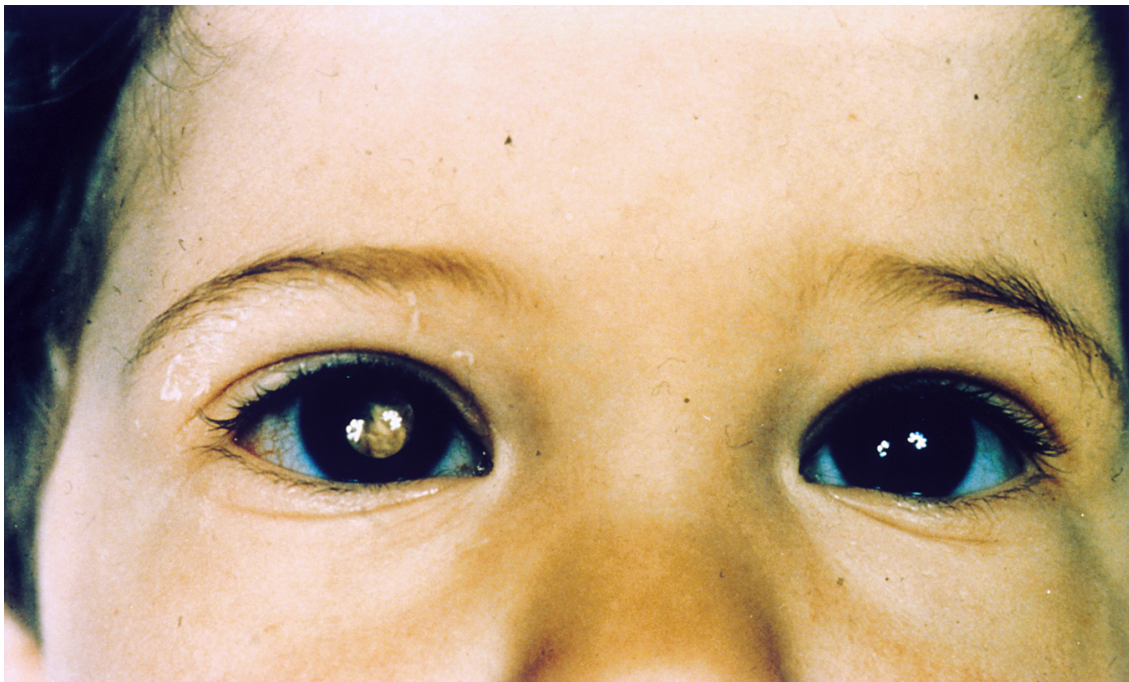
Tumor-Suppressor-Gen

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

Tumor-Suppressor-Gen

- Genprodukte steuern Zellzyklus oder lösen Apoptose aus
- Das Fehlen eines Tumorsuppressorproteins kann somit die Wahrscheinlichkeit erhöhen, dass sich eine Tumorzelle entwickelt
- Beide Genkopien müssen fehlen, damit die suppressive Wirkung eines TSG aufgehoben wird
- Im Falle einer Keimbahnmutation (Haploinsuffizienz) muss nur noch eine somatische Mutation in einer Zelle auftreten, damit sich aus dieser Zelle zu einer Tumorzelle entwickelt (etwas übervereinfacht, aber für Retinoblastom realistisch)

Retinoblastom



Wikipedia commons

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

”Viele Treffer”

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

Dominant-negativ

- Wenn ein mutiertes Polypeptid nicht nur seine eigene Funktion verliert, sondern auch das Produkt des normalen Allels beeinträchtigt, kommt es zu einem dominant-negativen Effekt
- Dominant-negative Mutationen haben gravierendere Auswirkungen als einfache Nullallele desselben Gens
- Kommt insbesondere bei Strukturproteinen vor
- Klassisches Beispiel: Kollagen Typ 1, Osteogenesis imperfecta (Glasknochenkrankheit)

Osteogenesis imperfecta

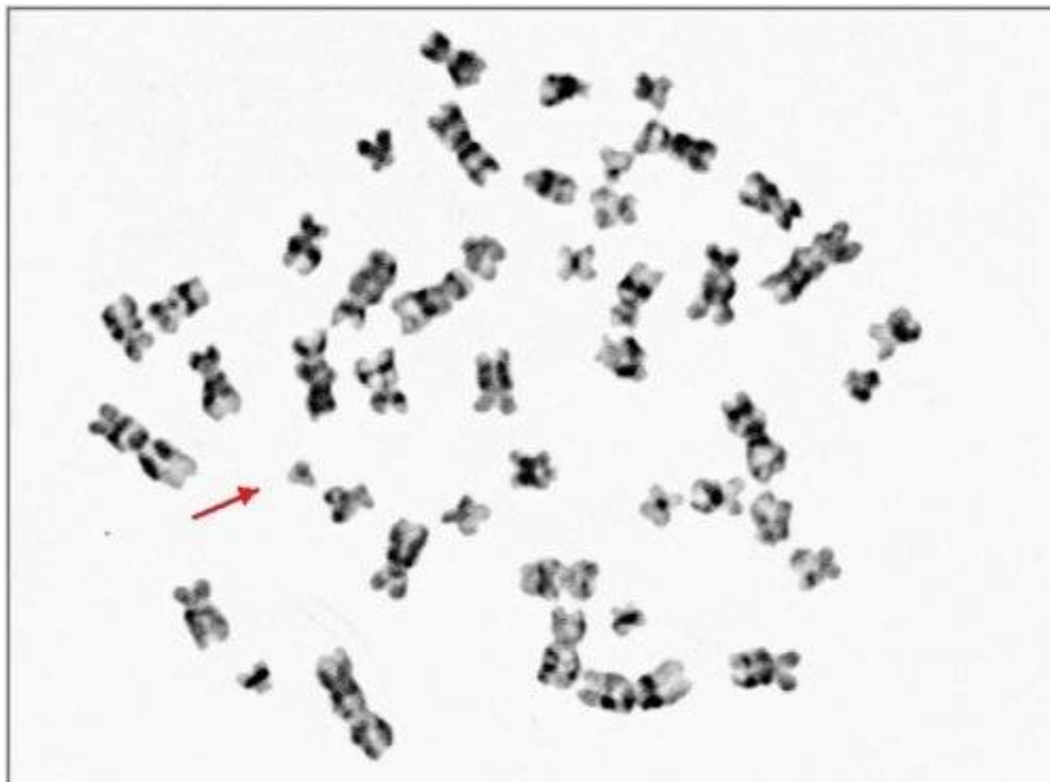
Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

Funktionsgewinnmutationen

Mutationen können dazu führen, dass ein Genprodukt eine neue Funktion gewinnt

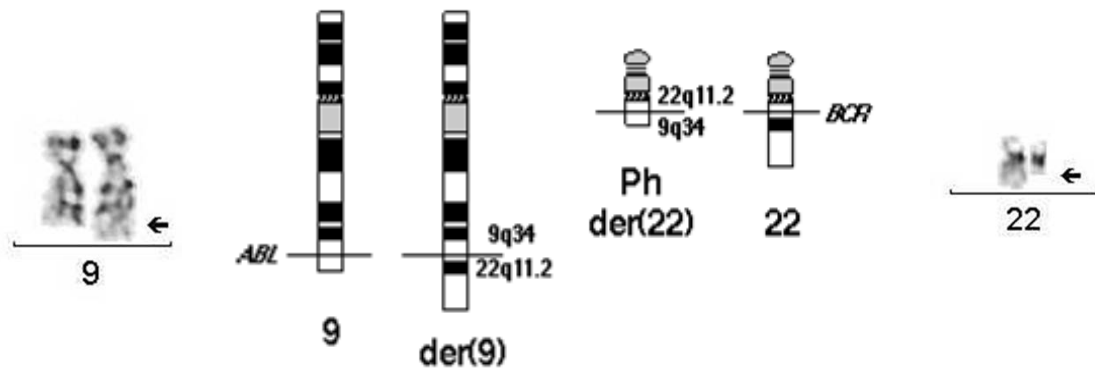
Überexpression	PMP22	Charcot-Marie-Tooth-Krankheit
Rezeptor konstitutiv aktiv	GNAS	McCune-Albright-Syndrom
Fehlerhaftes Öffnen eines Ionenkanals	SCNA4	Paramyotonia congenita
Bildung von Proteinaggregaten	HD	Morbus Huntington
Bildung eines Fusionsproteins	BCR-ABL	chronische myeloische Leukämie

BCR-ABL



- Das Philadelphia-Chromosom

BCR-ABL

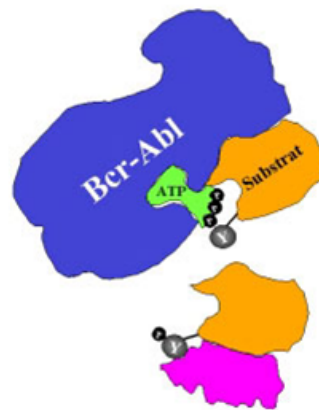


- Das Philadelphia-Chromosom: **der(22)t(9;22)(q34;q11)**

BCR-ABL

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

- Bildung eines Fusionsproteins



- Das BCR-ABL-Fusionsprotein weist eine erhöhte Tyrosinkinase-Aktivität auf (Funktionsgewinn)

Antizipation

- Antizipation = Vorverlagerung des Erkrankungsalters
- Zunächst 1918 für die myotone Dystrophie beschrieben
- Früherer Beginn und gravierendere klinische Symptome von einer Generation zur nächsten
- Mehrere neurogenetische Erkrankungen: Morbus Huntington, Friedreich'sche Ataxie Spinozerebelläre Ataxie (SCA),...
- Antizipation lässt sich nicht im Rahmen der Mendelschen Erbgänge erklären

- Die genetische Grundlage dieser Krankheiten wurde mit der Klonierung des Genes für das Fragile X-Syndrom 1991 bekannt
- Zunehmende Expansion einer einfachen DNA-Wiederholung
- Expansion der Trinucleotidsequenzen (CGG/CCG; CAG/CTG; GAA/TTC), sowie Tetramere (CCTG/CAGG), Pentamere (AATCT/AGATT), und Dodecamere (CCCCGCCCCCG/CGCGGGGCGGGG)

Repeatverlängerung: Mechanismen

- Ein Repeat wird nach Überschreitung einer spezifischen Schwelle instabil (z.B. 100–200nt)
- Normale (stabile) Allele haben viel kürzere Repeatstrecken
- Die Wahrscheinlichkeit einer Expansion korreliert mit der Länge der Repeatstrecke
 - ▶ Sobald eine pathologische Expansion in einer Familie aufgetreten ist, wird sie von Generation zu Generation wegen der Instabilität noch länger
 - ▶ Dies ist der Mechanismus der Antizipation

Repeatverlängerung: Mechanismen

- Hypothese: "Strand slippage" bei der DNA-Replikation

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

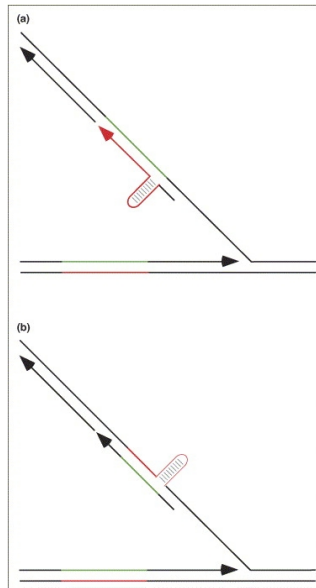
Repeatverlängerung: Mechanismen (2)

- Repeats können auch als Haarnadelstrukturen falten
- Stabile Slip-Strand-Strukturen können gebildet werden, wobei die ausgesparte Schleifen Haarnadeln bilden

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

Repeat Expansion: Mechanisms (3)

- Die Bildung solcher Strukturen bei der *lagging strand*-Synthese *template* kann zur Expansion oder Kontraktion einer Strecke von Wiederholungen führen³



³ vgl. Merkin SM (2006) DNA Structures, Repeat Expansions and Human Hereditary Disorders. Current Opinion in Structural Biology

16:351–358

Pathomechanismen

- Die Konsequenzen einer Repeatverlängerung hängen vom beteiligten Gen ab
- Repeatverlängerung kann in die 5'-UTR, 3'-UTR, den kodierenden Bereich, oder ein Intron betreffen
- Daher verschiedene pathogenetische Mechanismen
 - ① Funktionsverlust
 - ② Funktionsgewinn/Bildung toxischer Aggregate
 - ③ Aberrante RNA-Protein-Interaktionen

Polyglutamine Diseases

- 9 neurogenetische Krankheiten
- Expansionen im kodierenden Bereich CAG=Glutamin → "polyQ"
- Funktionsgewinn
- Ein wichtiger Aspekt: Mutantes Protein bildet unlösliche, zelltoxische Aggregate

Polyglutaminkrankheiten

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

- Verlängerte Q-Strecke verändert die Proteinkonformation, was zur Bildung von toxischen Aggregaten, veränderten Proteininteraktionen und anderen teils noch nicht geklärten pathogenetischen Effekten führt

Morbus Huntington

- Neurodegenerative Erkrankung
 - ▶ Unwillkürliche Bewegungen, Bewegungsunruhe
 - ▶ psychiatrische Symptome
- Genprodukt: Huntingtin

	Repeatlänge (CAG) _n
Normal	6–35
mutierte Grauzonenallele	36–40
mutierte pathologische Allele	41 – ca. 120

Polyglutaminkrankheiten

- Proteolytische Spaltung erzeugt ein toxisches Fragment
- Aggregation der Fragmente, Einschlusskörperchen
- Veränderungen in Transkription, Stoffwechsel, Proteasom u.a.

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

Mutationen und Krankheiten

- Unterschiedliche Mutationen in einem Gen können unterschiedliche klinische Folgen haben, bzw. zu unterschiedlichen Krankheiten führen

Mutationen im Gen für Fibrillin-1 (*FBN1*)

Marfan-Syndrom (MFS)	Aorta, Skelett, Auge
neonatales MFS	extrem schwerwiegend
Ectopia lentis	isolierte Augenbeteiligung
Familiäre Arachnodaktylie	Dolichostenomelie, Arachnidaktylie
FAAD	isolierte Aortenbeteiligung
Weil-Marchesani-Syndrom	Kurzwuchs, Brachydaktylie, Gelenksteifheit, Ectopia lentis

Robinson et al (2006) The molecular genetics of Marfan syndrome and related disorders. *Journal of Medical Genetics* **43**:769–787

Genetische Heterogenität

- Mutationen in unterschiedlichen Genen können auch zu derselben oder aber einer sehr ähnlichen Krankheit führen
- Beispiel: Bardet-Biedl-Syndrom
 - ▶ Netzhautdegeneration
 - ▶ Fettleibigkeit
 - ▶ Retardierung
 - ▶ Nierenmalformationen
 - ▶ Polydaktylie
- Ziliopathie

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

Hypertrophe Kardiomyopathie

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

- Hypertrophe Kardiomyopathie⁴
- Mutationen in einem der Gene *MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2*, *TNNI3*, *TPM1*, *ACTC*, *MYL2*, *MYL3*

⁴1:500 in der Allgemeinbevölkerung

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

- Krankheitsgen-Familien (z.B. drei klinisch ähnliche Krankheiten werden durch Mutationen in drei verwandten Kollagen-Genen verursacht)

Krankheitsfamilien und Pathways

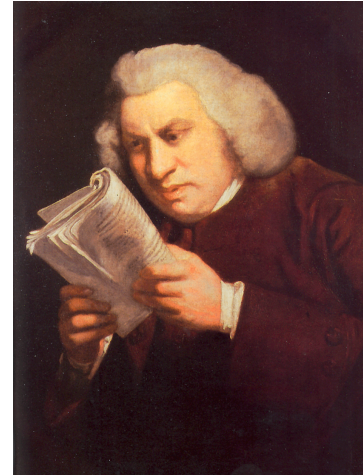
Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

RAS/MAPK-Pathway-Syndrome

The End of the Lecture as We Know It

- Diese Vorlesungsdias stehen unter der GNU-Lizenz für freie Dokumentation^b
- Kontakt:
peter.robinson@charite.de
- Strachan & Read, Kapitel 16

^b<http://www.gnu.org/licenses/fdl.txt>



Lectures were once useful; but now, when all can read, and books are so numerous, lectures are unnecessary. If your attention fails, and you miss a part of a lecture, it is lost; you cannot go back as you do upon a book... People have nowadays got a strange opinion that everything should be taught by lectures. Now, I cannot see that lectures can do as much good as reading the books from which the lectures are taken. I know nothing that can be best taught by lectures, except where experiments are to be shown. You may teach chymistry by lectures. You might teach making shoes by lectures!

Samuel Johnson, quoted in Boswell's Life of Johnson (1791).