

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra antropologie a genetiky člověka

**Vplyv typu mutácie v géne COL1A2 na klinický obraz pacientov
s osteogenesis imperfecta**

Bakalárska práca

Veronika Sluková

Praha 2008

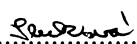
Vedúci bakalárskej práce: Doc. RNDr. Ivan Mazura, CSc.

Prehlásenie

„ Týmto prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne
s použitím uvedenej literatúry .“

V Prahe, 11. apríla 2008

Veronika Sluková


.....

Pod'akovanie

Rada by som pod'akovala Doc. RNDr. Ivanovi Mazurovi, CSc. za cenné podnety k tejto práci a pomoc pri výbere článkov a ďalších informačných zdrojov.

Obsah

Abstrakt	4
1. Všeobecný úvod o kolagénopatiách	6
2. Klinický obraz poruchy osteogenesis imperfecta	8
3. Molekulární patogeneze OI	9
4. Gén COL1A2	11
5. Typy mutácií nájdených v géne COL1A2	11
6. Vplyv niektorých častí génu COL1A2 na kvalitu kolagénovej molekuly	12
7. Korelácia genotyp - fenotyp u osôb s diagnózou OI	14
8. Záver	17
Zoznam použitej literatúry	18
Prílohy	29

Abstrakt

Osteogenesis imperfecta (OI), alebo chorobná lámavosť kostí, je väčšinou dominantne dedičné ochorenie, ale existujú aj recesívne formy, a tiež môže vznikáť de novo mutáciami. V súčasnej dobe rozoznávame osem typov OI, z ktorých najmiernejší je typ I a najzávažnejší periletálny typ II.

Toto ochorenie spôsobujú mutácie v génoch pre kolagén typu I, COL1A1 a COL1A2. Najčastejšie sa vyskytujú jednobázové zámery, ktoré spôsobia substitúciu glycínu za inú aminokyselinu. Tým sa naruší opakovanie Gly-Xaa-Yaa tripletov, čo vyústi v nadmernú posttranslačnú modifikáciu α reťazcov, a zníži extracelulárnu sekréciu kolagénových molekúl, alebo znemožní správne skladanie kolagénových triplehelixov.

Molekula kolagénu typu I pozostáva z dvoch $\alpha 1$ reťazcov a jedného $\alpha 2$ reťazca, takže glycínové substitúcie v $\alpha 1$ reťazci majú vo všeobecnosti závažnejší charakter ako v $\alpha 2$. Avšak mutácie v COL1A2 géne spôsobujú OI-I len asi v 9% prípadov. Tento typ je skôr spôsobený „null-allele“ mutáciami v COL1A1 géne, ktoré vyúsťujú v sekréciu asi polovičného množstva $\alpha 1$ reťazcov. Mutácie v COL1A2 sú väčšinou neletálne, letálne sa vyskytujú bližšie ku karboxylovému koncu molekuly, na ktorom sa nachádza osem letálnych skupín substitúcií glycínu.

Táto práca zhrňuje poznatky z rôznych doteraz uverejnených štúdií, mutácie v nich uverejnené a ich vzťah k fenotypu pacientov s OI. Sú tu popísané rôzne mutácie, ktoré spôsobujú odlišný fenotyp, hoci je ten istý glycín substituovaný rovnakou aminokyselinou, čo naznačuje rolu určitých epigenetických faktorov. Ďalej boli objavené aj rôzne mutačné hot spoty, v ktorých sa substitúcie glycínu vyskytujú vo väčšej miere ako v ostatných miestach. Avšak úplné pochopenie vzťahu genotyp-fenotyp pri poruche OI stále čaká na odhalenie.

Kľúčové slová: osteogenesis imperfecta, COL1A2, kolagén, kolagenopatie, mutácie

Abstract

Osteogenesis imperfecta, or fragile bone disease, is mostly dominant heritable disorder, but there are some recessive forms, and also can be result from de novo mutation. Recently we recognize eight types of OI with the mildest type I and most severe perinatal lethal type II.

This disease is caused by mutations in type I collagen genes, COL1A1 and COL1A2. The most common mutations are single base changes, which result in substitution for glycine by another amino acid. This disrupts the repeating of Gly-Xaa-Yaa triplets, which results in overmodification of α chains, and decreases extracellular secretion of collagen molecules or thwarts the right collagen triplehelix self-assembly.

The collagen type I molecule consists of two $\alpha 1$ chains and one $\alpha 2$ chain, so the glycine substitutions in $\alpha 1$ chain have generally more severe phenotype than in $\alpha 2$ chain. However the mutations in COL1A2 gene cause OI-I just in about 9% of all cases. This type is rather caused by “null-allele” mutation in COL1A1 gene, which results in about half amount secretion of $\alpha 1$ chains. The mutations in COL1A2 gene are predominantly nonlethal, lethal occur closer to the carboxyl-terminal end of molecule, where eight lethal glycine substitution clusters are situated.

This work collects the knowledge from many different published studies in which the mutations are described and their relationship to the phenotype of OI patients. The diverse mutations cause a different phenotype, although the same glycine is substituted by the same amino acid. This indicates the role of some epigenetic factors. There were also discovered some mutation hot spots, where the glycine substitutions occur more often than in another parts of molecule. But the entire understanding of the genotype-phenotype relationship of OI disorder is still waiting to reveal.

Key words: osteogenesis imperfecta, COL1A2, collagen, collagenopathies, mutations

1. Všeobecný úvod o kolagénopatiách

Extracelulárna matrix je nevyhnutná pre správne fungovanie chrupaviek a kostí. (6) Najpočetnejšie v nej sú kolagény, ktoré sú homomerické alebo heteromerické trojšroubovice troch kolagénových reťazcov. Hlavná súčasť extracelulárnej matrix kostí je kolagén typu I (Kornak a Mundlos, 2003). Mutácie v tomto kolagéne zapríčiňujú dve klinicky odlišné entity: osteogenesis imperfecta, ktorej hlavným znakom je lámavosť kostí, a typ VII Ehlers-Danlosovho syndrómu, vzácny, dominantný stav charakterizovaný dislokáciami kĺbov (Tsipouras a Ramirez, 1987), hyperextensibilitou a priesvitnosťou kože, ľahkým vznikom modrín a hypemobilitou kĺbov (Howard, 1990).

Kolagén typu II je hlavnou kolagénovou súčasťou chrupavkovej matrix (Reginato a Olsen, 2002). Súčasný zoznam klinických foriem mutácií v kolagéne typu II zahŕňa achondrogenesis ((Eyre et al., 1986; Vissing et al., 1989), hypochondrogenesis (Bogaert et al., 1992; Horton et al., 1992), Kniestovu dyspláziu (Wilkin et al., 1993; Winterpacht et al., 1993; Spranger et al., 1994), spondyloepifyzeálnu dyspláziu congenita (SEDC) (Lee et al., 1989; Tiller et al., 1990), spondyloepimetafyzeálnu dyspláziu (SEMD) (Vikkula et al., 1993; Tiller et al., 1993), dedičnú osteoartritídu (Ala-Kokko a Prockop, 1990; Katzenstein et al., 1992; Williams et al., 1993; Winterpacht, v tlači), Sticklerov syndróm (Ahmad et al., 1991, 1993) a Wagnerov syndróm (Körkkö et al., 1993). Tieto ochorenia vykazujú extrémne široké rozpätie klinickej závažnosti, od Sticklerovho a Wagnerovho syndrómu na miernom konci, ktoré sú charakterizované očnými patológiami a artropatiami, po perinatálne letálne formy achondrogenesis a hypochondrogenesis (Bogaert et al., 1994). Sticklerov syndróm zahŕňa očné a kosterné zmeny, a často stratu sluchu (Godfrey, 1993). Kniest dysplázia je klinicky charakterizovaná disproporčným trpaslicizmom, rozštepom podnebia, myopiou, postupujúcou stratou sluchu, artropatiou a skoliózou (Bogaert et al., 1994). Osteochondrodysplázie sú heterogénnou skupinou dysplázií kostí, ktoré sú charakterizované abnormálnym rastom alebo vývojom chrupavky a/alebo kostí (Rimoin a Lachman, 1990).

Exon skipping v COL3A1 môže spôsobiť EDS IV alebo arteriálnu aneurysmu (Kuivaniemi et al., 1991; Richards et al., 1994).

Niektoré z chorôb, ktoré patria do kategórie kolagén formujúcich ochorení, sú chronické ochorenie srdcových chlopní, atheroskleróza, prachové ochorenia pľúc, chronická nefritída a cirhóza. Skrivenie chlopní a malfunkcia v chronickej reumatickej chorobe srdca je hlavne následkom nadmerného ukladania kolagénu. V pľúcnom prachovom ochorení je

ohrozená respiračná záloha odstránením vlákien z alveolárnych vzduchových priestorov. Funkčná dôležitosť ukladania kolagénu je menej jasná v nefritíde a cirhóze pečene (McGee a Fallon). Hoci funkčný význam kolagénu v normálnych a abnormálnych glomeruloch nemôže byť bezvýznamný, keď sme si vedomí, že hlavným proteínom základnej membrány je kolagén typu IV (Kefalides, 1971), a že hyalinizované glomeruly koncového štádia obličiek sú konglomeráty kolagénu typu IV a intersticiálneho kolagénu (Nagle, 1960). Pri cirhóze ukladanie kolagénu v pečeni kompletne naruší pôvodnú architektúru pečene tak, že normálny vzťah medzi cievnym prívodom a odvodom je zničený. Vzrastajúce hromadenie kolagénu je pravdepodobne následkom hlavne zvýšenej syntézy kolagénu (McGee a Fallon).

Mutácie v génoch COL6A2 a COL6A3 spôsobujú Ullrichovu vrodenú svalovú dystrofiu (UCMD). Je to autozomálne recesívna porucha charakteristická celkovou svalovou slabosťou, skrátením viacerých kĺbov a distálnou hyperextensibilitou (Demir et al., 2002). Závažnosť tohto stavu sa líši od miernej po vážnu, so stratou chodenia (Ricci et al., 1988; De Paillette et al., 1989). Mutácie v géne COL6 spôsobujú autozomálne dominantné ochorenie, Bethlemovu myopatiu (Jöbsis et al., 1996; Pepe et al., 1999; Sasaki et al., 2000).

Mutácie v COL9 spôsobujú mnohonásobnú epifyzeálnu dyspláziu (Kornak a Mundlos, 2003). Poruchy v géne COL10A1 sú zodpovedné za metafyzeálnu chondrodyspláziu, Schmidov typ a spondylometafyzeálnu dyspláziu, japonský typ. Zostrihové mutácie v COL11A1 sú zodpovedné za Marshallov syndróm, v ktorom sú zvyčajné straty sluchu (Reginato a Olsen, 2002).

Táto práca hovorí o osteogenesis imperfecta, ktorú spôsobujú mutácie v COL1A1 a COL1A2 génoch. Veľkú väčšinu týchto mutácií tvoria substitúcie glycínu inou aminokyselinou, čo spôsobuje nadmernú modifikáciu α reťazcov a ich zlú sekréciu alebo nesprávne formovanie kolagénových vlákien. Významný podiel tvoria aj mutácie v zostrihových miestach pre-mRNA. Tie môžu spôsobiť vynechanie exonu, zaradenie intronu, alebo aktiváciu kryptických zostrihových miest. OI je charakteristická zvýšenou lámavosťou kostí a častým príznakom je aj sklera zafarbená do modra. Sillenceova klasifikácia rozlišuje štyri typy OI, I-IV, ale v súčasnej dobe boli odlišené ďalšie (V-VIII), s fenotypom podobným OI-IV, v ktorých ale neboli objavené žiadne mutácie v génoch pre kolagén. Najzávažnejší typ je OI-II, ktorý je perinatálne letálny. Za ním nasleduje typ III, progresívne deformujúci, potom typ IV a najmiernejšia forma OI je typ I.

2. Klinický obraz poruchy osteogenesis imperfecta

Osteogenesis imperfecta (OI) je dedičná porucha, ktorá zapríčiňuje rôzne stupne lámavosti kostí a je spojená s defektmi v niekoľkých ďalších tkanivách bohatých na kolagén typu I (Körkkö et al., 1998). Postihuje 1:15 000 až 1:20 000 živo narodených jedincov (Pollitt et al., 2006) Za OI, dominantnú poruchu spojivových tkanív, sú zodpovedné mutácie v génoch pre α reťazce kolagénu typu I (Byers, 1993). Výsledná závažnosť sa pohybuje od letality v perinatálnom období do sotva detekovateľnej poruchy spojivových tkanív (Byers a Cole, 2002; Marini, 2004; Sillence et al., 1979). Veľká väčšina (okolo 85%) mutácií spôsobujúcich OI sú jednobázové zmeny zodpovedné za substitúciu glycínu za inú aminokyselinu s väčším postranným reťazcom (Kuivaniemi et al., 1991; Dalgleish, 1994).

OI sa podľa Sillenceovej klasifikácie delí na 4 typy. Typ I je najčastejšia a zvyčajne mierna a nedeformujúca forma (Pollitt et al., 2006) (Obr.1). Je rozdelená na IA ak sú zuby normálne, alebo IB ak je prítomná dentinogenesis imperfecta (DI) (Gajko-Galicka, 2002). Vyskytujú sa zlomeniny s malou alebo žiadnou deformáciou kostí. Pacienti majú modrú skleru (Obr.4.), normálny vzrast a postupnou stratu sluchu. Ultrazvukové nálezy sú vzácne, nachádzame ohnutia alebo zlomeniny dlhých kostí. Prvá detekcia je možná od 20 týždňov (Marini et al., 2007).

Typ II je najzávažnejší a letálny v perinatálnom období (Pollitt et al., 2006) (Obr.2.). Postihnutí majú nedostatočne mineralizovanú lebku, micromelické kosti, obrúbené rebrá na röntgene, deformity kostí a platyspondyly. Na ultrazvuku je patrná nedostatočná mineralizácia, zlomeniny a skrútenie končatín, tenké obrúbené rebrá, zlomeniny a ohnutia dlhých kostí. Detekcia je možná od 14 týždňov (Marini et al., 2007).

Typ III je závažnejšie deformujúci a zlomeniny sú často prítomné pri narodení (Pollitt et al., 2006) (Obr.1). Sklera je rôzne zafarbená, pacienti dosahujú veľmi malý vzrast a majú poškodené zuby v dôsledku prítomnosti DI. Detekcia ultrazvukom ukazuje tenké rebrá, krátke končatiny, rôzne zlomeniny, nedostatočne mineralizovanú lebku, a je možná od 18 týždňov (Marini et al., 2007). Deti s OI typ III môžu zomrieť v detstve na dýchacie problémy, pneumóniu, alebo zlomeninu lebky. Tie, ktoré prežijú, trpia stupňujúcou sa deformáciou dlhých kostí a chrčtice v dôsledku zlomenín a vyžadujú mnohonásobné ortopedické zákroky a vozíčky pre pohyb (Gajko-Galicka, 2002).

Typ IV je mierne deformujúci, závažnosťou medzi typom I a III (Pollitt et al., 2006) (Obr.1). Sklera má normálne sfarbenie, vyskytujú sa mierne deformácie končatín a zlomeniny,

postihnutí majú rôzne malý vzrast a je prítomná DI. Niekedy môže nastať strata sluchu. Ultrazvukové nálezy sú málo časté, vyskytujú sa len ohnutia a zlomeniny dlhých kostí. Detekcia začína po 20 týždňoch (Marini et al., 2007). Pri OI typ IV počet zlomenín klesá okolo puberty (Gajko-Galicka, 2002).

V súčasnosti identifikované OI typu V, VI, VII (Rauch a Glorieux, 2004) a VIII sú založené na odlišnej histológii kostí a niektorých klinických príznakoch a sú často považované za OI typu IV. Nové typy nemajú mutácie v kolagéne typu I. Pri type V je zkalifikovaná interosseová membrána predlaktia, ďalej lúčovité dislokácie hlavy a hyperplastická formácia kalusov. V type VI sa vyskytuje viac zlomenín ako v OI IV a stlačené zlomeniny stavcov. Nevyskytuje sa DI. OI typ VII je charakteristický vrodenými zlomeninami, skorými deformáciami nôh a osteopeniou. Sklera je biela. Na ultrazvuku je viditeľná slabo mineralizovaná kostra so závažnou micromeliou. (Tab.1.) (Marini et al., 2007).

Pacienti s miernym fenotypom majú často silnú rodinnú históriu s OI, hoci sa vyskytujú aj sporadické prípady. Naproti tomu závažné fenotypy sú zvyčajne *de-novo* mutácie (Pollitt et al., 2006). Všetky typy OI sa dedia autozomálne dominantne, okrem OI typu VII a VIII, ktoré sú autozomálne recesívne (Marini et al., 2007).

3. Molekulární patogeneze OI

Kolagén typu I je hlavným proteínom kostí, kože, ligamentov, šliach a väčšiny ďalších spojivových tkanív (Pace et al., 2001), ale mutácie v géne pre kolagén typu I spôsobujú hlavne poruchu kostí. Niekoľko recentných prác ukázalo, že mutovaný kolagén môže byť rozdielne exprimovaný v kostiach a koži (Gajko-Galicka, 2002). Slúži ako hlavný zdroj mechanickej sily týchto tkanív a ako základ pre minerálne ukladanie v kostiach (Pace et al., 2001). Kopolymerizácia normálnych a mutovaných molekúl zapríčiňuje slabú a disorganizovanú matrix, čo má dramatické následky na ukladanie minerálov (Cohen-Solal et al., 1994).

Kolagén typu I obsahuje jeden $\alpha 2(I)$ reťazec a dva $\alpha 1(I)$ reťazce (Wenstrup et al., 1988). Kolagénové α reťazce obsahujú tri domény : N-terminálna, kolagénová a C-terminálna. (Tab.2.) Kolagénové reťazce $\alpha 1(I)$ a $\alpha 2(I)$ sú pôvodne syntetizované so signálnymi peptidmi pozostávajúcich z 22 aminokyselín a sú známe ako pro α -reťazce. Odstránenie signálnych peptidov produkuje molekuly známe ako pro α -reťazce, ktoré majú oba N- a C-terminálne propeptidy. Ich odštiepenie v extracelulárnom priestore ponechá telopeptidy ohraničujúce

trojšroubovicový región kolagénu na každom konci oboch reťazcov. Mutácie, ktoré vyúsťujú k predčasnému ukončeniu reťazca, tak že nie je produkovaný žiadny C-terminálny propeptid, spôsobujú, že skrátené α reťazce sa nezúčastňujú na formovaní triple-helixu (Dalglish, 1997).

Skladanie triméru začína carboxyl-terminálnymi propeptid doménami, ktoré sprostredkujú selektivitu a usporiadanie oboch reťazcov. Formovanie triple-helixu potom začína na C-konci helikálnej domény a pokračuje v smere k N-koncu celou dĺžkou molekuly. Novo formovaný heterotrimér je potom transportovaný sekretorickou cestou do extracelulárneho priestoru, kde sú propeptidy enzymaticky odštepené N- a C-proteinázami (Halász et al., 2007), aby sa mohol sformovať kolagén (Pace et al., 2001). (Obr.3.) Substitúcia posledného glycínu v triple-helikálnej doméne $\alpha 2(I)$ spomaľuje iniciáciu formovania triple-helixu a vyúsťuje v nadmernú modifikáciu. Reťazce, ktoré nie sú v trojšroubovicovom usporiadaní, sú dostupné určitým posttranslačným modifikáciám, napr. „prolyl-“, a „lyzyl-“, hydroxylácia a hydroxylyzyl glykosylácia (Wenstrup et al., 1988). Keď je sformovaný stabilný triple-helix, posttranslačné úpravy sú ukončené (Berg a Prockop, 1973). Trojšroubovica je stabilizovaná vodíkovými väzbami medzi hydroxyprolylovými zvyškami v Y-pozícii a glycínom (Bornstein, 1979), a iontovými interakciami (Salem, 1975; Rautenberg, 1969).

Každý kolagénový reťazec v trojšroubovici pozostáva z 338 neprerušovaných opakovaní tripletu GXY, kde G je glycín, X často prolín, a Y často hydroxyprolín (Gajko-Galicka, 2002). Prolín a hydroxyprolín sú najčastejšie aminokyseliny na pozíciách X a Y, a množstvo štúdií demonštrovalo ich dôležitosť pre formovanie helixu a jeho stabilitu (Kramer a Berman, 1998; Kramer et al., 1998; Kramer et al., 1999). Napríklad, triplety s hydroxyprolínom v Y-pozícii podporujú rýchlejšie skladanie (Ackerman et al., 1999). Substitúcie glycínu vyúsťujú v spomalené skladanie kolagénu, zapríčiňujúce zvýšenú glykozyláciu reťazcov, a spôsobujú intracelulárnu degradáciu alebo zlú sekréciu (Engel a Prockop, 1991). V OI typ IV, je vzrastajúca evidencia, že fenotyp je spôsobený produkciou štruktúrne abnormálnych molekúl kolagénu typu I; väčšina mutácií postihuje štruktúru $\alpha 2(I)$ reťazca (Wenstrup et al., 1988). OI typ I, najmiernejšia forma, je spojená so zníženou syntézou štruktúrne normálneho $\text{pro}\alpha 1(I)$ (Barsh et al., 1982)

4. Gén COL1A2

Gén COL1A2 má veľkosť 38kb, je lokalizovaný na 7q21.3-q22.1 chromozóme (Vuorio a Crombrughe, 1990; Chu a Prockop, 1993) a pozostáva z 52 exonov. Veľkosť exonov je vždy násobok 9 bp, ktoré kódujú Gly-Xaa-Yaa triplety, Tab.3. (Dagleish, 1997). Väčšina exonov obsahuje 54 alebo 108 párov báz, a konečné kódujúce mRNA v cytoplazme majú veľkosť v rozpätí 5,5 až 7,2 kb (Gajko-Galicka, 2002). Každý zo 43 exonov, ktoré kódujú triple-helikálnu doménu, začína glycínovým kodónom a končí Y-pozíčným kodónom, takže vynechanie exonu prináša in-frame transkripty (Chu a Prockop, 2002), ktoré nenarušia opakovanie Gly-X-Y tripletov. Schematické usporiadanie exonov a intronov v COL1A2 géne je znázornené na Obr.5. (Körkkö et al., 1998).

Každý $\alpha 2$ reťazec obsahuje centrálnu triple-helikálnu doménu z 1014 aminokyselín, ohraničenú propeptidmi na oboch, amino- a karboxyl-terminálnych koncoch (Marini et al., 2007). Proteínové domény $\alpha 2$ reťazca sú zakreslené na Obr.6. (Pollitt et al., 2006).

5. Typy mutácií nájdených v géne COL1A2

Existujú dve základné triedy mutácií v kolagéne typu I, ktoré vyúsťujú v OI – tie ktoré zapríčiňujú kvantitatívny defekt, so syntézou štruktúrne normálneho prokolagénu typu I asi v polovičnom množstve, a tie ktoré spôsobujú syntézu kolagénových molekúl so štruktúrnymi abnormalitami. Prvá skupina mutácií obvykle produkuje predčasný terminačný kodón v kódujúcej sekvencii jednej COL1A1 alely. Z 832 identifikovaných nezávislých mutácií, 682 vyúsťuje v substitúciu glycínových zvyškov v triple-helikálnej doméne kódovaného proteínu (291 v COL1A2, Obr.7.) a 150 mení zostrihové miesta (48 v COL1A2). V kódujúcej sekvencii triple-helikálnej domény, ktorá môže byť písaná GGNNNNNNN₃₃₈, substitúcie v každom G spôsobia substitúciu glycínu. V 43 exonoch v COL1A2 géne, ktoré sa nachádzajú v triple-helikálnej doméne, je deväť mutácií v akceptorovom a 16 v donorovom mieste zostrihu, tri introny majú samostatné mutácie v oboch stranách. Následky pre mRNA a proteín závisia na tom, či sú zmeny zostrihového miesta in-frame alebo produkujú translačný posun čítacieho rámca.

Pretože ten istý glycín môže byť substituovaný štyrmi až šiestimi aminokyselinovými zvyškami, plná mutačná saturácia helikálnej oblasti vyžaduje 1870 odlišných substitúcií v $\alpha 2(I)$. 184 odlišných substitúcií identifikovaných v $\alpha 2(I)$ tvorí len 9,8% zo všetkých možných substitúcií. Substitúcie glycínu serínom, kyselinou aspartátovou a valínom zahrňujú asi tri štvrtiny známych nezávislých udalostí v helikálnej doméne $\alpha 2(I)$. Zatiaľ čo serín, ktorý

obsahuje skoro polovicu (44%) substitúcií za glycín v $\alpha 2(I)$, vzniká zo zámény prvej pozície v glycínovom kodóne, kyselina aspartátová a valín vznikajú zo zámény druhej pozície kodónu.

COL1A2 kodóny s mutáciami v prvej pozícii, ktoré sú spojené s CpG dinukleotidmi, vysvetľujú väčšinu nezávislých opakovaní (Obr.8.); žiadny kodón, ktorý nie je súčasťou CpG dinukleotidu, nemá viac ako štyri opakovania.

Vyskytujú sa aj delécie, inzercie a duplikácie v kolagénovej molekule, takisto ako aj zmeny v karboxyl-terminálnych propeptidoch, ktoré vedú k OI fenotypu (Marini et al., 2007). Pace et al. (2001) identifikovali tri delécie 9 alebo 18 nukleotidov v COL1A2, ktoré predurčovali stratu troch alebo šiestich aminokyselín, a dve duplikácie 18 nukleotidov, vyúsťujúce v inzerciu šiestich aminokyselín v triple-helikálnej doméne. (Obr.9.) Raff et al. (2000) opísali duplikáciu v COL1A2 géne, ktorá viedla k inzercii 477 aminokyselín, 159 Gly-X-Y tripletov, v centre triple-helikálnej domény pro $\alpha 2(I)$ reťazca. Nový reťazec obsahoval sekvenciu kódovanú exonmi 1-32 nasledovanú sekvenciou kódovanou exonmi 12-52, ktorá zdublikovala sekvenciu kódovanú exonmi 12-32. Táto multiexonová duplikácia spôsobuje mierny fenotyp.

Najčastejšie substitúcie aminokyselín a vynechania exonov v COL1A2 sú vypísané v Tab.4. a Tab.5. (Dalglish, 1997). Väčšina prác popisuje mutácie v triple-helikálnej doméne kolagénu, ale bola objavená mutácia napr. aj v C-telopeptide, p.C1195Y. Najviac vynechávaný exon je 16 (3 prípady), a potom nasledujú 12, 20, 21 a 40 (po 2 prípady). Mutácie vynechania exonu nastávajú častejšie v strednej časti molekuly, zatiaľ čo substitúcie glycínu sú rozmiestené pozdĺž celej molekuly.

6. Vplyv niektorých častí génu COL1A2 na kvalitu kolagénovej molekuly

Rôzne následky kolagénových defektov sú dnes dobre doložené; post-translačné nadmerné modifikácie, znížená termálna stabilita triple-helixu, spomalená alebo znížená extracelulárna sekrécia, zvýšená intracelulárna degradácia (Byers, 1990), prítomnosť slučiek v molekule (Vogel et al., 1988; Lightfoot et al., 1992), následky na formovanie vlákien (Kadler et al., 1991; Tsuneyoshi et al., 1991; Torre-Blanco et al., 1992). Napr. delécie, ktoré produkujú pro- $\alpha 2(I)$ reťazce s veľkými vnútornými helikálnymi deléciami, spôsobujú, že molekuly kolagénu typu I obsahujúce tieto skrátené reťazce sú slabo sekretované (Mundlos et al., 1996).

Veľa glycinových substitúcií znižuje termálnu stabilitu triple-helixu (Spotila et al., 1991). V jednej štúdií bola T_m pomalšieho $\alpha 2(I)$ kolagénu v elektroforéze o 2°C nižšia ako kontrolného, čo naznačovalo zníženú stabilitu trojšroubovice. Značné spomalenie v pohyblivosti gélom dokonca aj v absencii nadmernej modifikácie naznačilo prítomnosť slučky v mutovaných $\alpha 2(I)$ reťazcoch. Táto konkrétna aspartátová substitúcia pravdepodobne vytvára veľmi stabilné iónové interakcie s okolitými aminokyselinami, čo deformuje štruktúru $\alpha 2$ reťazca aj helixu (Forlino et al., 1998).

V ďalšej štúdií bola detekovaná substitúcia konzervovaného cysteínu v C-propeptidovej doméne COL1A2 v pacientovi s OI typ I. Tento cysteín, jeden zo siedmich v C-propeptidovej doméne COL1A2, sa podieľa na komplexnom vzore disulfidických väzieb medzi susediacimi pro $\alpha 1(I)$ a pro $\alpha 2(I)$ reťazcami a je vyžadovaný pre vnútroreťazcové formovanie kovalentných väzieb (Pollitt et al., 2006). Mutácie postihujúce intra-reťazcové disulfidické väzby vyúsťujú v spomalené spojovanie reťazcov a vylučovanie premodifikovaných prokolagénových molekúl, ale vedú k stabilným prokolagénovým trimérom a spôsobujú mierny fenotyp (Pace et al., 2001).

Aj nahradenie glycinu aspartátom v pro $\alpha 2(I)$, ktoré blokuje prokolagén C-proteinázové štepenie C-propeptidu, vytvára molekuly, ktoré sú nesprávne prepojené (Lee et al., 1990). Oblasti bohaté na iminokyseliny môžu slúžiť ako trimér stabilizujúce domény, zatiaľ čo oblasti na ne chudobné dovoľujú zvýšenú flexibilitu štruktúry (Pace et al., 2001).

Zostrihové mutácie zahrňujú 20% helikálnych mutácií identifikovaných v pacientoch s OI a môžu viesť k vynechaniu exonu, zahrnutiu intronu alebo aktivácii kryptických zostrihových miest. V $\alpha 2(I)$ sú letálne vynechania exonu lokalizované v karboxylovej polovici reťazca. In-frame mutácie vynechania exonu tiež narušujú skladanie helixu (Marini et al., 2007).

Následkom vynechania exonu 6 je strata miesta pre štepenie N-terminálneho propeptidu, ktorý je preto udržovaný (Dagleish, 1997). Predchádzajúce štúdie ukázali, že niektoré mutácie v kolagénovom helixe majú rozsiahly efekt na prokolagénovú štruktúru v mieste štepenia N-proteinázou (Dombrowski et al., 1989). Následne postihnutá konformácia štepiaceho miesta redukuje tvorbu prokolagénu a spôsobuje hromadenie kolagénu s N-terminálnym propeptidom (Mundlos et al., 1996).

Existuje niekoľko miest v kolagén I lokuse naznačujúcich skôr mutačné hot spoty ako zhodné výskyty (Benušienė a Kučinskas, 2002) Jedným takým bodom je kodón 238 v COL1A2 géne, kde bola Ser substitúcia publikovaná päťkrát a Cys substitúcia raz (Trummer et al., 2001). Ďalšími takými miestami môžu byť kodóny 247, 586, 676, 922

a 1012, v ktorých boli zaznamenané viaceré mutácie (4, 3, 2, 3, 2, po poradí) v rôznych publikáciách, podľa Tab.4. Tieto kódony zhruba odpovedajú aj miestam opakovaného výskytu mutácií na Obr.5. Zaujímavé je, že žiadna z týchto mutácií nespôsobila letálny fenotyp, hoci v kodóne 676 je substitúcia aspartátovou kyselinou, ktorá často tento typ OI zapríčiňuje.

7. Korelácia genotyp - fenotyp u osôb s diagnózou OI

Mutácie v COL1A2 väčšinou nie sú letálne (80%) (Marini et al., 2007). Najbežnejšie mutácie, ktoré spôsobujú viac klinicky významné formy OI, vyúsťujú v substitúciu jedného glycinového zvyšku v triple-helikálnej doméne reťazcov kolagénu typu I (Kuivaniemi et al., 1991; Prockop a Kivirikko, 1984). Substitúcie alanínom majú vo všeobecnosti miernejší fenotyp, takže môžu existovať jedinci, ktorí majú fenotyp na najmiernejšom konci OI spektra a sťažujú klinickú detekciu.

Substitúcie nabitými aminokyselinami, kyselinou glutamovou a aspartátovou a arginínom, sú viac predurčené viesť k letálnym fenotypom ako substitúcie ostatnými aminokyselinami (Marini et al., 2007). Mutácia v pacientovi s letálnou OI, zapríčiňujúca $\alpha 2(I)$ Gly421→Asp substitúciu, je spojovaná s výrazným elektroforetickým oneskorením mutantných $\alpha 2(I)$ reťazcov v oboch, glykozylovanej a neglykozylovanej forme. Rotačne tieňujúca elektrónová mikroskopia pacientových sekretovaných dermálnych prokolagénov odhalila prítomnosť helikálnej slučky okolo pozície mutácie. Tvorba slučiek môže zasahovať do normálneho skladania helixu, práve tak ako do interakcií kolagénových vlákien s kolagénovými a nekolagénovými matrixovými proteínmi. Abnormálny tvar kolagénových molekúl v porovnaní so zvyčajnou pevnou kolagénovou molekulou môže prispievať k závažnosti ochorenia (Forlino et al., 1998).

Valín, s rozvetveným postranným reťazcom, je letálny len v 17% prípadov v $\alpha 2(I)$. Substitúcie glycinu cysteínom sú spojované s letálnym výsledkom v asi 25% prípadov v oboch reťazcoch.

Existuje úzke rozpätie klinických fenotypov, ktoré vyúsťujú z rovnakých substitúcií na piatich glycinových zvyškoch v $\alpha 2(I)$, na ktorých bolo identifikovaných viac ako päť opakovaní. Gly190Ser (p.Gly280Ser) spôsobujú typy I a IV OI, Gly238Ser (p.Gly328Ser) spôsobujú typy III a IV OI, Gly238Cys alebo Gly238Asp vyúsťujú v OI typ III (Marini et al., 2007). Zaujímavé je, že p.Gly328Ser mutácia v COL1A2 bola detekovaná v piatich

nepríbuzných pacientoch naproti tomu, že fenotypy týchto pacientov boli rozdielne, jeden bol klasifikovaný ako OI typ I, ďalší bol typ III a dvaja boli typ IV (Lee et al., 2006).

Štyri rôzne substituujúce zvyšky boli identifikované na glycíne 247 (p.Gly337): cysteín alebo prolín produkujú OI typu III, arginín typ III/IV, a serín typy III (jeden prípad), IV (deväť prípadov) a I (tri prípady).

Substitúcie serínom na glycíne 370 (p.Gly460) produkujú OI typu III (šesť prípadov), II/III (dva prípady) a IV (jeden prípad), zatiaľ čo na glycíne 922 (p.Gly1012) produkujú typ IV (deväť prípadov), III/IV (jeden prípad) a III (tri prípady).

Je len osem glycínov v $\alpha 2(I)$, v ktorých sa našli obe, letálne a neletálne fenotypy. V dvoch glycínoch (helikálne pozície 811 a 859) boli identifikované substitúcie serínom v letálnych aj neletálnych prípadoch. Gly859Ser (p.Gly949Ser) má vždy závažný fenotyp (typ III, II/III alebo II OI), ale Gly811Ser (p.Gly901Ser) má letálne a typ IV OI prípady (Marini et al., 2007).

Substitúcia arginínu za glycín v triple-helikálnej doméne produktov jednej $\alpha 2(I)$ kolagénovej alely (COL1A2) spôsobuje fenotyp OI typ IV (Wenstrup et al., 1988). Gly \rightarrow Pro substitúcia dala vznik závažnému fenotypu, čo je očakávané pri substitúcii cyklickej iminokyseliny miesto glycínu (Ward et al., 2001).

V oboch kolagénových reťazcoch sa vyskytujú dva regióny, v ktorých sa nevyskytujú žiadne substitúcie glycínu, helikálne pozície 484-493 a 721-736. Absencia mutácií v týchto doménach môže poukazovať na embryonálne letálny fenotyp, ktorý je klinicky nedetekovateľný (Marini et al., 2007). Fenotypová expresia choroby môže byť ovplyvnená inými faktormi, genetickými alebo epigenetickými, ktoré môžu hrať rolu v procese formovania kostí (Benušienė a Kučinskas, 2002).

Mutácie v COL1A2 géne sa zdajú byť vzácnou príčinou OI typu I, i keď mutácie v tomto géne môžu spôsobiť niektoré závažné varianty OI (Kuivaniemi et al., 1997). Okolo 9% substitúcií v COL1A2 vedie k miernemu typu I OI, ktorý je bežnejšie výsledkom nonsense mutácií v COL1A1 (Marini et al., 2007). Jedinci s nefunkčnými pro $\alpha 2(I)$ reťazcami majú pravdepodobne zníženú hustotu kostí (Dickson et al., 1984; Chipman et al., 1993; Saban a King, 1996). Tým môžu mať fenotypy, ktoré sú miernejšie ako OI typ I a prekrývajú sa s osteoporózou (Körkkö et al., 1998).

OI-I môže vzniknúť aj z mutácií vynechania exonu v COL1A2, ktoré sú umiestnené smerom k amino-terminálnemu koncu triple-helixu (Nicholls et al., 1992; Zhuang et al., 1993; Mottes et al., 1994; Superti-Furga et al., 1993), a v jednom publikovanom prípade z glycínovej substitúcie (Wenstrup et al., 1991). Šesť zostrihových mutácií v COL1A2, ktoré

vedú k OI typ I, sú spojované s vynechaním exonu v 5'-polovici mRNA (Marini et al., 2007). Mutácie, ktoré spôsobujú predčasné ukončenie reťazca alebo tie, čo neprodukurujú žiadny C-terminálny propeptid, vyúsťujú v OI typ I, pretože skrátené α -reťazce sa nepodielajú na formovaní triple-helixu (Dalglish, 1997).

Fenotypové efekty mutácií v reťazci, ktoré majú za následok abnormálne molekuly prokolagénu typu I, sú viac škodlivé ako null mutácie (Gajko-Galicka, 2002). K „null allele“ fenotypu vedú predčasné stop kodóny vzniknuté bodovými mutáciami alebo zmutovaným RNA zostrihom (Willing et al., 1994; Redford-Badwal et al., 1996). Mutácie v COL1A1 géne môžu byť viac škodlivé, a dokonca letálne, pretože zahrňujú tri štvrtiny všetkých syntetizovaných molekúl prokolagénu typu I. Naproti tomu, podobná mutácia v COL1A2 géne spôsobí stratu len polovici vyrobených molekúl (Obr.10.) (Gajko-Galicka, 2002).

Mutácie bližšie ku karboxylovému koncu vyúsťujú vo viac závažný fenotyp ako mutácie blízko amino-terminálneho konca reťazca (Starman et al., 1989). V amino-koncových 30% triple-helikálnej oblasti $\alpha 2(I)$ reťazca, všetky substitúcie glycínu majú neletálny fenotyp. V karboxyl-terminálnych dvoch tretinách $\alpha 2(I)$ triple-helikálneho regiónu, všetky substituované zvyšky majú letálne a neletálne fenotypy pozdĺž celého reťazca (Marini et al., 2007). Tento gradient je modifikovaný vlastnosťami substituujúcich aminokyselín, tak že niektoré z nich môžu byť letálne pri inkorporácii v akomkoľvek mieste pozdĺž celej domény (napr. kyselina aspartátová), zatiaľ čo iné môžu ukazovať posun letálneho k neletálnemu v karboxyl-terminálnej polovici reťazca (napr. cysteín) (Gajko-Galicka, 2002).

Letálne mutácie v $\alpha 2(I)$ reťazci sa vyskytujú v ôsmich skupinách, ktoré sú rozmiestnené pozdĺž dvoch tretín reťazca (Obr.11.). Zoradenie hraníc skupín ukazuje na mapu dávajúcu správne fenotypové pridelenie pre 86% glycínových substitúcií v $\alpha 2(I)$. Letálne regióny súvisia s proteoglykan viazajúcimi miestami pozdĺž vlákien, naznačujúce rolu fibril-matrix interakcií (Marini et al., 2007). Mutovaný kolagén je nielen vkladán do matrix, ale nie je ani degradovaný a ostáva stálou súčasťou matrix (Mundlos et al., 1996).

Letálne skupiny glycínových substitúcií 2, 6 a 8 sa každá prekrývajú s jednou alebo dvoma letálnymi mutáciami vynechania exonu. Letálna skupina 3 sa prekrýva s letálnymi vynechaniami exonov 32 alebo 33. Zostrihové mutácie v intronoch 32 a 33 majú letálne aj neletálne prípady, letálne sú spojené s vynechaním exonu, zatiaľ čo neletálne s čiastočným zahrnutím intronu (6 alebo 18 nt.). Žiadne mutácie vynechania exonu neboli identifikované v skupinách 1, 5 a 7. (4) Skupina 4 sa väčšinou priraduje k exonu 36, ktorý spôsobuje OI typ III (Marini et al., 2007).

Mutácie vedúce k letálnym formám zahŕňujú veľké delécie a inzercie COL1A2 génu (Cohen-Solal et al., 1994). Delécia v COL1A2 siahajúca od exonu 34 po exon 40 viedla k OI typ II (Willing, 1988). Mutácia p.Val987_Pro989dup ukazuje fenotypickú variabilitu v rodine, siahajúcu od OI typu I k typu IV (Lee et al., 2006).

8. Záver

Hoci viac ako dve dekády ubehli od identifikácie prvej COL1A1 mutácie v kojencovi s letálnou OI, objasnenie vzťahu mutácie a fenotypu je stále ťažko dosiahnuteľné (Marini et al., 2007). Aj keď je kolagén najhojnejším proteínom v extracelulárnej matrix kostí, presný mechanizmus, ktorým mutácie v COL1A1 a COL1A2 vedú k deformite a lámavosti kostí, je nejasný (Forlino et al., 1998). Pochopenie pravidiel štruktúrnych mutácií zlepši genetické poradenstvo a malo by uľahčiť naše porozumenie normálnej funkcii kolagénu a patogenéze kostnej choroby v OI (Marini et al., 2007). Zatiaľ čo definovanie spektra mutácií zapríčínujúcich OI ostáva dôležitým cieľom, hlavnou výzvou výskumu je definícia molekulárnych mechanizmov, ktorými štruktúrne mutácie kolagénu postihujú komplexnú organizáciu a homeostázu extracelulárnej matrix (Mundlos et al., 1996).

Vzhľadom nato, že bolo doteraz odhalených len necelých 10% glycinových mutácií z celkového mutačného spektra, mali by sme sa pomocou molekulárne-genetických analýz pacientov s OI snažiť o identifikáciu čo najväčšieho počtu nových mutácií, ktoré by pomohli objasniť vzťah konkrétnych mutácií k fenotypu a potvrdili alebo možno vyvrátili regionálny model letálnych substitúcií v géne COL1A2. Určite by bolo prínosné zistiť, či sa v niektorých potratených embryách nevyskytujú mutácie v aminokyselinovej oblasti 484-493, pretože sa nachádza v letálnom klastri, a mutácie v týchto miestach môžu teda viesť k embryonálne letálnemu fenotypu, ako naznačila Marini et al. (2007). Avšak oblasť 721-736, v ktorej tiež neboli objavené žiadne mutácie, sa nenachádza v letálnom klastri, takže by skôr mohlo ísť o mutácie s veľmi miernym fenotypom, ktorý nie je klinicky považovaný za OI ale napr. za osteoporózu. Tiež by bolo zaujímavé zistiť, aké epigenetické faktory sa môžu podieľať na odlišnom fenotype u pacientov s rovnakými mutáciami.

Zoznam použitej literatúry

Ackerman M.S., Bhate M., Shenoy N., Beck K., Ramshaw J.A., Brodsky B. (1999) Sequence dependence of the folding of collagen-like peptides. Single amino acids affect the rate of triple-helix nucleation. *J Biol Chem* 274:7668-7673.

Ahmad N.N., Ala-Kokko L., Knowlton R.G., Jimenez S.A., Weaver E.J., Maguire J., Tasman W., et al (1991) Stop codon in the procollagen gene (COL2A1) in a family with Stickler syndrome (arthro-ophthalmopathy). *Proc Natl Acad Sci USA* 88:6624-6627.

Ahmad N.N., McDonald-McGinn D.M., Zackai E.H., Knowlton R.G., LaRossa D., DiMascio J., Prockop D.J. (1993) A second mutation in the type II procollagen gene (COL2A1) causing Stickler syndrome (arthro-ophthalmopathy) is also a premature termination codon. *Am J Hum Genet* 52:39-45.

Ala-Kokko L., Prockop D.J. (1990) Completion of the intron-exon structure of the gene for human type II procollagen (COL2A1): variations in the nucleotide sequences of the alleles from three chromosomes. *Genomics* 8:454-460.

Barsh G.S., David K.E. a Byers P.H. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79,3838-3842.

Berg R. A. a Prockop D. J. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 62,115-120.

Benušienė E. a Kučinskas V. (2002) Screening for mutations in patients with osteogenesis imperfecta and estimation of clinical manifestation. *Biologija*, Nr. 4.

Bogaert R., Tiller G.E., Weis M.A., Gruber H.E., Rimoin D.L., John D.H., Eyre D.R. (1992) An amino acid substitution (gly853-*glu) in the collagen cl(II) chain produces hypochondrogenesis. *J Biol Chem* 267:22522-22526.

Bogaert R., Wilkin D., Wilcox W.R., Lachman R., Rimoin D., Cohn D.H., Eyre D.R.(1994) Expression, in Cartilage, of a 7-Amino-Acid Deletion in Type 11 Collagen from Two Unrelated Individuals with Kniest Dysplasia. *Am.J. Hum. Genet.* 55:1128-1136.

Bornstein P. a Traub W. (1979) v The Proteins (Neurath, H., and Hill, R. L., eds) Vol. 4, pp. 411-632, Academic Press, New York.

Byers P. H. (1990) Zkends Genet. 6, 293-300.

Byers R.H.: Osteogenesis imperfecta. V: Connective Issue and Heritable Disorders, ed. by Royce, R.M. a Steinman B., Wiley-Liss, New York, (1993) pp. 317-350.

Byers P.H., Cole W.G. (2002). Osteogenesis imperfecta. V: Royce P.M., Steinmann B., editors. Connective tissue and its heritable disorders: molecular, genetic and medical aspects. New York: Wiley-Liss. p 385–430.

Chipman S.D., Sweet H.O.,McBride D.J. Jr., Davisson M.T.,Marks S.C. Jr., Shuldiner A.R., Wenstrup R.J., et al (1993) Defective proa2(I) collagen synthesis in a recessive mutation in mice: a model of human osteogenesis imperfecta. Proc Natl Acad Sci USA 90:1701–1705.

Chu M.-L. a Prockop D.J. (1993) V Royce P.M. a Steinmann B. (eds), Connective Tissue and its Heritable Disorders. Molecular, Genetic, and Medical Aspects. Wiley-Liss, New York, pp. 149–165.

Chu M.L., Prockop D.J. (2002) Collagen: gene structure. V: Royce P.M., Steinmann B., editors. Connective tissue and its heritable disorders: molecular, genetic and medical aspects. New York: Wiley-Liss. p 223–248.

Cohen-Solal L., Zylberberg L., Sangalli A., Gomez Lira M. and Mottes M. (1994) Substitution of an Aspartic Acid for Glycine 700 in the a2(I) Chain of Type I Collagen in a Recurrent Lethal Type II Osteogenesis Imperfecta Dramatically Affects the Mineralization of Bone. The Journal of Biological Chemistry, Vol. 269, No. 20, Issue of May 20, pp. 14751-14758.

Dalgleish, R. (1994) Mutations in Type I and I~vpe 111 Collagen Genes, Oxford, Bios Scientific, 49-65.

Dalgleish R. (1997) The human type I collagen mutation database. *Nucleic Acids Research*, Vol. 25, No. 1 181–187.

De Paillette L., Aicardi J., Goutieres F. (1989) Ullrich's congenital atonic sclerotic muscular dystrophy: a case report. *J Neurol* 236:108–110.

Demir E., Sabatelli P., Allemand V., Ferreiro A., Moghadaszadeh B., Makrelou M., Topaloglu H., Echenne B., Merlini L. and Guicheney P. (2002) Mutations in COL6A3 Cause Severe and Mild Phenotypes of Ullrich Congenital Muscular Dystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* 70:1446–1458.

Dickson L.A., Pihlajaniemi T., Deak S., Pope F.M., Nicholls A., Prockop D.J., Myers J.C. (1984) Nuclease S1 mapping of a homozygous mutation in the carboxylpropeptide-coding region of the pro α 2(I) collagen gene in a patient with osteogenesis imperfecta. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:4524–4528.

Dombrowski K. E., Vogel B. E. a Prockop D. J. (1989) *Biochemistry* 28, 7107–7112.

Eyre D.R., Upton M.P., Shapiro F.D., Wilkinson R.H., Vawter G.F. (1986) Nonexpression of cartilage type II collagen in a case of Langer-Saldino achondrogenesis. *Am J Hum Genet* 39:52-67.

Forlino A., Keene D.R., Schmidt K. and Marini J.C. (1998) An α 2(I) Glycine to Aspartate Substitution Is Responsible for the Presence of a Kink in Type I Collagen in a Lethal Case of Osteogenesis Imperfecta. *Matrix Biology* Vol. 17, pp. 575-584.

Gajko-Galicka A. (2002) Mutations in type I collagen genes resulting in osteogenesis imperfecta in humans. *Acta Biochimica Polonica*, Vol. 49 No. 2, 433-441.

Godfrey M. (1993) Molecular Heterogeneity: A Clinical Dilemma, Clinical Heterogeneity: A Molecular Dilemma. *Am. J. Hum. Genet.* 53:22-25.

Halász K., Kassner A., Mörgelin M. and Heinegård D. (2007) COMP Acts as a Catalyst in Collagen Fibrillogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 282, No. 43, pp. 31166–31173.

Horton W.A., Machado M.A., Ellard J., Campbell D., Bartley J., Ramirez F., Vitale E., et al (1992) Characterization of a type II collagen gene (COL2A1) mutation identified in cultured chondrocytes from human hypochondrogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:4583-4587.

Howard F.M. (1990) Lax ligament syndrome in children associated with blue sclera and bat ears. *British Journal of General Practice*, 40, 233-235.

Jöbsis G.J., Keizers H., Vreijling J.P., de Visser M., Speer M.C., Wolterman R.A., Baas F., Bolhuis P.A. (1996) Type VI collagen mutations in Bethlem myopathy, an autosomal dominant myopathy with contractures. *Nat Genet* 14:113–115.

Kadler K. E., 'Ibrrre-Blanco A., Adachi E., Vogel B. E., H ojima Y. a Prockop D.J. (1991) *Biochemistry* 30,5081-5088.

Katzenstein P.L., Campbell D.F., Machado M.A., Horton W.A., Lee B., Ramirez F. (1992) A type II collagen defect in a new family with SED tarda and early onset osteoarthritis (OA). 56th Annu Meet Am Coll Rheumatol, Atlanta, GA, Abstr No 41, S41.

Kefalides N. A. (1971) Isolation of a collagen from basement membranes containing three identical α -chains. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 45, 226-234.

Kornak U. a Mundlos S. (2003) Genetic Disorders of the Skeleton: A Developmental Approach. *Am. J. Hum. Genet.* 73:447–474.

Körkkö J., Ala-Kokko L., De Paepe A., Nuytinck L., Earley J. and Prockop D.J. (1998) Analysis of the COL1A1 and COL1A2 Genes by PCR Amplification and Scanning by Conformation-Sensitive Gel Electrophoresis Identifies Only COL1A1 Mutations in 15 Patients with Osteogenesis Imperfecta Type I: Identification of Common Sequences of Null-Allele Mutations. *Am. J. Hum. Genet.* 62:98–110.

Körkkö J., Ritvaniemi P., Haataja L., Kaariainen H., Kivirikko K.I., Prockop D.J., Ala-Kokko L. (1993) Mutation in type II procollagen (COL2A1) that substitutes aspartate for glycine at-67 and that causes cataracts and retinal detachment: evidence for molecular heterogeneity in the Wagner syndrome and the Stickler syndrome (arthro-ophthalmopathy). *Am J Hum Genet* 53:55-61.

Kramer R.Z., Berman H.M. (1998) Patterns of hydration in crystalline collagen peptides. *J Biomol Struct Dyn* 16:367-380.

Kramer R.Z., Vitagliano L., Bella J., Berisio R., Mazzarella L., Brodsky B., Zagari A., Berman H.M. (1998) X-ray crystallographic determination of a collagen-like peptide with the repeating sequence (Pro-Pro-Gly). *J Mol Biol* 280:623-638.

Kramer R.Z., Bella J., Mayville P., Brodsky B., Berman H.M. (1999) Sequence dependent conformational variations of collagen triple-helical structure. *Nat Struct Biol* 6:454-457.

Kuivaniemi H., Tromp G.A. a Prockop D.J. (1991) Mutations in collagen genes: Causes of rare and some common diseases in humans. *FASEB J.* 5: 2052-2060.

Kuivaniemi H., Tromp G., Prockop D.J. (1997) Mutations in fibrillar collagens (types I, II, III and XI), fibril-associated collagen (type IX), and network-forming collagen (type X) cause a spectrum of diseases of bone, cartilage and blood vessels. *Hum Mutat* 9:300–315.

Lee B., Vissing J.H., Ramirez F., Rogers D., Rimoin D. (1989) Identification of the molecular defect in a family with spondyloepiphyseal dysplasia. *Science* 244:978-980.

Lee K.-S., Song H.-R., Cho T.-J., Kim H.J., Lee T.-M., Jin H.-S., Park H.-Y., Kang S., Jung S.-C. and Koo S.K. (2006) Mutational Spectrum of Type I Collagen Genes in Korean Patients With Osteogenesis Imperfecta. *Human Mutation, Mutation in Brief #894*.

Lightfoot S. J., Holmes D. F., Brass A., Grant M. E., Byers P. H. a Kadler K. E. (1992) *J. Biol. Chem.* 267,25521-25528.

Marini J.C. (2004) Osteogenesis imperfecta. In: Behrman RE, Kliegman RM, Jensen HB, editors. Nelson's textbook of pediatrics. Philadelphia: Saunders. p 2336–2338.

Marini J.C., Forlino A., Cabral W.A., Barnes A.M., San Antonio J.D., Milgrom S., Hyland J.C., Körkkö J., Prockop D.J., De Paepe A., Coucke P., Symoens S., Glorieux F.H., Roughley P.J., Lund A.M., Kuurila-Svahn K., Hartikka H., Cohn D.H., Krakow D., Mottes M., Schwarze U., Chen D., Yang K., Kuslich C., Troendle J., Dalgleish R. and Byers P.H. (2007) Consortium for Osteogenesis Imperfecta Mutations in the Helical Domain of Type I Collagen: Regions Rich in Lethal Mutations Align With Collagen Binding Sites for Integrins and Proteoglycans. *Human Mutation* 28(3), 209-221.

McGee J. O'D., Fallon A. Hepatic cirrhosis-a collagen formative disease? *J. clin. Path.*, 31, Suppl. (Roy. Coll. Path.), 12, 150-157.

Mottes M., Sangalli A., Valli M., Forlino A., Gomez-Lira M., Antoniazzi F., Constantinou-Deltas C. D., Cetta G. a Pignatti P. F. (1994) *Hum. Genet.* 93, 681–687.

Mundlos S., Chan D., Weng Y.M., Sillence D.O., Cole W.G. and Bateman J.F. (1996) Multiexon Deletions in the Type I Collagen COL1A2 Gene in Osteogenesis Imperfecta Type IB. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 271, No. 35, Issue of August 30, pp. 21068–21074.

Nicholls A. C., Oliver J., Renouf D. V., Heath D. A. a Pope F. M. (1992) *Hum. Genet.* 88, 627–633.

Pace J.M., Atkinson M., Willing M.C., Wallis G. and Byers P.H. (2001) Deletions and Duplications of Gly-Xaa-Yaa Triplet Repeats in the Triple Helical Domains of Type I Collagen Chains Disrupt Helix Formation and Result in Several Types of Osteogenesis Imperfecta. *Human Mutation* 18:319-326.

Pace J.M., Kuslich C.D., Willing M.C., Byers P.H. (2001) Disruption of one intra-chain disulphide bond in the carboxyl-terminal propeptide of the pro α 1(I) chain of type I procollagen permits slow assembly and secretion of overmodified, but stable procollagen trimers and results in mild osteogenesis imperfecta. *J Med Genet* 38:443-449.

Pepe G., Bertini E., Giusti B., Brunelli T., Comeglio P., Saitta B., Merlini L., Chu M.L., Federici G., Abbate R. (1999) A novel de novo mutation in the triple helix of the COL6A3 gene in a two-generation Italian family affected by Bethlem myopathy: a diagnostic approach in the mutations' screening of type VI collagen. *Neuromuscul Disord* 9:264–271.

Pollitt R., McMahon R., Nunn J., Bamford R., Afifi A., Bishop N. and Dalton A. (2006) Mutation Analysis of COL1A1 and COL1A2 in Patients Diagnosed With Osteogenesis Imperfecta Type I-IV. *Human Mutation, Mutation in Brief #901*.

Raff M.L., Craigen W.J., Smith L.T., Keene D.R., Byers P.H. (2000) Partial COL1A2 gene duplication produces features of osteogenesis imperfecta and Ehlers-Danlos syndrome type VII. *Hum Genet* 106 :19–28.

Rautenberg J. a Kuhn K. (1969) Hoppe-Seyler's 2. *Physiol. Chem.* 349,611-622.

Redford-Badwal D., Stover M.L., Valli M., McKinstry B., Rowe D.H. (1996) Nuclear retention of COL1A1 messenger RNA identifies null alleles causing mild osteogenesis imperfecta. *J Clin Invest* 97:1035–1040.

Reginato A.M. and Olsen B.R. (2002) The role of structural genes in the pathogenesis of osteoarthritic disorders. *Arthritis Res* 2002, 4:337-345.

Ricci E., Bertini E., Boldrini R., Sabatelli M., Servidei S., Mazziotta M.R., Bosman C., Tonali P. (1988) Late onset scleroatonic familial myopathy (Ullrich disease): a study of two sibs. *Am J Med Genet* 31:933–942.

Richards A.J., Narcisi P., Ferguson C., Cobben J.M., Pope F.M. (1994) Two new mutations affecting the splice donor site of COL3A1 IVS37 and causing skipping of exon 37 in patients with Ehlers- Danlos syndrome type IV. *Hum Mol Genet* 3:1901-1902.

Rimoin D.L., Lachman R.S. (1990) The chondrodysplasias. In: Emery AEH, Rimoin DL (eds) *Principles and practice of medical genetics*, 2d ed. Churchill-Livingstone, New York, pp 835-932.

Saban J., King D. (1996) PCR genotyping of mutant mice. *Biotechniques* 21:190–192.

Salem G. a Traub W. (1975) *FEBS Lett.* 51,94-99.

Sasaki T., Hohenester E., Zhang R.Z., Gotta S., Speer M.C., Tandan R., Timpl R., Chu M.L. (2000) A Bethlem myopathy Gly to Glu mutation in the von Willebrand factor A domain N2 of the collagen $\alpha 3(\text{VI})$ chain interferes with protein folding. *FASEB J* 14:761–768.

Sillence D.O., Rimoin D.L., Danks D.M. (1979) Clinical variability in osteogenesis imperfecta-variable expressivity or genetic heterogeneity. *Birth Defects Orig Artic Ser* 15:113–129.

Spotila L.D., Constantinou C.D., Sereda L., Ganguly A., Riggs B.L. and Prockop D.J. (1991) Mutation in a gene for type I procollagen (COL1A2) in a woman with postmenopausal osteoporosis: Evidence for phenotypic and genotypic overlap with mild osteogenesis imperfecta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 88, pp. 5423-5427.

Spranger J., Winterpacht A., Zabel B. (1994) The type II collagenopathies: a spectrum of chondrodysplasias. *Eur J Pediatr* 153: 56-65.

Starman B.J., Eyre D., Charbonneau H., Harrylock M., Weis M.A., Weiss L., Graham J.M., Byers P.H. (1989) The position of substitution for glycine by cysteine in the triple helical domain of the pro $\alpha 1(\text{I})$ chains of type I collagen determines the clinical phenotype. *J Clin Invest.*; 84: 1206–14.

Superti-Furga A., Raghunath M., Pistone F. M., Romano C. a Steinmann B. (1993) *Connect. Tissue Res.* 29, 31–39.

Tiller G.E., Rimoin D.L., Murray L.W., Cohn D.H. (1990) Tandem duplication within a type II collagen gene (COL2A1) exon in an individual with spondyloepiphyseal dysplasia. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:3889-3893.

Tiller G.E., Weis M.A., Lachman R.S., Cohn D.H., Rimoin D.L., Eyre D.R. (1993) A dominant mutation in the type II collagen gene (COL2A1) produces spondyloepimetaphyseal dysplasia (SEMD), Strudwick type. *Am J Hum Genet Suppl* 53:209.

Torre-Blanco A., Adachi E., Hojima Y., Wotton J. A. M., Minor R. R. a Prockop D. J. (1992a) *J. Biol. Chem.* 267,2650-2655.

Torre-Blanco A., Adachi E., Romanic A. M. a Prockop D. J. (1992b) *J. Biol. Chem.* 267,4968-4973.

Trumber T., Brenner R., Just W., Vogel W., Kennerknecht I. (2001) Recurrent mutations in the COL1A2 gene in patients with osteogenesis imperfecta. *Clin Genet*; 59(5): 338-43.

Tsipouras P. a Ramirez F. (1987) *J. Med. Genet.*, 24, 2-8.

Tsuneyoshi T., Westerhausen A., Constantinou C . D. a Prockop D. J. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 15608-15613.

Vikkula M., Ritvaniemi P., Vuorio A.F., Kaitila I., Ala-Kokko L., Peltonen L. (1993) A mutation in the amino-terminal end of the triple helix of type II collagen causing severe osteochondrodysplasia. *Genomics* 16:282-285.

Vissing H., D'Alessio M., Lee B., Ramirez F., Godfrey M., Hollister D.W. (1989) Glycine to serine substitution in the triple helical domain of pro- α 1 (II) collagen results in a lethal perinatal form of short-limbed dwarfism. *J Biol Chem* 264:18265-18267.

Vogel B. E., Doeiz R., Kadler K. E., Hojima Y., Engel J. a Prockop D. J. (1988) *J. Biol. Chem.* 263,19249-19255.

Vuorio E. a de Crombrugge B. (1990) *Annu. Rev. Biochem.*, 59, 837-872.

Ward L.M., Lalic L., Roughley P.J. a Glorieux F.H. (2001) Thirty-three Novel COL1A1 and COL1A2 Mutations in Patients With Osteogenesis Imperfecta Types I-IV. *Human Mutation, Mutation in Brief #414.*

Wenstrup R.J., Cohn D.H., Cohen T. and Byers P.H. (1988) Arginine for Glycine Substitution in the Triple-helical Domain of the Products of One $\alpha 2(I)$ Collagen Allele (COL1A2) Produces the Osteogenesis Imperfecta Type IV Phenotype. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 263, No. 16, Issue of June 5, pp. 7734-7740.

Wenstrup R. J., Shrago-Howe A. W., Lever L. W., Phillips C. L., Byers P. H. a Cohn D. H. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 2590–2594.

Wilkin D.J., Weis M.A., Gruber H.E., Rimoin D.L., Eyre D.R., John D.H. (1993) An exon-skipping mutation in the type II collagen gene (COL2A1) produces Kniest dysplasia. *Am J Hum Genet Suppl* 53:210.

Williams C.J., Considine E.L., Knowlton R.G., Reginato A., Neumann G., Harrison D., Buxton P., et al. (1993) Spondyloepiphyseal dysplasia and precocious osteoarthritis in a family with an arg75--cys mutation in the procollagen type II gene (COL2A1). *Hum Genet* 92:499-505.

Willing M. C., Cohn D. H., Starman B., Holbrook K. A., Greenberg C. R. a Byers P. H. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 8398–8404.

Willing M.C., Deschenes S.P., Scott D.A., Byers P.H., Slayton R.L., Pitts S.H., Arikat H., Roberts E.J. (1994): Osteogenesis imperfecta type I: Molecular heterogeneity for COL1A1 null alleles of type I collagen. *Am J Hum Genet* 55:638–647.

Winterpacht A., Hilbert H., Schwarze U., Mundlos S., Spranger J., Zabel B.U. (1993) Kniest and Stickler phenotypes caused by collagen type II gene (COL2A1) defect. *Nature Genet* 3:323-326.

Winterpacht A. Familial early osteoarthrosis with mild chondrodysplasia due to a type II procollagen gene (COL2A1) point mutation resulting in a serine for glycine 274 substitution. *Hum Mutat* (in press).

Zhuang J., Tromp G., Kuivaniemi H., Nakayasu K. a Prockop D. J.(1993) *Hum. Genet.* 91, 210–216.

Internetové zdroje

http://images.google.cz/imgres?imgurl=http://www.thachers.org/images/Osteogenesis_imperfecta_blue_sclera.JPG&imgrefurl=http://www.thachers.org/orthopedics.htm&h=614&w=1106&sz=70&hl=cs&start=11&um=1&tbnid=RSDmjaYp6TftsM:&tbnh=83&tbnw=150&prev=/images%3Fq%3Dosteogenesis%2Bimperfecta%26um%3D1%26hl%3Dcs%26lr%3D%26sa%3DN , 2008.

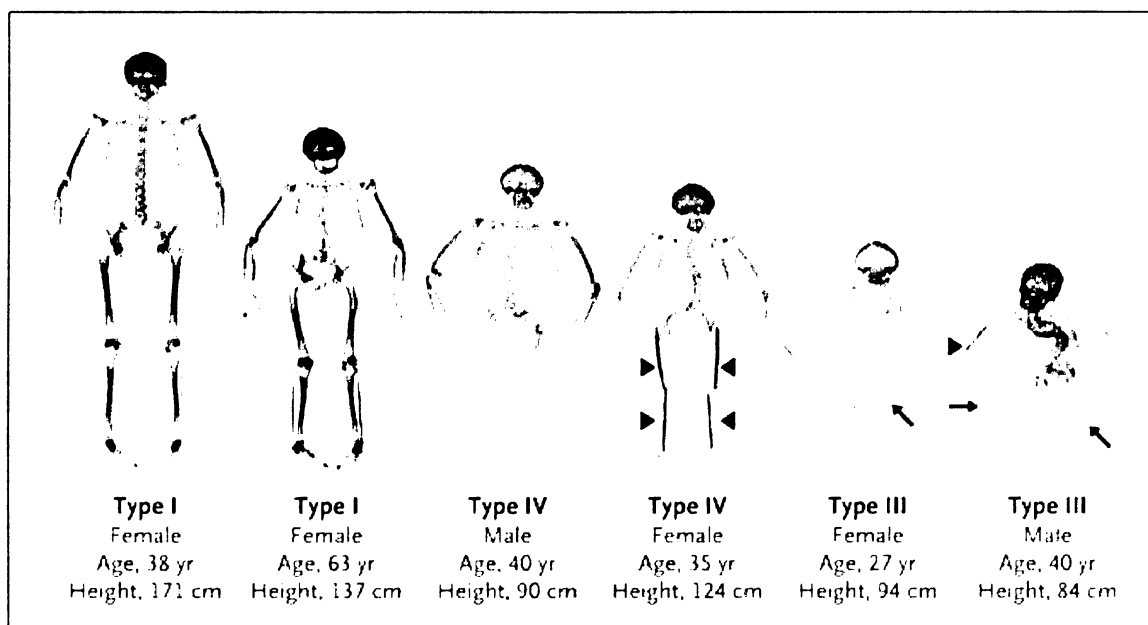
http://images.google.cz/imgres?imgurl=http://www.wheelsonline.com/images/oi3.jpg&imgrefurl=http://www.wheelsonline.com/ortho/osteogenesis_imperfecta&h=640&w=480&sz=10&hl=cs&start=15&um=1&tbnid=N4ijSvM71w6x9M:&tbnh=137&tbnw=103&prev=/images%3Fq%3Dosteogenesis%2Bimperfecta%26um%3D1%26hl%3Dcs%26lr%3D%26sa%3DN , 2008.

http://images.google.cz/imgres?imgurl=http://www.medcyclopaedia.com/upload/book%2520of%2520radiology/chapter14/nic_k14_612.jpg&imgrefurl=http://www.medcyclopaedia.com/library/radiology/chapter14/14_7.aspx&h=438&w=300&sz=53&hl=cs&start=1&um=1&tbnid=MtsEqIRVqaEahM:&tbnh=127&tbnw=87&prev=/images%3Fq%3Dosteogenesis%2Bimperfecta%2Btype%2BII%26um%3D1%26hl%3Dcs%26lr%3D , 2008.

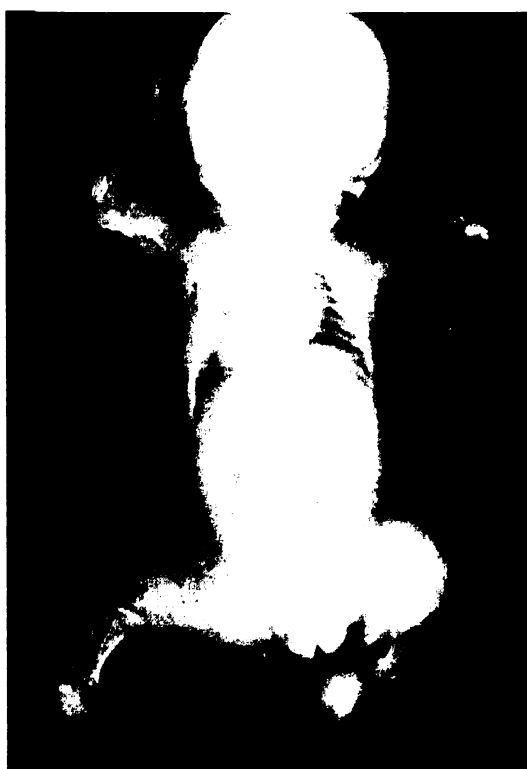
Prílohy

Tab.1. Klinická klasifikácia OI, upravená Sillenceova klasifikácia (Marini, 2007).

Typ	Dedičnosť	Klinické príznaky	Ultrazvukové nálezy	Prvá ultrazvuková detekcia
I	Autozomálne dominantná	Zlomeniny s malou alebo žiadnou deformáciou končatín, modrá sklera, normálny vzrast, strata sluchu, dentinogenesis imperfecta (DI)	Vzácnne, ohnutia alebo zlomeniny dlhých kostí	Od 20 týždňov ale nezvyklá
II	Autozomálne dominantná	Perinatálne letálny typ, nedostatočne mineralizovaná lebka, <i>micromelic</i> kosti, obrúbené rebrá na röntgene, deformity kostí, platyspondyly	Nedostatočná mineralizácia, zlomené a skrútené končatiny, tenké obrúbené rebrá, zlomeniny a ohnutia dlhých kostí	Od 14 týždňov
III	Autozomálne dominantná	Postupne deformujúci typ, mierne deformácie končatín pri narodení, rôzne zafarbenie sklery, veľmi malý vzrast, DI	Tenké rebrá, krátke končatiny, zlomeniny, nedostatočne mineralizovaná lebka	Od 18 týždňov
IV	Autozomálne dominantná	Normálna sklera, mierne deformácie končatín so zlomeninami, rôzne malý vzrast, DI, niekedy strata sluchu	Vzácnne, ohnutia alebo zlomeniny dlhých kostí	Po 20 týždňoch ale nezvyklá
	Nové typy OI založené na histológii kostí			
V	Autozomálne dominantná	Podobný OI IV plus kalcifikácia interosseovej membrány predlaktia, lúčovité dislokácie hlavy, hyperplastická formácia kalusov	Neznáme	Nepopísané
VI	Neznáma	Viac zlomenín ako v OI IV, stlačené zlomeniny stavcov, bez DI	Neznáme	Nepopísané
VII	Autozomálne recesívna	Vrodené zlomeniny, biela sklera, skoré deformácie nôh, coxa vara, osteopenia	Slabo mineralizovaná kostra so závažnou <i>micromelia</i>	Nepopísané
VIII	Autozomálne recesívna	Nepopísané	Nepopísané	Nepopísané



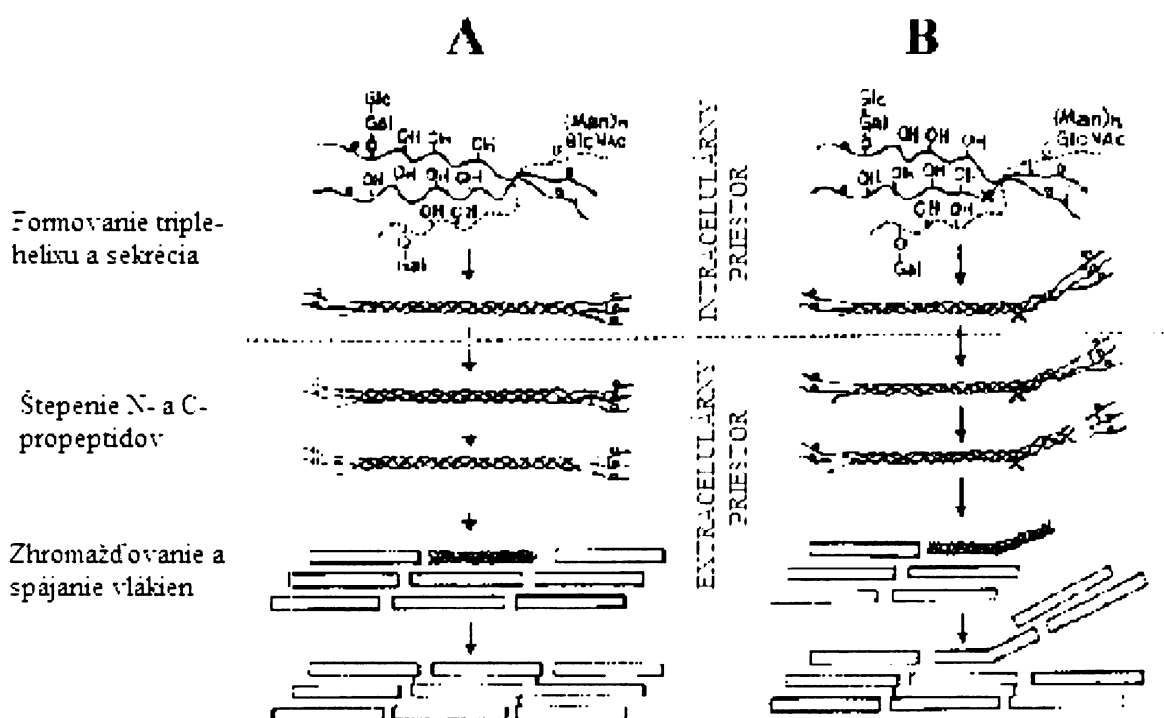
Obr.1. Röntgenové záznamy pacientov s OI typ I, IVa III.



Obr.2. OI typ II. Závažná neonatálna forma. Kojenec mal skrátene končatiny. Sú viditeľné mnohočetné hojace sa zlomeniny a ohnutia týchto kostí.

Tab.2. Domény kolagénu typu I a ich počet aminokyselin (Dagleish, 1997).

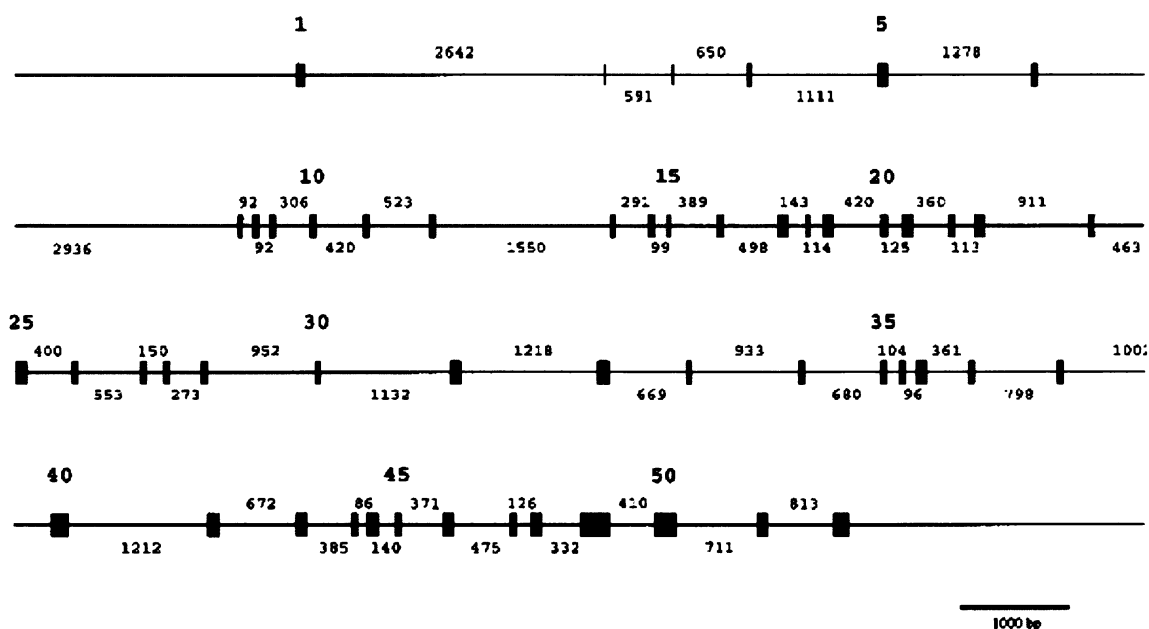
Doména	pro α 1(I)	pro α 2(I)
N-terminálna	161	79
Signálny peptid	22	22
N-propeptid	139	57
Kolagénová	1057	1040
N-telopeptid	17	11
Triplehelix	1014	1014
C-telopeptid	26	15
C-terminálna		
C-propeptid	246	247



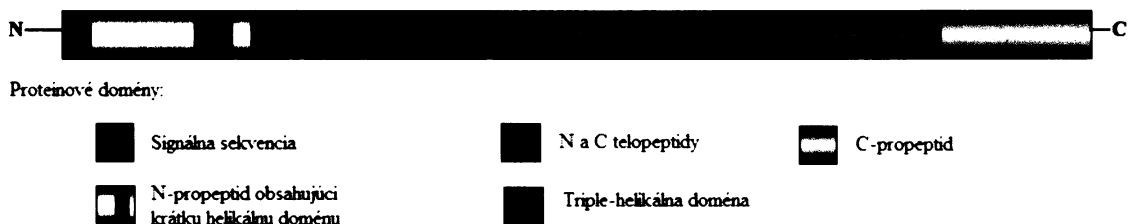
Obr.3. A. Schematická ukážka intracelulárnych a extracelulárnych krokov vyžadovaných v syntéze, spracovaní a skladaní molekúl kolagénu typu I do vlákien. B. Mutácia, ktorá spôsobila konformačnú zmenu ako slučku vedúcu k nesprávnemu formovaniu vlákna. Symbol X v prokolagénovom reťazci označuje bodovú mutáciu (Gajko-Galicka, 2002).



Obr.4. Modrá sklera.



Obr.5. Schematické zobrazenie génového usporiadania ľudského COL1A2 génu. Exony a introny sú zakreslené v mierke, presné veľkosti sú dané pre introny (Körkkö, 1998).



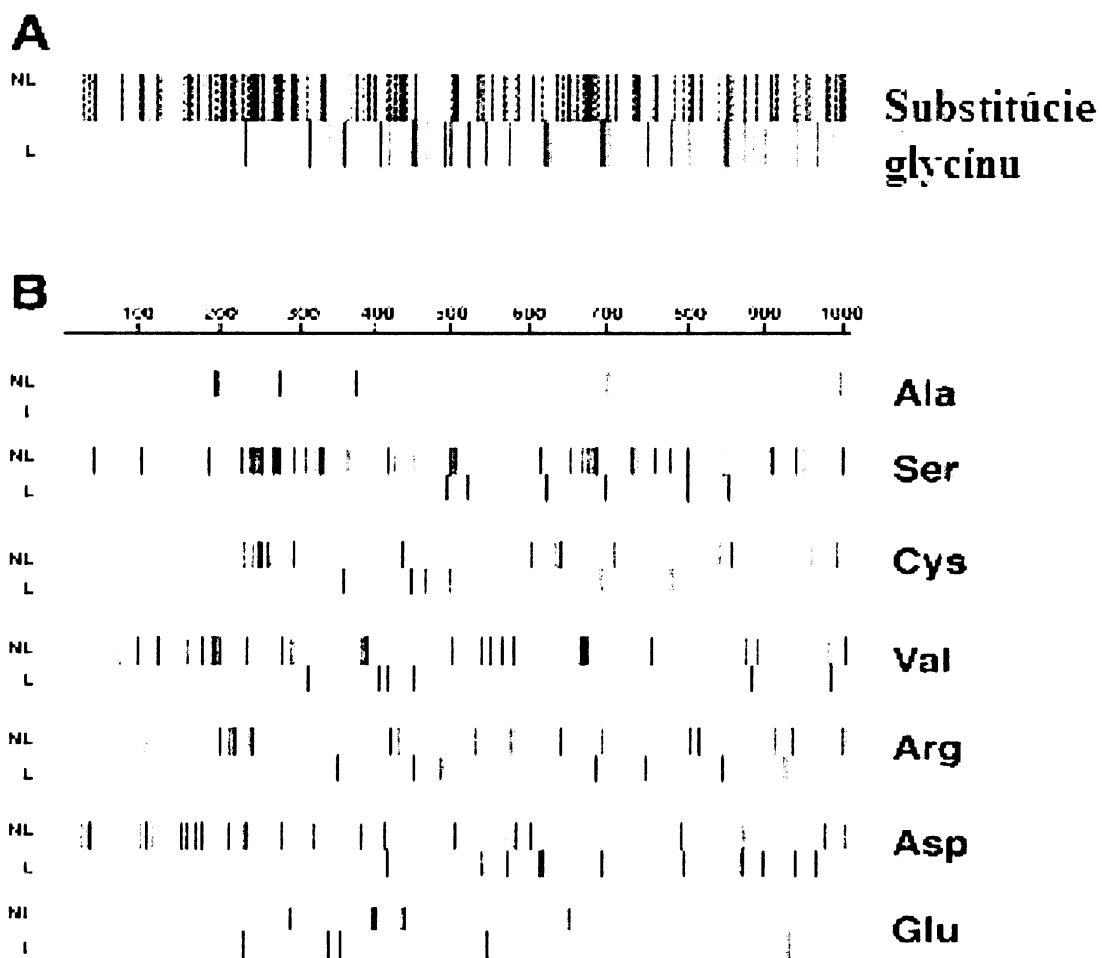
Obr.6. Funkčné domény pro α 2 reťazca kolagénu typu I (Pollitt, 2006).

Tab.3. Exonová štruktúra triple-helikálneho regiónu kolagénu typu I (Dalglish, 1997).

Číslo exonu	Veľkosť (bp)	Kódované aminokyseliny	cDNA čísla bázi
6	72 ^a	1-33	410-418
7	45	4-18	419-463
8	54	19-36	464-517
9	54	37-54	518-571
10	54	55-71	572-625
11	54	73-90	626-679
12	54	91-108	680-733
13	45	109-123	734-778
14	54	124-141	779-832
15	45	142-156	833-877
16	54	157-174	878-931
17	99	175-207	932-1030
18	45	208-222	1031-1075
19	99	223-255	1076-1174
20	54	256-273	1175-1228
21	108	274-309	1229-1336
22	54	310-327	1337-1390
23	99	328-360	1391-1489
24	54	361-378	1490-1543
25	99	379-411	1544-1642
26	54	412-429	1643-1696
27	54	430-447	1697-1750
28	54	448-465	1751-1804
29	54	466-483	1805-1858
30	45	484-498	1859-1903
31	99	499-532	1904-2002
32	108	533-567	2003-2110
33	54	568-585	2111-2164
34	54	586-603	2165-2218
35	54	604-621	2219-2272
36	54	622-639	2273-2326
37	108	640-675	2327-2434
38	54	676-693	2435-2488
39	54	694-711	2489-2542
40	162	712-765	2543-2704
41	108	766-801	2705-2812
42	108	802-837	2813-2920
43	54	838-855	2921-2974
44	108	856-891	2975-3082
45	54	892-909	3083-3136
46	108	910-945	3137-3244
47	54	946-963	3245-3298
48	108	964-999	3299-3406
49	283 ^b	1000-1014 ^b	3407-3451

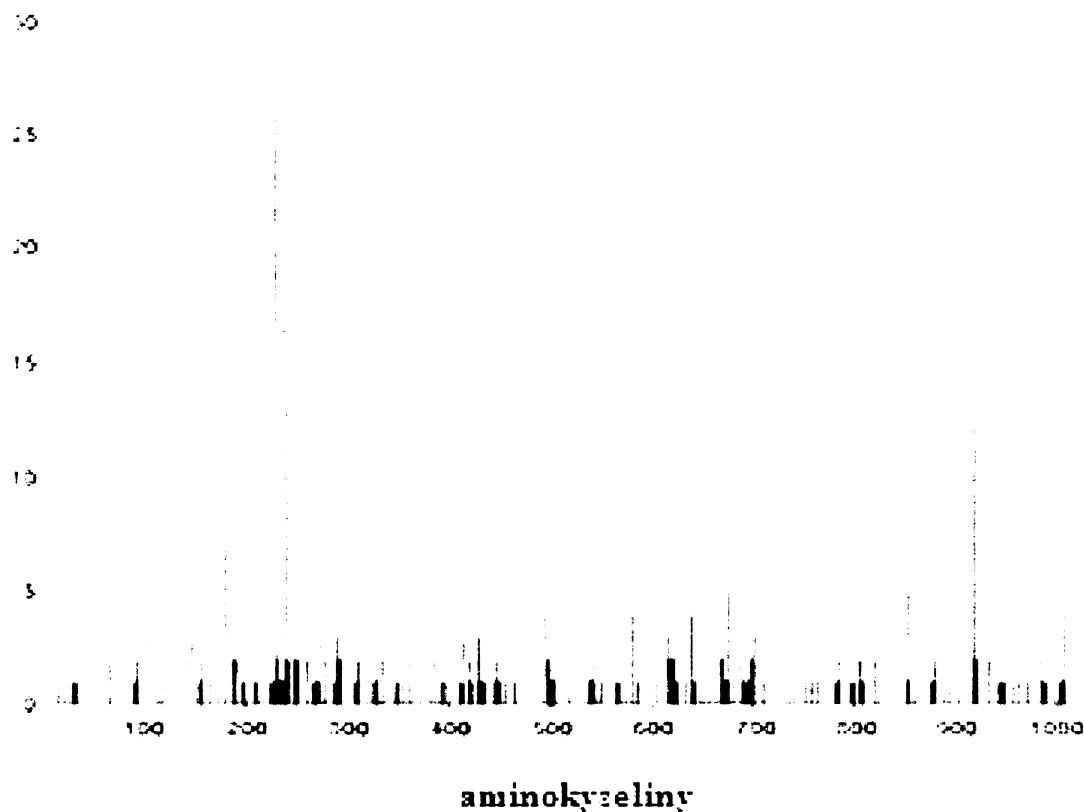
^aExon 6 kóduje časť N-propeptidu, celý N-telopeptid a prvé tri aminokyseliny triple-helikálneho regiónu. cDNA čísla bázi sú len pre aminokyseliny triple-helikálneho regiónu.

^bExon 49 kóduje posledných 15 aminokyselín triple-helikálneho regiónu, celý C-telopeptid a časť C-propeptidu. cDNA čísla bázi sú len pre aminokyseliny triple-helikálneho regiónu.

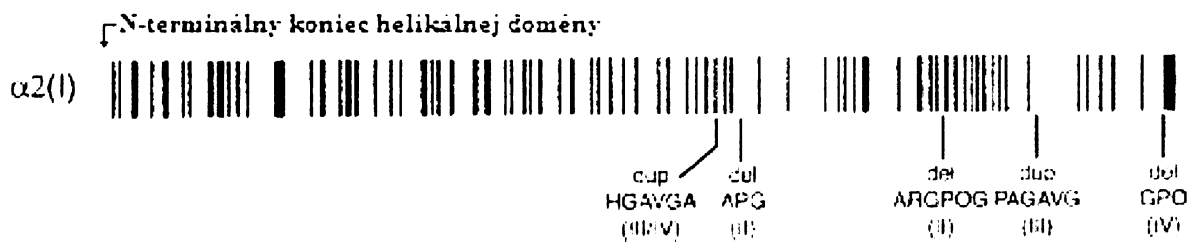


Obr.7. Distribúcia mutácií pozdĺž $\alpha 2(I)$ kolagénového reťazca. A: Glycínové substitúcie spôsobujúce jednonukleotidové zámény. B: Glycínové mutácie ukázané pre každú substituujúcu aminokyselinu. Vrchná čiara ukazuje použitú stupnicu založenú na poradí aminokyselín v triple-helikálnej oblasti. Vertikálne čiary označujú mutácie. Každá horizontálna čiara reprezentuje $\alpha 2(I)$ reťazec. NL - neletálne, L – letálne (Marini, 2007).

opakovania



Obr.8. Opakovania mutácií na tom istom glycinovom zvyšku v $\alpha 2(I)$ kolagénovom reťazci (Marini, 2007).



Obr.9. Distribúcia defektov vo vzťahu k oblastiam bohatým na iminokyseliny v triple-helikálnom regióne $\alpha 2(I)$. Aminokyselínové triplet (Gly-Xaa-Yaa) sú vyjadrené vertikálnymi čiarami pozdĺž helixu v N- do C-terminálnom smere. Čierne čiary reprezentujú triplety vo forme Gly-Xaa-Hyp a biele čiary zodpovedajú všetkým ostatným tripletovým kombináciám (Pace, 2001).

Tab.4. Najčastejšie substitúcie aminokyselín v COL1A2 reťazci.

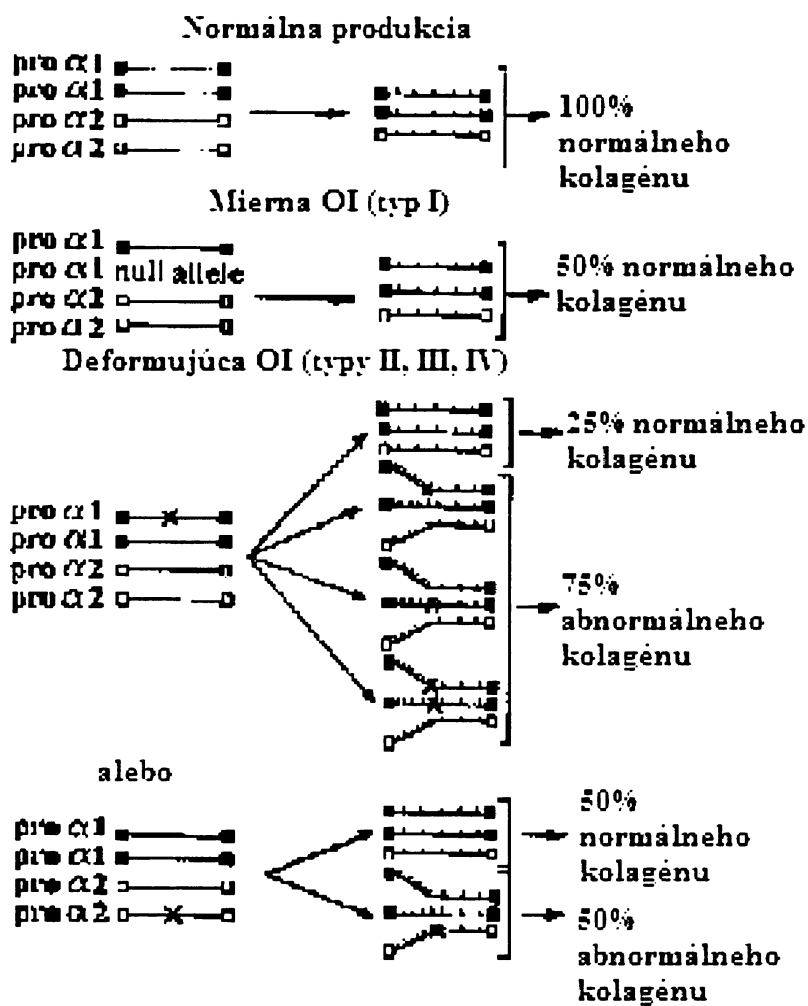
Nukleotidová zmena	Aminokyselinová zámena	Typ OI	Zdroj
GGT→GAT nt771	Gly121Asp	I	Zhuang et al. Hum Mutat 7:89-99 1996
650G>T	G127V	IV	Ward et al. Human Mutation 414 2001
821G>A	G184D	IV	Ward et al. Human Mutation 414 2001
857G>C	G196A	IV	Ward et al. Human Mutation 414 2001
c.604G>C	p.G202R	IV	Pollitt et al. Human Mutation 901 2006
892G>C	G208R	IV	Ward et al. Human Mutation 414 2001
GGT→AGT nt1121	Gly238Ser	III	Rose et al. Hum Genet 95:215-218 1995
GGT→TGT nt1148	Gly247Cys	III	Marini et al. V International Conference on OI 126 1993
GGT→AGT nt1148	Gly247Ser	I	Zhuang et al. Hum Mutat 7:89-99 1996
c.739G>C	p.G247R	I/IV	Pollitt et al. Human Mutation 901 2006
1009 1010GG>CC	G247P	III	Ward et al. Human Mutation 414 2001
c.758G>A	p.G253D	II/III	Pollitt et al. Human Mutation 901 2006
c.767G>T	p.G256V	IV	Pollitt et al. Human Mutation 901 2006
GGT→TGT nt1184	Gly259Cys	III/IV	Wenstrup et al. J of Biol Chem 266:2590-2594 1991
1090G>A	G274S	IV	Ward et al. Human Mutation 414 2001
1171G>T	G301C	IV	Ward et al. Human Mutation 414 2001
c.955G>A	p.G319R	I	Pollitt et al. Human Mutation 901 2006
c.947G>A	p.Gly325Glu	IV	Lee et al. Human Mutation 894 2006
c.982G>A	p.Gly328Ser	I,III,IV	Lee et al. Human Mutation 894 2006
GGA→GAA nt1437	Gly343Glu	II	Rose et al. Hum Mol Gen 2:2175-2177 1993
c.1072G>A	p.Gly358Ser	III	Lee et al. Human Mutation 894 2006
GGC→AGC nt1517	Gly370Ser	III	Zhuang et al. Hum Mutat 7:89-99 1996
GGT→GAT nt1671	Gly421Asp	II	Forlino et al. Matrix Biology 17:575-584 1998
1577G>A	G436E	III	Ward et al. Human Mutation 414 2001
1595G>A	G442E	IV	Ward et al. Human Mutation 414 2001
GGT→CGT nt1778	Gly457Arg	II	Bateman et al. Hum Mutat 1:55-62 1992
GGT→TGT nt1823	Gly472Cys	II	Edwards et al. Hum Mutat 1:47-54 1992
1711G>A	G481R	IV	Ward et al. Human Mutation 414 2001
GGT→CGT nt1895	Gly496Arg	II	Bateman et al. IV International Conference on OI 2 1990
GGT→AGT nt1913	Gly502Ser	II	Rose et al. Hum Genet 94:497-503 1994
1801G>A	G511S	IV	Ward et al. Human Mutation 414 2001
1882G>C	G538R	IV	Ward et al. Human Mutation 414 2001
GGT→GTT nt2040	Gly544Val	IV	Sztrolovics et al. Hum Mol Genet 2:1319-1321 1993
GGT→GAT nt2049	Gly547Asp	II	Bonadio et al. Collagen&Related Research 8:506-507(abstract) 1988
1991G>A	G574D	III	Ward et al. Human Mutation 414 2001
GGC→GAC nt2148	Gly580Asp	II	Niyibizi et al. J Biol Chem 267:23108-112 1992
GGT→GTT nt2166	Gly586Val	IV III	Bateman et al. Biochem J 276:765-770 1991 Forlino et al. Hum Mol Genet 3:2201-2206 1994
2026G>C	G586R	I	Ward et al. Human Mutation 414 2001
GGC→GAC nt2283	Gly625Asp	II	Byers et al. V International Conference on OI 1993
GGT→TGT nt2327	Gly640Cys	II/III	Gomez-Lira et al. J Med Genet 31:965-968 1994
GGT→TGT nt2345	Gly646Cys	I	Wenstrup et al. J Biol Chem 266:2590-2594 1991
GGT→GTT nt2436	Gly676Val	IV	Wang et al. J Biol Chem 268:25162-25167 1993

c.2027G>A	p.Gly676Asp	III	Lee et al. Human Mutation 894 2006
GGT→AGT nt2471	Gly688Ser	III/IV	Raghunath et al. Eur J Pediatr 154:123-129 1995
GGT→CGT nt2489	Gly694Arg	II	Tsuneyoshi et al. J Biol Chem 266:15608-15613 1991
GGT→GAT nt2508	Gly700Asp	II	Cohen-Solal et al. J Biol Chem 269:14751-14758 1994
GGT→AGT nt2525	Gly706Ser	II	Wang et al. J Biol Chem 268:25162-67 1993
c.2197G>T	p.G733C	I	Pollitt et al. Human Mutation 901 2006
GGT→AGT nt2642	Gly745Ser	I(?)	Zhuang et al. Hum Mutat 7:89-99 1996
GGC→TGC nt2768	Gly787Cys	II	Fertala et al. Biochem J 289:195-199 1993
GGT→GAT nt2814	Gly802Asp	III/IV	Lund et al. Eur J Hum Genet 4:39-45 1996
GGT→GAT nt2823	Gly805Asp	II	Grange et al. Nucl Acids Res 18:4227-4236 1990
c.2458G>A	p.Gly820Ser	III	Lee et al. Human Mutation 894 2006
c.2566G>A	p.Gly856Arg	III	Lee et al. Human Mutation 894 2006
GGT→AGT nt2984	Gly859Ser	III	Rose et al. Hum Mutat 3:391-394 1994
GGT→AGT nt3002	Gly865Ser	II	Lamande et al. J Biol Chem 264:15809-15812 1989
GGT→GAT nt3129	Gly907Asp	II	Baldwin et al. J Biol Chem 264:3002-3006 1989
GGT→AGT nt3173	Gly922Ser	IV	Marini et al. J Biol Chem 268:2667-73 1993 Sztrolovics et al. Hum Mol Genet 2:1319-21 1993 D'Amato et al. V International Conference on OI 63 1993
GGT→GAT nt3336	Gly976Asp	II	Byers et al. Trends Genet 6:293-300 1990
c.2945G>A	p.G982D	II	Pollitt et al. Human Mutation 901 2006
c.3008G>A	p.G1003D	II	Pollitt et al. Human Mutation 901 2006
GGC→GCC nt3426	Gly1006Ala	III	Lu et al. Hum Mutat 5:175-178 1995
GGT→CGT nt3443	Gly1012Arg	IV	Wenstrup et al. J Biol Chem 263:7734-7740 1988
c.3034G>A	p.Gly1012Ser	III	Lee et al. Human Mutation 894 2006
ACC→CCC nt3582	Thr1058Pro C-propeptid	III	Oliver et al. Hum Mutat 7:318-326 1996
c.3260G>A	p.G1087D	III	Pollitt et al. Human Mutation 901 2006
c.3584G>A	p.C1195Y	I	Pollitt et al. Human Mutation 901 2006

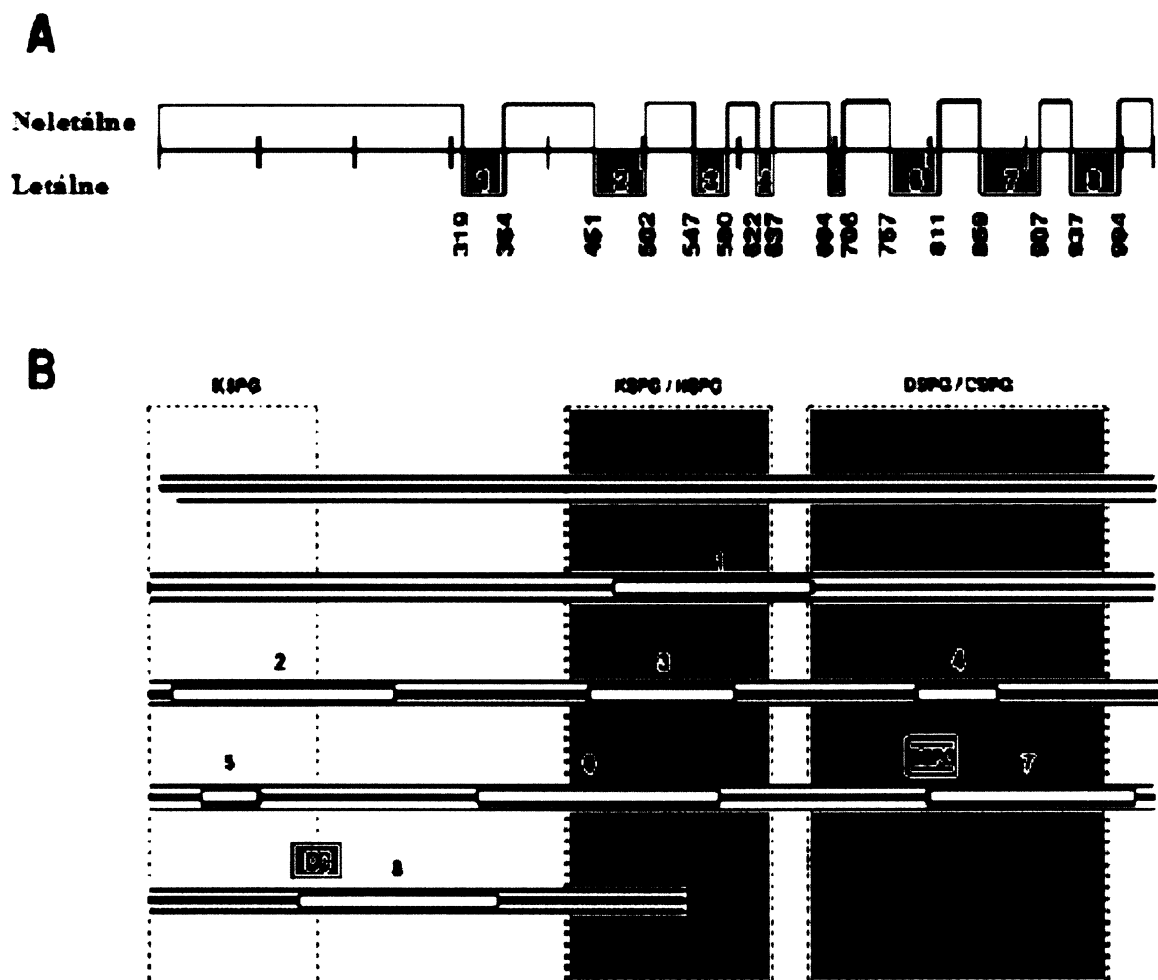
Tab.5. Najčastejšie mutácie vynechania exonu v COL1A2 géne.

Nukleotidová zmena	Vynechaný exon	Typ OI	Zdroj
Delécia 11bp v introne 9, +3→+13	9	OI typ ?	Nicholls et al. Hum Genet 88:627-633 1992
Delécia 19bp na rozhraní intron 10/exon 11	11	Atypická OI	Kuivaniemi et al. J Biol Chem 263:11407-11413 1988
T ⁺² →G intron 12	12	IV	Chipman et al. J Bone Mineral Res 7:793-805 1992
IVS12-3T>A	12	I	Ward et al. Human Mutation 414 2001
Delécia 19bp v introne 13, +4→+22	13	I	Zhuang et al. Hum Genetics 91:210-216 1993
G ⁺¹ →A intron 16	16	IV	Fille et al. Hum Mutation 2:380-388 1993
T ⁺² →C intron 16	16	III/IV	Zolezzi et al. Hum Mutat 6:268-271 1995
IVS+1G>T	16	IV	Ward et al. Human Mutation 414 2001
c.1035+1 +2delGT	IVS19	III	Lee et al. Human Mutation 894 2006
G ⁻¹ →C intron 19	20	I	Mottes et al. Hum Genet 93:681-687 1994
g.17390 17787del398	20	II	Pollitt et al. Human Mutation 901 2006
Delécia 39bp v introne 21, +2→+40	21	I	Superti-Furga et al. Connect Tissue Res 29:31-40 1993
G ⁺⁵ →A intron 21	21	I(?) alebo	Nicholls et al. Hum Mutat 7:219-227

		DI(?)	1996
A ⁻² →G intron 27	28	II	Tromp a Prockop, Proc Natl Acad Sci USA 85:5254-5258 1988
G ⁺⁵ →A intron 33	33	II	Ganguly et al. J Biol Chem 266:12035-12040 1991
c.2133+6T>A	IVS35	IV	Lee et al. Human Mutation 894 2006
c.2565+1G>A	IVS40	IV	Lee et al. Human Mutation 894 2006
IVS40+5G>A	40	II	Ward et al. Human Mutation 414 2001



Obr.10. Molekulárny mechanizmus OI. Znak X označuje mutáciu v prokolagénovom reťazci, malé vertikálne čiary označujú posttranslačné modifikácie, vzrastajúce od amino-konca k bodovej mutácii (Gajko-Galicka, 2002).



Obr.11. A: Regionálny model distribúcie mutácií pozdĺž $\alpha 2(I)$ reťazca. Letálne mutácie sú lokalizované v ôsmich skupinách. Aminokyseliny na rozhraní každej domény sú označené. Na stupnici udáva každých 100 aminokyselín pozdĺž helixu. B: Lokalizácia mutácií letálnych skupín (biele boxy) na kolagénovom vlákne. Bodkované boxy ukazujú väzbové regióny na vlákne kolagénu typu I pre keratin sulfát (KSPG), keratan sulfát a heparan sulfát (KSPG/HSPG) a dermatan sulfát a chondroitin sulfát proteoglykany (DSPG/CSPG). Väzbové miesto pre decorin jadrový proteín (DC) a DSPG sú tiež ukázané ako fialové boxy prekrývajúce sa s letálnymi skupinami číslo 8 a 7 (Marini, 2007).