

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Analýza mutací v oblastech MLBR (Major Ligand Binding Regions) genu COL1A1 u českých osob s diagnózou Osteogenesis imperfecta, typ I-IV

Diplomová práce

2010

Lucie Šormová

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
Katedra antropologie a genetiky člověka

Analýza mutací v oblastech MLBR (Major Ligand Binding Regions) genu COL1A1 u českých osob s diagnózou Osteogenesis imperfecta, typ I–IV.

Diplomová práce

Lucie Šormová

Vedoucí práce:

Doc. RNDr. Ivan Mazura, CSc.

Praha 2010

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně  
s použitím uvedené literatury a pramenů.

V Praze dne .....

.....

Lucie Šormová

## Poděkování

Ráda bych poděkovala všem, kteří se podíleli na vzniku této diplomové práce. Především děkuji panu Doc.RNDr. Ivanu Mazurovi, CSc. za cenné podněty k této práci, poskytnutí podkladů a za ochotu při konzultacích mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat panu docentu MUDr. Ivu Maříkovi, CSc. a paní MUDr. Olze Hudákové, PhD. za poskytnutí analyzovaného biologického materiálu a za umožnění kompletovat klinická data studovaných pacientů. Dále děkuji pracovníkům Ústavu soudního lékařství – Laboratoř forenzní genetiky a sérologie, v Brně za možnost přístupu k laboratorním přístrojům, které byly pro analýzy v této diplomové práci použity.

Ráda bych také poděkovala své rodině za podporu po celé období mého studia.

## ABSTRAKT

Osteogenesis imperfecta je dědičné onemocnění člověka způsobené především mutacemi genů kolagenu typ I, COL1A1 a COL1A2. Tyto mutace svým klinickým dopadem postihují zejména pohybový aparát. Onemocnění je charakteristické křehkými kostmi, deformacemi a vyšší četností zlomenin. Jedná se o poruchu vyskytující se ve všech populacích bez ohledu na věk, pohlaví, národnost či etnickou skupinu. Incidence této choroby je 1 : 16–20 000 narozených dětí. V současné době je popisováno devět klinicky odlišných forem Osteogenesis imperfecta, přičemž pouze první čtyři typy, OI typ I–IV, mají svou genetickou podstatu v mutacích genů kolagenu typ I. V rámci těchto devíti typů OI rozlišujeme lehké a závažné formy onemocnění. Za letální formy označujeme typy II a III, neboť u těchto forem dochází k úmrtí již během prenatálního vývoje či prvních dnů života postiženého jedince. Mezi charakteristické znaky kolagenních forem OI řadíme zvýšenou incidenci fraktur, deformace kostí, modré bělmo, nedoslýchavost, poruchu tvorby dentinu či podprůměrný vzrůst (Marini, 2010).

Diplomová práce je zaměřena na popis klinických forem, zkoumání molekulární podstaty vzniku onemocnění a zjištění vztahu mezi typem a pozicí mutace a výsledným klinickým dopadem na postižené jedince.

V rámci této práce byla provedena genetická analýza exonů 31–40, včetně přilehlých nekódujících oblastí, (tzv. **MLBR** = **M**ajor **L**igand **B**inding **R**egions) genu COL1A1 u 25 českých pacientů s diagnózou OI, typ I–IV. Zkoumaná oblast tohoto genu kóduje úsek molekuly kolagenu typ I, k němuž se během posttranslačních úprav váží další komponenty mezibuněčné hmoty, jako jsou např. integriny, COMP, fibronektin a další. Výsledkem těchto posttranslačních modifikací je zvýšení pružnosti a pevnosti kostí.

Molekulární analýzy odhalily mutace a polymorfismy v genu COL1A1 u sedmi z pětadvaceti zkoumaných jedinců. Tyto změny se nalézají v kódujících i v nekódujících oblastech genu. Ve všech případech genetických změn exonů se jedná o jednobodové mutace mající za následek buď záměnu aminokyselin, tvorbu STOP kodónu, nebo tyto mutace nemění smysl čtení během translace.

Klíčová slova: Osteogenesis imperfecta, COL1A1, kolagen typ I, kolagenopatie, mutace, česká populace

## ABSTRACT

Osteogenesis imperfecta is an inherited disorder caused mainly by collagen type I gene mutations, COL1A1 and COL1A2. These mutations affect especially connective tissue. Disease is characterized by fragile bones, deformations and increased frequency of fractures. It's worldwide extensive disorder regardless of age, sex, nationality or races. The incidence is 1: 16–20 000 births. Currently, we described nine clinically distinct forms of Osteogenesis imperfecta. Only the first four types OI, type I–IV, are caused by collagen type I genes mutations . In these nine types there are distinguished mild and severe forms. Type II and III are lethal forms, death occur often during prenatal period or in the first days of the life affected individuals. Characteristic clinical features of collagen forms OI are an increased incidence of fractures, deformations of bones, blue sclera, hearing loss, Dentinogenesis imperfecta small, or subnormal growth (Marini, 2010).

This study alignment is mainly the description of the clinical forms, exploring the molecular basis of disease and determine the relationship between the type and position of the mutation and the resulting phenotype of affected individuals.

We have analysed exons 31–40, including associated non-coding regions, of the COL1A1 gene (so-called **MLBR = Major Ligand Binding Regions**) in 25 Czech patients diagnosed with OI, type I-IV. This sequence is coding a „multi ligand binding region“ binding other extracellular matrix components, such as integrins, COMP, fibronectin and others. This modifications result in increased bone flexibility and strength.

We have observed COL1A1 gene mutations and single nucleotide polymorphisms in seven from twenty-five studied individuals. These changes are found both in exons and introns in the gene. In all cases, genetic changes in exons are a single point mutations resulting in either amino acid substitution, STOP codon production or the mutations don't alter the open reading frame during the translation.

Keywords: Osteogenesis imperfecta, COL1A1, collagen type I, collagenopathies, mutations, the Czech population

# Obsah

1. Úvod .....	8
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED .....	10
2.1 KLINICKÁ CHARAKTERISTIKA OSTEOGENESIS IMPERFECTA (OI) .....	10
2.1.1 Jednotlivé typy Osteogenesis imperfecta .....	10
2.1.1.1 <i>Osteogenesis imperfecta typ I</i> .....	10
2.1.1.2 <i>Osteogenesis imperfecta typ II</i> .....	12
2.1.1.3 <i>Osteogenesis imperfecta typ III</i> .....	13
2.1.1.4 <i>Osteogenesis imperfecta typ IV</i> .....	14
2.1.1.5 <i>Osteogenesis imperfecta typ V</i> .....	15
2.1.1.6 <i>Osteogenesis imperfecta typ VI</i> .....	16
2.1.1.7 <i>Osteogenesis imperfecta typ VII</i> .....	16
2.1.1.8 <i>Osteogenesis imperfecta typ VIII</i> .....	16
2.1.1.9 <i>Osteogenesis imperfecta typ IX</i> .....	16
2.2 GENETICKÁ PODSTATA OI .....	16
2.2.1 Diversita mutací v COL1A1 .....	17
2.2.2 Molekulární podstata lehké formy OI – typ I .....	19
2.2.3 Molekulární podstata vážných forem OI (typ II, III, IV) .....	19
2.2.4 Molekulární podstata forem OI typu V, VI, VII, VIII a IX .....	20
2.3 STRUKTURA GENU A PROTEINU COL1A1 .....	21
2.3.1 Primární struktura genu COL1A1 .....	22
2.3.2 Primární struktura proteinu COL1A1 .....	23
2.3.3 Formování alpha 1 řetězců .....	24
2.3.4 Trojrozměrná struktura proteinu COL1A1 .....	26
2.3.5 Major Ligand Bindig Regions (MLBR) proteinu COL1A1 .....	27
2.4 KVALITA MOLEKULY KOLAGENU .....	28
2.4.1 Klíčové oblasti ovlivňující expresi genu COL1A1 .....	28
2.4.1.1 <i>Oblast promotoru genu COL1A1</i> .....	28
2.4.1.2 <i>Mutace CpG dinukleotidů</i> .....	29
2.4.1.3 <i>Mutace kodonů glycinu</i> .....	30
2.4.1.4 <i>Mutace v oblastech stříhových míst pre-mRNA</i> .....	30
2.5 SOUČASNÉ POZNATKY O KORELACI GENOTYP-FENOTYP U OSOB S DIAGNÓZOU OI .....	31
2.6 DALŠÍ ONEMOCNĚNÍ SPOJENÁ S MUTACEMI COL1A1 .....	33
2.6.1 EHLERS-DANLOS syndrom .....	33

2.6.2 CAFFEY syndrom .....	34
2.6.3 DERMATOFIBROSARCOMA PROTUBERANS (DFSP) .....	34
2.6.4 DENTINOGENESIS IMPERFECTA (DI) .....	34
3. CÍLE PRÁCE .....	35
4. MATERIÁL .....	36
5. MOLEKULÁRNĚ GENETICKÉ METODY .....	36
5.1 Izolace DNA .....	36
5.2 Gelová elektroforéza – kontrola izolátu a amplifikátu .....	37
5.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....	38
5.4 Automatické sekvencování s kapilární elektroforézou .....	43
5.5 Odečet sekvenogramů .....	46
6. VÝSLEDKY .....	47
6.1 Fenotypy vybraných českých OI pacientů s nalezenými mutacemi .....	52
6.2 Výsledky molekulárně-genetických analýz systémů G1–G6 COL1A1 genu .....	60
7. DISKUZE .....	66
8. ZÁVĚR .....	71
9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	73
10. SEZNAM LITERATURY .....	77
11. INTERNETOVÉ ZDROJE .....	87
PŘÍLOHY .....	89
Příloha 1 Použité chemikálie a roztoky .....	90
Příloha 2 Publikace článku .....	91



# 1. ÚVOD

Kolageny jsou nejhojněji zastoupeným proteinem v lidském těle. Představují 25 % z celkového množství proteinů a jsou hlavní komponentou extracelulární matrix, hmoty produkované buňkami pojivové tkáně do svého okolí. Mezi základní funkce této hmoty patří podpurná funkce pro buňky, funkce regulační (např. dělení buněk, pohyb buněk apod.), růst a obnova tkání, určení a udržování tvaru tkání, architektura tkání a orgánů, funkce komunikační – výměna metabolitů, iontů a vody, a další. V současné době je popsáno 29 typů kolagenu kódovaných 44 geny, přičemž typy I, II a III jsou hlavní složkou pojivové tkáně, tedy kostí, chrupavek, šlach, vaziva a kůže, ale také cévních stěn, bazálních membrán, rohovek či jiných orgánů těla. Tyto tři zmíněné typy představují 90 % všech kolagenů lidského těla. Ostatní typy kolagenu jsou v pojivové tkáni zastoupeny v menší míře (Brett, 2008; Schegg, 2009). Vyskytují se zejména v chrupavkách, kůži, rohovce, bazálních membránách či v cévních, plicních a střečních stěnách.

Osteogenesis imperfecta (OI), typ I–IV, je dědičné onemocnění, vznikající v důsledku mutací a polymorfismů v genech kolagenu typ I (COL1A1 a COL1A2). Jedná se o onemocnění pohybového aparátu člověka charakterizované poklesem kostní density. Mutace genů kolagenu typ I mají za následek snížení pružnosti kostí a density kostní hmoty a zvýšení lomivosti a výskytu kostních deformit. Léčba OI je komplexní a je řešena nejen specialisty mnoha klinických oborů, jakými jsou např. osteologie, ortopedie, pediatrie, genetika, fyzioterapie, neurochirurgie a radiologie, ale také specialisty z oborů protetiky, psychologie či sociologie. Cílem této komplexní péče je zlepšení kvality života pacientů postižených tímto onemocněním (Wildmann et al., 1999). V současné době neexistuje léčba, která by účinně ovlivňovala tvorbu kolagenových molekul. Pacientům je poskytována péče, která omezí počet zlomenin a zvýší funkčnost pojivové tkáně (podáváním kalcia, vitaminu D nebo preparátů s obsahem kolagenu apod. (Vyskočil, 2009)). V posledních letech se stále častěji využívá terapie s podáváním bisfosfonátů. Užívání bisfosfonátů snižuje resorpci kostní tkáně a riziko zlomenin a zvyšuje minerální densitu kostní tkáně a pevnost svalů. Z bisfosfonátů jsou nejběžněji užívány pamidronát (*Aredia*), alendronát (*Fosamax*) a v poslední době probíhají studie residronátu (*Actinel*). Zavedení této léčby je ovlivňováno závažností onemocnění, jeho průběhem a počtem zlomenin (Plotkin et al., 2000; Vyskočil et al., 2005).

Diagnostika OI byla ještě donedávna vázána pouze na biochemické testy markerů kostního metabolismu (např. kostní ALP = alkalická fosfatáza, osteokalcin, DPD = deoxypyridinolin, osteoklastická kyselá fosfatáza). V současnosti, v rámci rozvoje molekulárně-genetických metod, je postupně identifikována molekulárně genetická podstata

změn v genech COL1A1 a COL1A2 u pacientů s podezřením OI. Jedná se nejen o analýzu vzorků krve klinicky sledovaných pacientů, ale i v dnešní době stále více se nabízející možnost analýzy molekul DNA či RNA izolovaných z tkání získaných při chirurgické léčbě.

Genetické analýzy genů kolagenu typ I jsou důležité pro včasnou identifikaci tohoto onemocnění, neboť rychlé rozpoznání příčin OI může ve svém důsledku napomoci efektivní a individualizované léčbě pacienta. Z tohoto důvodu by měl být kladen větší důraz na prenatální i včasné postnatální genetické testování vybraných jedinců. Prenatální molekulárně-genetické analýzy by měly být zaměřeny především na manželské páry, v jejichž rodinách byla v minulosti diagnostikována OI, a dále na páry, u nichž došlo k více než jednomu spontánnímu potratu, aniž by jeden z rodičů či ostatních rodinných příslušníků měl klinické příznaky OI. Molekulárně-genetické analýzy genů kolagenu typ I jsou zároveň důležité pro odhalení co možná největšího počtu mutací vedoucích v OI a pro podrobný popis jejich fenotypového projevu, aby mohla být precizně popsána závislost mezi genetickou příčinou OI a jejím fenotypovým obrazem.

## 2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1 KLINICKÁ CHARAKTERISTIKA OSTEOGENESIS IMPERFECTA (OI)

Osteogenesis imperfecta je dědičně vázaná choroba postihující tvorbu kolagenu typ I, hlavního proteinu pojivové tkáně. Doposud bylo identifikováno široké spektrum klinických znaků popisujících toto onemocnění, které se liší nejen mezi jednotlivými typy, ale zároveň také uvnitř těchto typů onemocnění. Pacienti se stejným typem OI mohou mít odlišnou klinickou manifestaci choroby, a to dokonce i v rámci jedné rodiny. Mezi klinické znaky, charakterizující toto onemocnění, řadíme namodralé či šedé skléry, trojúhelníkový tvar obličeje, Dentinogenesis imperfecta (DI), podprůměrný vzrůst postižených jedinců, snížená kostní densita, zvýšená četnost zlomenin (k prvním zlomeninám může docházet již během prenatálního vývoje), deformace kostí a další (Roughley, 2003; [http://www.niams.nih.gov/Health\\_Info/Bone/Osteogenesis\\_Imp perfecta/default.asp](http://www.niams.nih.gov/Health_Info/Bone/Osteogenesis_Imp perfecta/default.asp)).

První klasifikace Osteogenesis imperfecta, založená právě na základě klinických příznaků onemocnění, byla zveřejněna roku 1979. D. Sillence definoval čtyři typy tohoto onemocnění a označil je jako OI I–IV. Mezi znaky, které u pacientů sledoval, patří například: věk pacienta, věk rodičů pacienta, porodní váha a délka pacienta, současná váha a výška pacienta, obvod hlavy pacienta, počet zlomenin v určité věkové periodě, celkový počet zlomenin, přítomnost deformit při narození, přítomnost DI či barva bělma (Sillence, 1979). Později, využitím nových technik, odhalujících molekulární podstatu onemocnění, jako například histomorfometrie kostí či molekulárně genetická charakterizace, byly v rámci skupiny OI typu IV popsány nové formy Osteogenesis imperfecta. Tyto formy OI, definované jako typy V–VIII, nemají genetickou podstatu ve změnách genů kolagenu typ I. Poslední typ onemocnění, typ IX, byl objeven zcela nedávno a stejně jako předchozí typy (V–VIII) ani tato forma OI nevzniká v důsledku poruchy genů utvářejících kolagen typ I. Původní klasifikace byla proto o tyto další typy (typy V–IX) rozšířena na dnešních devět skupin Osteogenesis imperfecta (Marini, 2010). V podrobnějším členění této choroby můžeme dále dělit některé typy OI na lehké či vážné formy poruchy.

#### 2.1.1 Jednotlivé typy Osteogenesis imperfecta

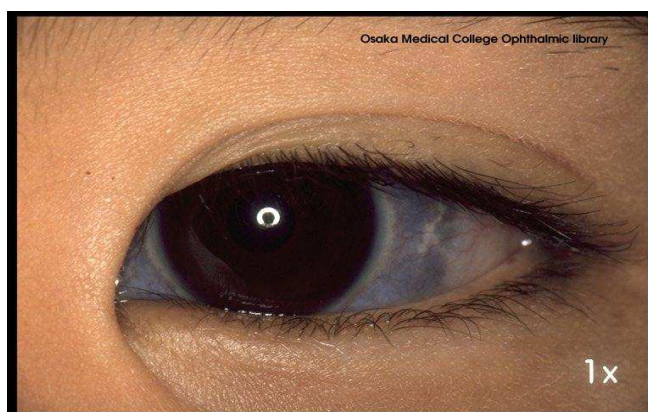
##### 2.1.1.1 *Osteogenesis imperfecta typ I*

OI typ I je považována za nejběžnější a nejlehčí formu tohoto onemocnění. Pacienti se vyznačují normálním, nebo mírně podprůměrným vzrůstem. První zlomeniny se objevují již po narození dítěte a během prvních let života, kdy se dítě učí pohybovat. Během puberty a

dospívání se četnost zlomenin snižuje. K opětovnému zvýšení frekvence fraktur dochází u žen v postmenopauzálním období, u mužů po šedesátém roce života. Deformace kostí není obvyklá (pacienti mohou mít mírně deformované dlouhé kosti), a to ani po zhojení zlomenin. Klouby pacientů jsou hypermobilní a svalstvo hypotrofické. Typickým znakem tohoto typu OI jsou modré či šedé skléry, přičemž intenzita zbarvení se s věkem nemění (Wollina a Koch, 2006). Pacienti mohou zároveň trpět onemocněním zvaným Dentinogenesis imperfecta, vedoucím v charakteristický obraz zubů a jejich předčasnému vypadávání. Po dvacátém roku života dochází k rozvoji nedoslýchavosti s rizikem následné ztráty sluchu (Rougley, 2003; [http://www.niams.nih.gov/Health\\_Info/Bone/Osteogenesis\\_Imperfecta/default.asp](http://www.niams.nih.gov/Health_Info/Bone/Osteogenesis_Imperfecta/default.asp)). Kůže pacientů vykazuje s rostoucím věkem nižší elasticitu, distenzibilitu a hysterezi (Hansen a Jemec, 2002).

Na základě přítomnosti Dentinogenesis imperfecta rozlišujeme IO typ IA (absence DI) a OI typ IB (přítomnost DI) (Marini, 2010). Pacienti s OI typu IB mají vážnější postižení (vyšší frekvence fraktur, podprůměrný vzrůst) než jedinci s typem IA (Paterson, 1983).

Obě výše uvedené formy OI typu I jsou autosomálně dominantní (Byers, 1992).



Obr. 1. Modré skléry pacientů s diagnózou OI typ I.

(Převzato z: <http://akimichi.homeunix.net/~emile/aki/html/medical/Image/blue-sclera-1.jpeg>)



Obr. 2. Dentinogenesis imperfecta (DI).

(Převzato z: [http://ww2.healthhaven.com/cases/www.drtabib.com---New\\_York\\_City\\_Cosmetic\\_Dentist---graphics---rotated\\_before.jpg](http://ww2.healthhaven.com/cases/www.drtabib.com---New_York_City_Cosmetic_Dentist---graphics---rotated_before.jpg))

### 2.1.1.2 Osteogenesis imperfecta typ II (~ OIC = Ol congenita)

Osteogenesis imperfecta typ II je vážnou formou OI. Tento typ je charakteristický zejména extrémně nízkou densitou kostní hmoty a deformacemi skeletu. K prvním frakturám, zejména dlouhých kostí a žeber, dochází již během intrauterinního vývoje jedince. Postižení jedinci dosahují podprůměrného vzrůstu. Lebka je v porovnání s tělem velká a měkká, končetiny jsou krátké, hrudník malý a žebra málo stabilní. Plíce jedinců postižených tímto typem onemocnění jsou nedovyvinuté, což je častou příčinou úmrtí. Histologická vyšetření kostí pacientů odhalují snížené množství kolagenu v kostech kortikálních a trabekulárních (Roughley, 2003). Pro těhotné ženy, u jejichž plodu byl diagnostikován OI typ II, je typický častý výskyt spontánních potratů. Naděje na dožití při narození postiženého dítěte je velice nízká. Úmrtí je běžné během prvních deseti dnů života – během prvního dne života umírá až 60 % kojenců, 80 % kojenců umírá během prvního týdne života (Byers, 1988).

Na základě radiologických znaků rozlišujeme tři podtypy OI typu II – OI typ IIA, IIB a IIC. Pro typ IIA jsou charakteristické zkrácené a deformované dlouhé kosti končetin, krátká, deformovaná a kontinuálně rozšířená žebra, tmavě modré skléry a makrocefalie. Typ IIB je podobný typu A, žebra jsou ovšem normální nebo nekontinuálně rozšířená. Pro pacienty s typem B jsou dále typické tyto znaky: malý obvod hlavy, mělké očníce a bílé či namodralé bělmo. Typ IIC se vyznačuje deformacemi a nízkou kostní densitou zejména žeber a dlouhých kostí končetin. Jedinci postižení formou A a C umírají během perinatálního období, OI typ IIB je více „slučitelný“ se životem – pacienti přežívají do období časného dětství (Barnes et al., 2006; Sillence et al., 1984; <http://emedicine.medscape.com/article/411919-imaging>).

Způsob dědičnosti této formy je odlišný pro jednotlivé podtypy – typy IIA a IIC jsou autosomálně dominantní (Byers, 1988), typ IIB je autosomálně recesivní. OI typ IIB je ovšem na rozdíl od typů A a C způsoben mutacemi genu CRTAP, nikoliv genů kolagenu typ I, a představuje 2–3 % OI typu II (Barnes et al., 2006).



Obr. 3. Mnohočetné zlomeniny s následnými deformacemi kostí u novorozence s diagnózou OI typ II.  
(Převzato z: <http://library.med.utah.edu/WebPath/jpeg3/PERI022.jpg>)

### 2.1.1.3 *Osteogenesis imperfecta typ III*

Tento typ je nejtěžším typem OI. Zlomeniny jsou běžné již v prenatálním období (při rentgenovém vyšetření jsou viditelné zhojené fraktury) a dále při narození dítěte (způsobeny manipulací s novorozencem). Obecně lze říci, že fraktury kostí u pacientů s tímto typem OI vykazují nejvyšší četnost v průběhu celého života. OI typ III je charakteristický deformacemi kostí a hypermobilními klouby končetin (Roughley, 2003). Metafýzy a epifýzy dlouhých kostí končetin vykazují tzv. „popcorn“ kalcifikaci. Ta je způsobena dezorganizací v oblasti růstové ploténky. Rozvoj tohoto znaku lze u více než poloviny postižených jedinců detekovat radiografickým vyšetřením mezi 4. a 14. rokem života (Obafemi et al., 2008). Pacienti často podstupují chirurgické zákroky zavádějící do kostí ocelové výztuže (Kirschnerův drát, Küntscherův hřeb), nebo jsou jim předepsány speciální ortézy či korzety. Někteří pacienti jsou z důvodu velice křehkých kostí a vážných deformit kostí upoutáni celý život na invalidní vozík. Hrudní koš bývá často soudkovitého tvaru, čímž je omezena správná funkce plic, která je častou příčinou úmrtí kojenců. Naděje na dožití při narození dítěte s OI typ III je obecně vyšší než u předchozího typu *Osteogenesis imperfecta*, typu II. U pacientů často bývá diagnostikována *Dentinogenesis imperfecta* – rozsáhlá zejména v první dentici (O’Connel a Marini, 1999). Na základě přítomnosti tohoto znaku je OI typ III (stejně jako OI typ I) členěna na IIIA (absence DI) a IIIB (přítomnost DI). Obličej je trojúhelníkový, plochý s prominujícím čelem (Marini, 2010). Zabarvení sklér je při narození modré nebo šedé, s přibývajícím věkem postupně zesvětluje. Z hlediska antropometrického hodnocení dosahují postižení nejmenšího vzrůstu v rámci všech typů OI, přičemž finální výška jedinců se může pohybovat pouze kolem jednoho metru. Nedoslychavost se objevuje již po desátém roce života. Dalším obvyklým znakem je basilární imprese (BI), která je výsledkem poklesu lebky na krční páteř. Mezi hlavní průvodní příznaky BI patří závratě, bolesti hlavy, brnění v šíji (Lehmittův znak), snížená citlivost středního předloktí, brnění čtvrtého a pátého prstu. BI může vést až k ochrnutí končetin (Sillence, 1993; Charnas a Marini, 1993; Sillence, 1994; Hayes et al., 1999). *Osteogenesis imperfecta* typ III je vysoce heterogenním typem z hlediska popisu jednotlivých pacientů, a proto nejsou výše uváděné charakteristiky tohoto typu onemocnění typické pro každého postiženého jedince individuálně.

(<http://www.genetests.org/servlet/access?db=geneclinics&site=gt&id=8888890&key=ESfTfP UK9UbL8&gry=&fcn=y&fw=uVOB&filename=/profiles/oi/index.html>)

OI typ III je děděna především autosomálně dominantně, vzácně je také pozorována dědičnost autosomálně recesivní (Byers, 1992).



Obr.4. Deformace kostí dolních končetin a Kirschnerovy dráty vložené do stehenních kostí pacienta s diagnózou OI typ III.

(Převzato z: databáze Ambulantního centra pro vady pohybového aparátu v Praze)

#### **2.1.1.4 *Osteogenesis imperfecta typ IV***

V rámci čtvrté skupiny *Osteogenesis imperfecta* se objevují jedinci postižení jak lehkou, tak vážnou formou onemocnění. Jedná se tedy o nejvíce heterogenní formu OI (Roughley, 2003). Vzárust pacientů je podprůměrný, výskyt zlomenin je nižší než u OI typu III. Pacienti s vážnou formou OI IV mívají první zlomeniny již při narození. Deformace kostí je málo běžná a mírná s výskytem u dlouhých kostí zejména dolních končetin (Byers, 1992). Obličej je trojúhelníkového tvaru, běžné je temporální rozšíření mozkovny. Stejně jako u předchozího typu, OI typ III, vykazují metafýzy a epifýzy dlouhých kostí končetin „popcorn“ kalcifikaci. Frekvence výskytu je však nižší než u OI typ III (Obafemi et al., 2008). U některých pacientů je popisována hypoplasticita maxily a mandibulární prognacie. U jedinců s OI typ IV je běžně diagnostikována lehká forma *Dentinogenesis imperfecta*, pak se jedná o OI typ IVB. OI typ IVA nevykazuje přítomnost DI (Kashyap, 2009). Skléry jsou namodralé nebo našedlé a postupem času zesvětlají. Někteří jedinci mohou trpět nedoslýchavostí až ztrátou sluchu. Hrudní koš mívá soudkový tvar (Byers, 1992). Basilární imprese je pro pacienty s tímto typem OI běžnější než u pacientů s OI typ III (<http://emedicine.medscape.com/article/411919-imaging>). Jedná se o autosomálně dominantní typ dědičnosti (Byers, 1992).



Obr. 5. Deformace kosti stehenní následkem zhojení zlomeniny u kojence s diagnózou OI typ IV.  
(Převzato z: <http://www.hawaii.edu/medicine/pediatrics/pemxray/v6c02a.jpg>)

#### 2.1.1.5 *Osteogenesis imperfecta typ V*

Pátý typ OI je charakteristický zvýšenou křehkostí kostí a mírnými deformacemi skeletu (Glorieux, 2002). Původně byl tento typ považován pro podprůměrný vzrůst postižených jedinců a charakteristiku zlomenin za typ I nebo III (Byers, 1992). Od III. a IV. typu OI jej odlišují následující charakteristiky: tvorba hypertrofického kalu na stranách zlomeniny nebo v místech chirurgických zákroků a kalcifikace mezikostní membrány kosti vřetenní a loketní, omezující rotaci předloktí (Roughley, 2003). Pacienti mají bílé skléry, netrpí nedoslýchavostí ani Dentinogenesis imperfecta (Byers, 1992). OI typ V je v rodině přenášen autosomálně dominantně (Byers, 1992).



Obr. 6. Hypertrofický kalus vytvořený na kosti loketní u pacienta s OI typ V.  
(Převzato z: <http://image.absoluteastronomy.com/images/encyclopediainages/x/xr/xrayoitypev-kid-varadhan.jpg>)



### **2.1.1.6 *Osteogenesis imperfecta typ VI***

OI typ VI se svými klinickými znaky podobá OI typu IV (Byers, 1992). Pacienti dosahují lehce podprůměrného vzrůstu, mají mírně deformované kosti a četnost zlomenin se přibližuje frekvenci fraktur pacientů postižených typem IV. Běльмо je bílé, jedinci nemají ani Dentiogenesis imperfecta ani nedochází ke ztrátě sluchu. Hlavními odlišujícími znaky od OI typ IV jsou vzhled lamel kostí, majících tvar rybích šupin, a nedostatečně pevná kostní tkáň (Roughley, 2003). Typ dědičnosti této formy onemocnění byl stanoven jako autosomálně recesivní (Alanay et al., 2010).

### **2.1.1.7 *Osteogenesis imperfecta typ VII***

Jedinci postižení tímto typem OI dosahují mírně podprůměrného vzrůstu, mají lehké deformace kostí a četné zlomeniny. Stejně jako u předchozího typu, typu VI, ani tito jedinci netrpí Dentiogenesis imperfecta a nedoslýchavostí, kolorit sklér je bílý. Hlavním znakem sedmého typu je rhizomelické zkrácení kostí stehenních a pažních. Typickým znakem je dále exoftalmus (Ward et al., 2002).

Hlavním znakem odlišujícím OI typ VII je způsob dědičnosti, neboť tato forma OI je děděna pouze autosomálně recesivně (Byers, 1992).

### **2.1.1.8 *Osteogenesis imperfecta typ VIII***

Klinické symptomy se podobají znakům OI typ II a III. Odlišné je ovšem zbarvení bělma, které je u typu VIII bílé. Dalšími znaky tohoto typu OI jsou vážná porucha růstu jedinců, nízká mineralizace skeletu a bulbózní tvar metafýz (Cabral et al., 2007).

Stejně jako předchozí typ VII, je typ VIII opět děděn autosomálně recesivně (Cabral et al., 2007).

### **2.1.1.9 *Osteogenesis imperfecta typ IX***

Osteogenesis imperfecta typ IX byla popsána teprve nedávno. Pacienti s diagnózou tohoto typu OI mohou trpět jak lehkými, tak vážnými poruchami tvorby kostní hmoty podobnými jako u OI typu III a IV. Obecně je tato forma svými klinickými znaky podobná OI typu VII a VIII, barva sklér pacientů je bílá.

OI typ IX uzavírá řadu autosomálně recesivních typů OI. (Marini, 2010)

## **2.2 GENETICKÁ PODSTATA OI**

90 % všech případů Osteogenesis imperfecta je výsledkem mutací genů kolagenu typ I (COL1A1 a COL1A2). Molekula kolagenu typ I má charakter trojšroubovice tvořené dvěma

alpha 1 řetězci kódovanými genem COL1A1 a jedním alpha 2 řetězcem, který je kódován genem COL1A2. Následkem mutací těchto genů je buď snížená produkce kolagenu typ I, nebo tvorba strukturálně poškozených molekul kolagenu typ I, které mohou mít za následek charakteristické funkční abnormality. Zbýlých 10 % OI je vyvoláno mutacemi genů CRTAP, LEPRE1, PPIB či FKBP10, nebo nebyla jejich molekulární podstata doposud popsána (OI typ V).

(Marini, 2010; Kuivaniemi, 1997; <http://ghr.nlm.nih.gov/condition=osteogenesisimperfecta>)

Mutace zapříčiňující klinický obraz OI typu I–IV dělíme do dvou základních skupin, které se od sebe odlišují svým dopadem na tvorbu molekul kolagenu typ I (Primorac, 2001):

- 1) **nulové mutace** = mutace redukující množství kolagenu typu I. Ve většině případů vede tento typ mutací ke vzniku C-terminálně zkráceného alpha řetězce, který neobsahuje C-terminální nukleární místo pro formaci triplehelixu. V jiných případech snižují stabilitu mRNA nebo mohou postihnout transkripci či tvorbu mRNA. Tyto mutace se projevují sníženou tvorbou alpha řetězců, což označujeme jako *řetězový efekt mutace* (Dagleish, 1997; Primorac, 2001; <http://www.athenadiagnostics.com/servlet/DownloadServlet?id=253>).
- 2) **dominantně negativní mutace** = mutace postihující strukturu a stabilitu oblasti helixu alpha řetězců. V přibližně 85 % případů vedou v substituci glycinu jinou aminokyselinou, což má za následek poškození formace triplehelixu. Zbýlých 15 % tvoří splice-site mutace mRNA (Marini, 2010).

## 2.2.1 Diversita mutací v COL1A1

Nejběžnějšími mutacemi v genu COL1A1 jsou *substituce* jednoho nukleotidu vedoucí k substituci glycinu, *missense mutace*, *nonsense mutace*, *delece*, *inserce* či *splice-site mutace* vedoucí v *exon skipping* (Byers a Cole, 2002).

**Missense mutace** je typ mutací, jejichž vlivem dochází ke změně čtení kodónu glycinu na kodón jiné aminokyseliny. Výsledkem je tedy substituce zbytku glycinu v oblasti helixu pro-alpha řetězce jinou aminokyselinou. Při substituci glycinu dochází ke změně čtecího rámce s následnou tvorbou strukturálně chybných molekul kolagenu typ I. Závažnost mutací vedoucích v substituci glycinu je závislá na pozici v alpha 1 řetězci a na charakteru substituované aminokyseliny. Nejčastěji se jedná o substituci argininem, cysteinem, serinem, alaninem, valinem, tryptofanem, asparaginem a glutaminem (Byers, 1991; Engel a Prokop, 1991; Kuivaniemi, 1991; Prokop, 1994; Kuivaniemi, 1997) V následující tabulce jsou uvedeny substituce glycinu v alpha 1 řetězci, které vedou v rámci jednotlivých typů OI k nejzávažnějšímu výslednému fenotypu.

<b>Změna kodónu glycinu</b>	<b>Pozice mutace (báze/kodón)</b>	<b>Nově kódovaná aminokyselina</b>	<b>Klinický obraz mutace</b>
GGA→AGA	888/79	arginin	OI typ I
GGT→TGT	589/19	cystein	
GGT→TGT	1201/223	cystein	
GGC→AGC	3541/1003	serin	OI typ II
GGG→AGG	994/154	arginin	OI typ III
GGC→TGC	2110/256	cystein	
GGC→AGC	2299/589	serin	
GGC→AGC	2596/688	serin	
GGC→AGC	3118/862	serin	
GGT→TGT	1579/349	cystein	OI typ IV
GGC→AGC	1588/352	serin	

Tab. 1. Substituce glycinu alpha 1 řetězce, vedoucí v rámci jednotlivých typů OI k nejzávažnějším fenotypům.  
(Převzato z: <http://www.le.ac.uk/ge/collagen/col1a1.html>)

Lehká forma OI, OI typ I, je vyvolána zejména *nonsense* mutacemi, ale také *frameshift* a *splice-site* mutacemi, které vedou k předčasnému ukončení kodónu = vytvoření tzv. *STOP* kodónu (UAA, UAG nebo UGA), s následnou tvorbou „null“ alel:

- 1) ***Nonsense mutace*** – jedná se o změnu jednoho nukleotidu s následnou změnou původního kodónu na výsledný STOP kodón. To má za následek tvorbu zkrácených forem alpha řetězců, a tudíž i výsledného proteinu (Redford-Badwal, 1996).
- 2) ***Frameshift mutace*** – tento typ mutací je vyvolán insercí/delečí jednoho či více nukleotidů (počtem nedělitelným třemi), jež má za následek posun čtecího rámce při transkripci pre-mRNA a následné translaci mRNA do polypeptidického řetězce (Willing, 1994). Pokud nemají tyto mutace za následek vytvoření STOP kodónu, výsledným fenotypovým projevem jsou vážné formy OI (typ II, III, a IV) (Byers, 1993).
- 3) ***Splice-site mutace*** – podstatou tohoto typu mutací jsou inserce/delece či substituce jednoho a více nukleotidů v oblasti sestřihových míst pre-mRNA. Splice-site mutace mohou vést k:
  1. zadržení intronů v sekundární mRNA
  2. vynechání části či celého exonu ve výsledné mRNA
  3. k vytvoření zcela nových stříhových míst v pre-mRNA (Nakai a Sakamoto, 1994)

Nevedou-li splice-site mutace ke vzniku STOP kodónů, jejich výsledkem je tvorba strukturálně postižených molekul kolagenu typ I typických pro vážné formy OI (typ II, III, IV) (Byers, 1993).

Málo běžnými, tudíž vzácnými, typy mutací v rámci genu COL1A1 jsou:

- Mutace způsobující přeskupení několika exonů a vedoucí v letální fenotyp OI (tzv. **multi-exon rearrangement mutace**) (Stankiewicz a Lupski 2002).
- Mutace, jejichž výsledkem je zhoršená formace triple helixu, posttranslační modifikace alpha řetězců a následně snížená extracelulární sekrece těchto alpha řetězců (**in-frame delece** a **inserce, duplikace**). Fenotypový projev závisí na charakteru mutace, tedy zda se jedná o nulové nebo dominantně negativní mutace. (Mundlos, 1996; Cole, 1994; Pace, 2001)

### 2.2.2 Molekulární podstata lehké formy OI – typ I

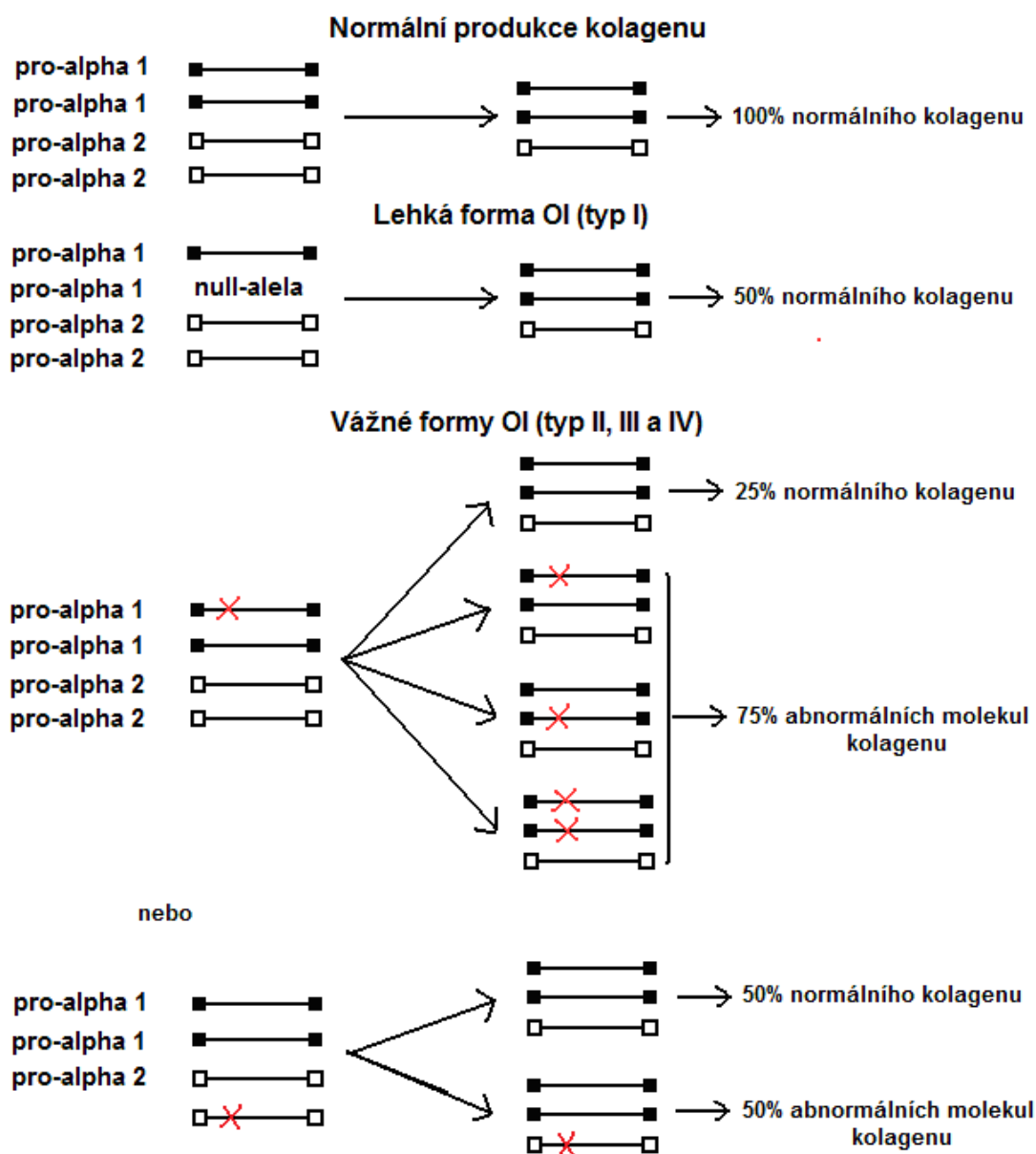
Typickým znakem pro tento typ onemocnění je tvorba tzv. „null“ alel. Je charakterizována mutacemi měnícími smysl čtení kodónu, nikoliv základní strukturu molekuly kolagenu typ I (Willing, 1994). Jedná se především o delece/inserce nukleotidů (počtem nedělitelným třemi) v exonech genů kolagenu typ I, a dále o splice-site mutace, jejichž výsledkem je přítomnost intronů v sekundární struktuře mRNA s následným přerušením tvorby kolagenu. Všechny tyto mutace mají za následek sníženou produkci mRNA přibližně na polovinu původního množství, a tudíž také pro-alpha 1 řetězců a molekul prokolagenu typ I normální struktury. Výsledné snížené množství kolagenu typ I má za následek sníženou densitu kostí, znak charakteristický pro Osteogenesis imperfecta. Zároveň však bylo prokázáno, že OI typ I mohou vyvolat také substituce aminokyselin v alpha 1 řetězcích (Willing, 1994), měnící strukturu prokolagenu typ I (Byers, 1993). Vzácnými typy mutací jsou dále strukturální přestavby v genu, vedoucí v nefunkčnost alely, mutace v oblasti promotoru a v oblasti vázající enhancery či delece jedné alely (Willing et al., 1990).

### 2.2.3 Molekulární podstata vážných forem OI (typ II, III, IV)

Klinicky vážné formy Osteogenesis imperfecta, tedy OI typy II, III a IV, jsou výsledkem mutací vedoucích ve změnu struktury molekul prokolagenu typ I. Nejčastěji (přibližně 80 %) se jedná o substituce glycinu v oblasti helixu pro-alpha řetězců (Marini, 2007). Nahrazením tohoto aminokyselinového zbytku je následně poškozena formace trojšroubovice, což je pravděpodobně hlavním důvodem posttranslačních modifikací. Výsledkem je abnormální, tedy strukturálně poškozená, molekula kolagenu (Primorac, 2001).

U vážných typů OI byly mutačními analýzami nalezeny dále delece, jež mají za následek zkrácení pro-alpha 1 řetězců, duplikace buď jednotlivých aminokyselin, nebo Gly-X-Y tripletů,

či mutace, jejichž vlivem dochází k exon skipping. Všechny tyto mutace mají negativní vliv na následnou formaci řetězců do konečné trojrozměrné struktury kolagenu (Williams, 1983).



Symbol X označuje mutaci v pro-alpha řetězcích.

Obr. 7. Molekulární mechanismus OI typů I-IV.  
 (Převzato z: Gajko-Galicka, 2002)

## 2.2.4 Molekulární podstata forem OI typu V, VI, VII, VIII a IX

U žádné z nově vyčleněných forem OI (typ V, VI, VII, VIII a IX) nebyla odhalena genetická podstata onemocnění v genech kolagenu typ I.

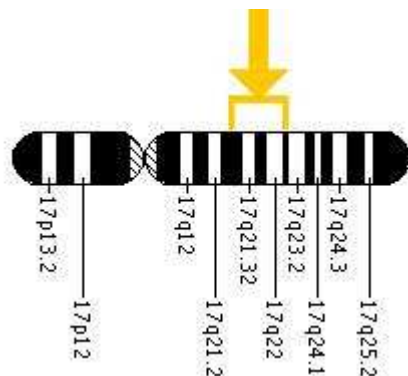
Formy s autosomálně recesivním typem dědičnosti, tedy typ VII, VIII a IX, jsou výsledkem mutací v genech CRTAP, LEPRE1, PPIB a FKBP10. První tři zmíněné geny tvoří tzv. prolyl 3-hydroxylační komplex, jehož cílem je hydroxylace prolinu. Ta je důležitá pro normální skládání kolagenu a jeho následné uvolňování do extracelulární matrix. Mutace všech těchto genů proto postihují normální skládání, shromažďování a vylučování molekul kolagenu s následným snížením kostní hmoty a deformacemi kostí (Cabral, 2007). CRTAP gen (cartilage associated protein) kóduje chrupavkový protein důležitý pro normální vývoj kostí a zodpovědný za prolyl 3-hydroxylaci kolagenu typ I a II a mutace v něm má za následek fenotyp OI typ VII (Morello, 2006). Částečná funkčnost tohoto genu vede k mírným symptomům, úplná absence je letální. Gen LEPRE1 (leucine proline-enriched proteoglycan 1) nese genetickou informaci pro tvorbu prolyl 3-hydroxylázy 1 (P3H1), enzymu zodpovědného za hydroxylaci prolinu obsaženého v alpha 1 řetězci molekul kolagenu typ I. Mutace v tomto genu vedou k tvorbě nefunkčního enzymu P3H1, čímž je porušena hydroxylace prolinu na pozici 986 alpha 1 řetězce a tvorba komplexu s CRTAP proteinem a cyclophilinem B. Absence tohoto enzymu vede k poruše tvorby helixu kolagenu typ I (Cabral, 2007). Gen PPIB kóduje protein cyclophilin B, poslední složku tzv. prolyl 3-hydroxylačního komplexu. Úplná absence tohoto proteinu má za následek mírně závažné formy onemocnění s fenotypovým projevem podobným OI typu IV. Oproti tomu částečná funkčnost genu PPIB snižuje funkčnost prolyl 3-hydroxylačního komplexu a výsledkem je vážná forma OI typu IX (Marini, 2010).

Mutace genu FKBP10 vedoucí v OI typu VI byly popsány teprve nedávno (Alanya, 2010).

V současnosti není známo, které geny a jejich mutace jsou odpovědné za fenotyp OI typu V (Glorieux, 2000, 2002).

## **2.3 STRUKTURA GENU A PROTEINU COL1A1**

Molekula kolagenu typ I má charakter trojšroubovice, složené ze dvou alpha 1 řetězců a jednoho alpha 2 řetězce. Tyto řetězce jsou kódovány dvěma geny, COL1A1 a COL1A2. Gen COL1A1 je umístěn na chromozomu 17 v cytogenetickém pruhu 17q21.3–q22 a kóduje alpha 1 řetězec. Oblast kódující mRNA dosahuje velikosti 18 kb. Řetězec alpha 2 je kódován genem COL1A2, který je umístěn na chromozomu 7 v cytogenetickém pruhu 7q21.3–q22.1. mRNA kódující sekvence tohoto genu dosahuje velikosti 38 kb (Kuivaniemi, 1997; Kielty, 1993).



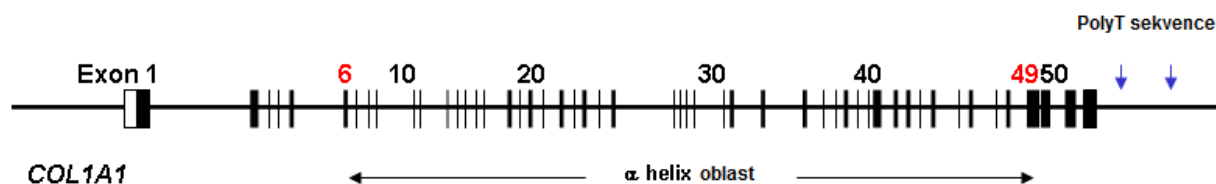
Obr. 8. Chromozomální lokalizace genu COL1A1.

(Převzato z: [http://wiki.medpedia.com/Collagen,\\_type\\_I,\\_alpha\\_1\\_\(COL1A1\)](http://wiki.medpedia.com/Collagen,_type_I,_alpha_1_(COL1A1))))

### 2.3.1 Primární struktura genu COL1A1

Z hlediska struktury rozlišujeme tři oblasti genu COL1A1 (obr. 9):

- 1) **Promotor** → lokalizován v 5' oblasti; obsahuje signální sekvenci nukleotidů (TATA box nebo CAT box), vázající transkripční faktory a RNA polymerázu pro spuštění transkripce (Rossow, 1987); úsek promotoru v oblasti -174 – -84 bp je zodpovědný za vysokou transkripční aktivitu – v rámci tohoto úseku rozlišujeme 2 domény: distální (oblast -129 – -107, zajišťuje 8,5 % základní aktivity COL1A1 promotoru) a proximální (oblast -104 – -77); mutace CCAAT motivu mají v 98 % případů za následek tvorbu sníženého množství kolagenu typ I (Artlett et al., 1998).
- 2) **Kódující sekvence genu** → oblast nesoucí genetickou informaci pro alpha řetězec.
- 3) **Terminátor** → oblast 3'; obsahuje terminální sekvenci (tzv. *poly-T sekvence*) a terminační kodóny (TAA, TAG nebo TGA), signalizující konec transkripce (Bates, 1994); mutace těchto sekvencí vedou k tvorbě prodlouženého produktu, který není dále inkorporován do molekuly prokolagenu typ I – výsledkem je tvorba sníženého množství kolagenu typ I (Willing et al., 1990).



Obr. 9. Primární struktura genu COL1A1.

(Převzato z: <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/COL1A1ID186.html>)

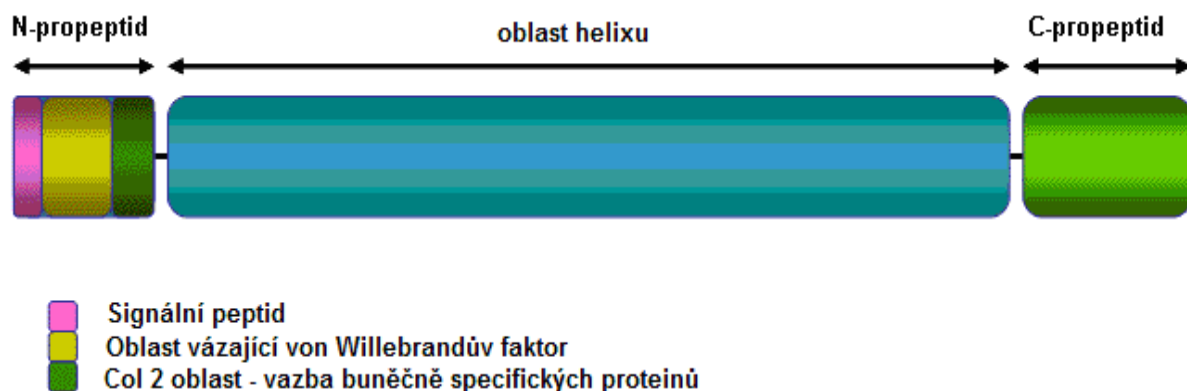
Gen COL1A1 je tvořen 51 exony a 50 introny. Všechny exony dosahují velikosti násobku 9 bp, nejčastěji 45 bp a 54 bp. Dále nalézáme ve struktuře genu násobky 54 bp, tj. 2x 54 bp, 3x 54 bp, nebo kombinace 45 bp a 54 bp. Každý z exonů začíná vždy kodónem pro glycin a

končí pozicí Y repetitivních úseků Gly-X-Y. Na pozici X se nejčastěji vyskytuje prolin, pozici Y představuje často hydroxyprolin. V konečném alpha 1 řetězci kolagenu typ I jsou zachovány pouze aminokyselinové zbytky oblasti helixu COL1A1 proteinu kódované sekvencemi exonů 6–49. Exon 6 kóduje část N-propeptidu, N-telozeptid a první tři aminokyseliny helixu. Exon 49 kóduje posledních 15 aminokyselin oblasti helixu, C-telozeptid a část C-propeptidu (Dalglish, 1997; Kuivaniemi, 1997). Exony 1–5, kódující oblast N-terminálního propeptidu, a exony 50, 51, které kódují oblast C-terminálního propeptidu pro-alpha 1 řetězců, jsou během posttranslačních procesů odštěpeny specifickými enzymy (N- a C-peptidáza) (McLaughlin a Bulleid, 1998; Myllyharju a Kivirikko, 2001).

### 2.3.2 Primární struktura proteinu COL1A1

(<http://www.hypro.cz/hyRubrIn.aspx?intRubrKis=1251&intLang=0>)

Primární struktura COL1A1 proteinu (tzv. prepro-alpha řetězec) se skládá ze tří základních oblastí, které lze dále rozdělit do několika podjednotek:



Obr. 10. Primární struktura proteinu COL1A1.

(Převzato z: Maatta, 1991; <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/COL1A1ID186.html>)

Jednotlivým oblastem odpovídá určitý počet aminokyselinových zbytků. Jejich uspořádání určuje strukturu výsledného alpha 1 řetězce kolagenu typ I. Protein COL1A1 tvoří celkem 1464 aminokyselinových zbytků:

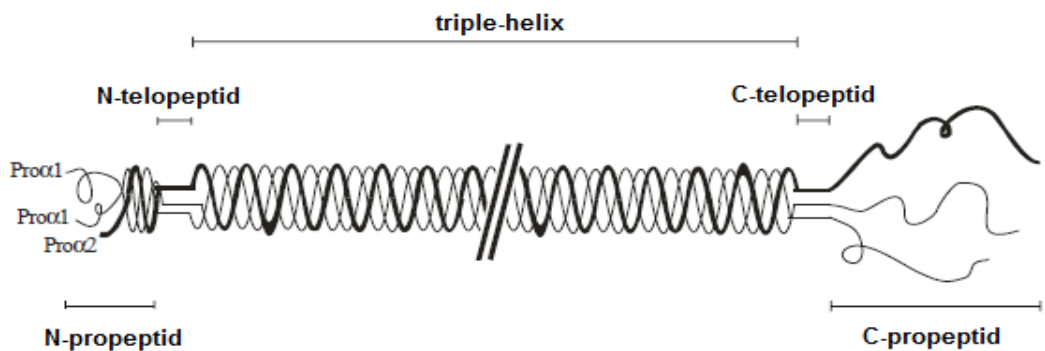


<i>COL1A1</i>	<i>Počet AMK zbytků</i>
<b>N-terminální oblast</b>	<b>161</b>
signální peptid	22
N-propeptid	139
<b>Oblast helixu</b>	<b>1057</b>
N-telopeptid	17
triple-helix	1014
C-telopeptid	26
<b>C-terminální oblast</b>	<b>246</b>
C-propeptid	246

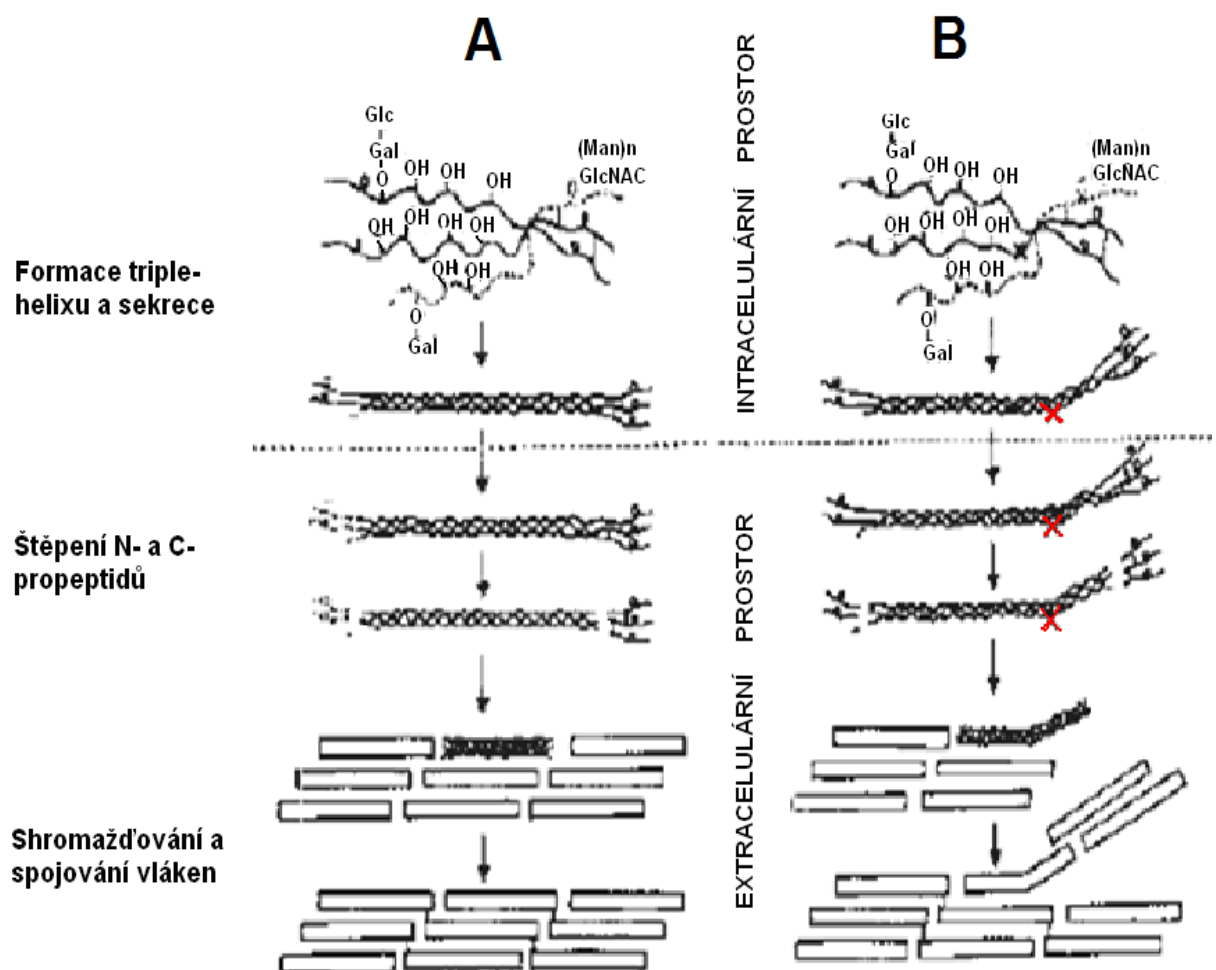
Tab. 2. Zastoupení zbytků aminokyselin v jednotlivých doménách prepro-alpha 1 řetězce COL1A1 proteinu.  
(Převzato z: Dalglish, 1997)

### 2.3.3 Formování alpha 1 řetězců (obr. 12)

Prepro-alpha řetězce, syntetizované buňkami fibroblastu, mají na svém začátku tzv. signální peptid, úsek tvořený 22 aminokyselinovými zbytky. Jeho funkcí je zavedení pre-pro-alpha řetězce do endoplazmatického retikula, kde dochází k odštěpení tohoto signálního peptidu enzymem signální peptidáza (Dalglish, 1997). Tak vzniká pro-alpha řetězec zakončený N-terminálním a C-terminálním propeptidem (obr. 11). Funkcí koncových propeptidů je protažení a uspořádání pro-alpha řetězců do charakteristické trojšroubovicovité struktury s následným uvolněním takto formovaných řetězců do extracelulárního prostoru (<http://www.hypro.cz/hyRubrIn.aspx?intRubrKis=1251&intLang=0>). Stabilní propojení řetězců je dále zajišťováno přítomností glycinu, a to na každé třetí pozici oblasti helixu pro-alpha řetězce. Glycin se v oblasti helixu vyskytuje v 338 opakujících se Gly-X-Y repetitivních úsecích, kde pozice X a Y jsou nejčastěji obsazeny aminokyselinami prolin a hydroxyprolin (van der Rest and Garrone, 1991). V extracelulární oblasti následně dochází k odštěpení terminálních peptidů, konkrétně enzymy prokolagen N-peptidáza (v oblasti vymezené aminokyselinovými zbytky 161–162) (Dombrowski, 1988) a prokolagen C-peptidáza (v oblasti definované aminokyselinovými zbytky 1218–1219) (Li, 1996) (Ghosh, 2002). Výsledkem je alpha řetězec zakončený z jedné strany N-telopeptidem a z druhé strany C-telopeptidem. Struktura telopeptidů již nemá charakter šroubovice.



Obr. 11. Molekula prokolagenu typ I – charakter jednotlivých podjednotek.  
(Převzato z: Kielty a Grant, 2002)



A. Schéma intracelulárních a extracelulárních kroků potřebných k syntéze, zpracování a skládání molekul kolagenu typ I do vláken.

B. Mutace způsobující konformační změnu vedoucí k nesprávnému formování vlákna. Symbol X označuje bodovou mutaci.

Obr. 12. Formace molekul kolagenu typ I.  
(Převzato z: Gajko-Galicka, 2002)

### 2.3.4 Trojrozměrná struktura proteinu COL1A1

Molekula kolagenu typ I, tzv. tropokolagen, dosahuje velikosti 290 nm, průměru 1,4 nm a je tvořena 21 druhy aminokyselin. Těsné přiblížení alpha řetězců je zajištěno přítomností glycinu, který má jednoduchý nevětvený postranní řetězec a který se nalézá na každé třetí pozici alpha řetězce (Gly-X-Y).

(<http://www.hypro.cz/hyRubrIn.aspx?intRubrKis=1251&intLang=0>)

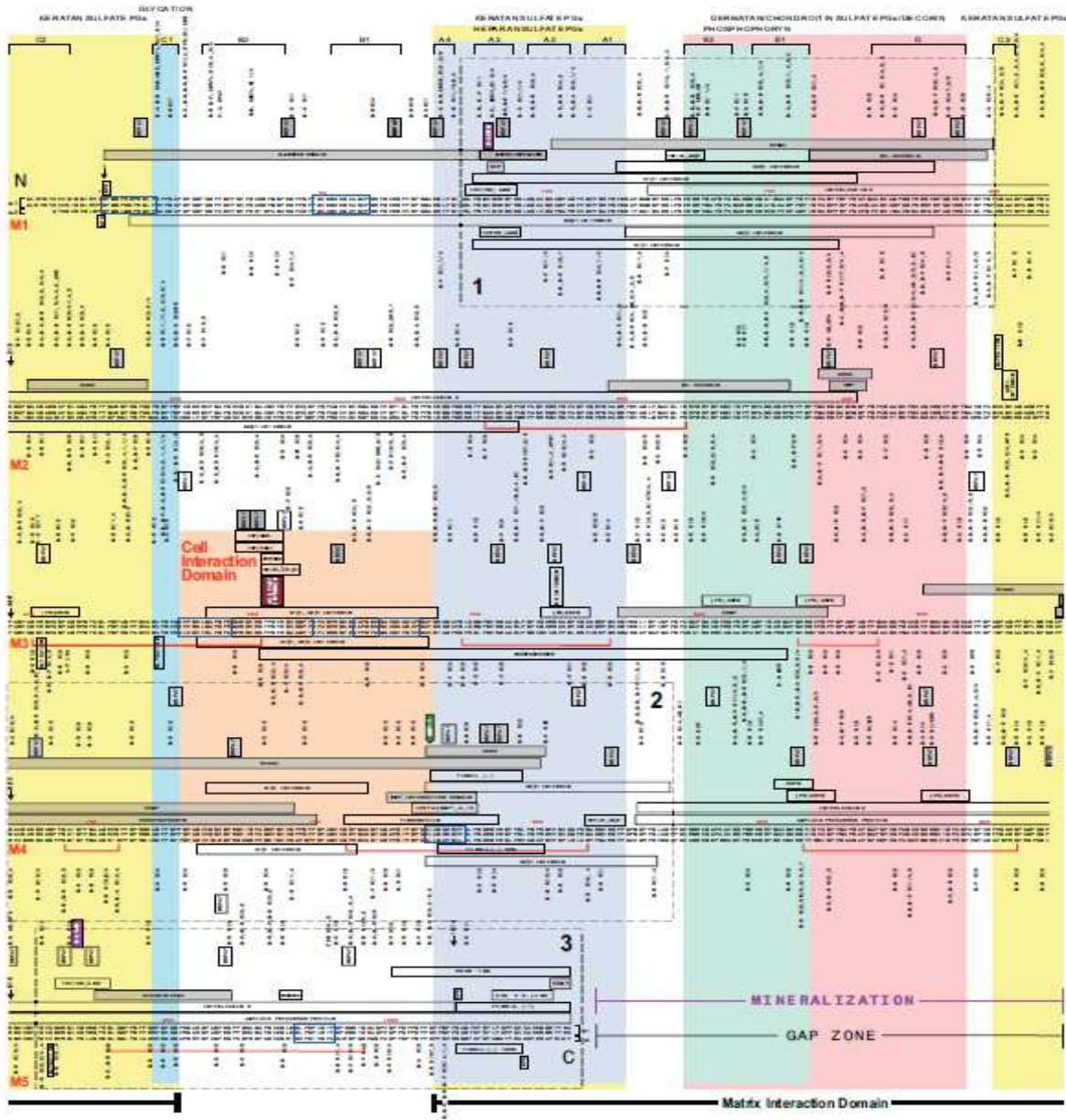
Dalšími aminokyselinovými zbytky, které zvyšují stabilitu molekuly, jsou:

- Prolin – prolin podléhá během procesu tvorby kolagenu z prokolagenu hydroxylací prolyl hydroxylázou v endoplazmatickém retikulu za vzniku hydroxyprolinu (Myllyharju, 2003). Přítomnost tohoto aminokyselinového zbytku v alpha řetězci znemožňuje volnou otáčivost kolem vazby  $C_{\alpha}$ -N a  $C_{\alpha}$ -CO. Následkem toho mají výsledný helix a triplehelix protáhlý charakter (Engel a Bächinger, 2005). Dalším stabilizačním vlivem těchto dvou zbytků aminokyselin je zvyšování denaturační teploty molekuly kolagenu se zvyšujícím se obsahem prolinu a hydroxyprolinu (Burjanadze a Veis, 1997).
- Lysin – lysin podléhá hydrolýze lysyl hydroxylázou (LH1, LH2 nebo LH3) za vzniku hydroxylysinu. Hydroxylysin může být dále modifikován dalšími specifickými enzymy (např. galaktosyl transferázou), které k němu připojují sacharidové řetězce galaktosy a glukosylgalktosy (konkrétně na pozicích 87 a 681 (<http://www.hypro.cz/hyRubrIn.aspx?intRubrKis=1251&intLang=0>)) (Kellokumpu, 1994; Kivirikko a Pihlajaniemi, 1998; Kivirikko, 1980). Tyto dva aminokyselinové zbytky jsou obsaženy zejména v koncových oblastech pro-alpha řetězců, kde vytvářejí pevné intra- a extracelulární příčné vazby, zvyšující stabilitu molekul kolagenu (Kagan a Li, 2003).

Při formaci alpha řetězců do vyšší struktury, tropokolagenu, se na zvýšení stability podílejí zároveň oblasti aminokyselin s polárními a nepolárními postranními řetězci. Nepolární oblasti alpha řetězců se shlukují uvnitř molekuly. Zde mezi sebou vytvářejí iontové vazby a pomáhají tak udržovat strukturu tropokolagenu. Polární oblasti se naopak nacházejí na vnější straně molekuly kolagenu, kde na sebe váží různé organické látky, tzv. ligandy (COMP, fibronectin, integriny, sacharidy atd.) (Marini, 2007).

## 2.3.5 Major Ligand Binding Regions (MLBR) proteinu COL1A1

V oblasti helixu proteinu COL1A1 se vyskytuje několik sekvenčních úseků, k nimž se během posttranslačních úprav molekul kolagenu typ I váží další ligandy. Vazbou proteinů k těmto tzv. „hot spots“ je zvýšena pevnost a pružnost kostí. V rámci alpha 1 řetězce COL1A1 proteinu rozlišujeme celkem tři Major Ligand Binding Regions (MLBR1–3) oblasti s vysokou koncentrací intermolekulárních vazeb (obr. 13). MLBR jsou vyčleněny kodóny: 81–200 (MLBR1), 682–830 (MLBR2) a 921–1040 (MLBR3).



– MLBR jsou označeny rámečkem (přerušované ohraničení) a čísly 1–3.

Obr. 13. Major Ligand Binding Regions a „hot spots“ proteinu COL1A1.

(Převzato z: Sweeney et al., 2008)

Mezi molekuly vážící se do oblastí „hot spots“ a MLBR COL1A1 molekul patří COMP, integriny, fibronectin, Hsp47, Decorin core protein, phosphophorin, proteoglycan, heparin a další (Sweeney et al., 2008).

## 2.4 KVALITA MOLEKULY KOLAGENU

Kvalita struktury mutovaných molekul kolagenu typ I se liší podle typu mutovaného genu, a tedy zároveň alpha řetězce, pozice a charakteru mutace. Mutace v COL1A1 genu, které mají za následek tvorbu abnormálních molekul, jsou více závažné než v genech COL1A2, neboť postihují 75 % syntetizovaných molekul kolagenu typ I (obr. 7 – viz. část „Formování alpha řetězců“) (Gajko-Galicka, 2002). V této kapitole popisujeme, jak se mohou mutace různých oblastí genu projevit v kvalitě kolagenu typ I.

### 2.4.1 Klíčové oblasti ovlivňující expresi genu COL1A1

V rámci genu kolagenu typ I lze identifikovat několik úseků, jejichž mutace mají různé dopady na kvalitu molekul kolagenu typ I a výsledný klinický obraz onemocnění.

#### 2.4.1.1 Oblast promotoru genu COL1A1

Mutace v signální sekvenci promotorové oblasti potlačují aktivaci transkripce. Důsledkem toho je snížená produkce mRNA s následným snížením počtu alpha 1 řetězců a sníženou tvorbou molekul kolagenu typ I. Mutace regulačních oblastí transkripce genu COL1A1 by dle výše uvedených informací měly způsobovat zejména fenotyp OI typ I. Ve většině případů ovšem vedou tyto mutace ve vážné typy Osteogenesis imperfecta (typ II, III a IV).

Poruchu transkripce mohou mít za následek dále mutace v místech vazeb tzv. aktivačních proteinů (*enhancerů/silencerů*). Řadíme mezi ně například:

- *CBF* – skládá se ze tří podjednotek (CBF-A, CBF-B a CBF-C) interagujících s CCAAT boxem v oblasti -100 – -96 bp promotoru genu COL1A1, aktivuje transkripci (Ghosh, 2002; Maity et al., 1992; Saitta et al., 2000).
- *SP1* – váže se do oblastí bohatých na C a G, interaguje v oblasti -129 – -107 bp, dále se váže na dvou místech v 274 bp rozsáhlé sekvenci intronu 1, čímž vytváří DNA proteinový komplex inhibující aktivitu promotoru COL1A1 (Chen et al., 1998).
- *YY1* – rozlišujeme dva typy:
  - 1) *YY1A* – interaguje s oblastí -40 – -37 bp, váže se na TATA box promotoru; mutace *YY1A* snižují expresi genu COL1A1.

2) YY1B – interaguje s oblastí -32 – -29 bp, váže se na TATA box promotoru; mutace YY1B zastavují expresi genu COL1A1.

(Riquet et al., 2001)

→ *c-Krox* – interaguje s oblastí -195 – -168 bp bohatou na G, potlačuje expresi genu COL1A1 (Peterkofsky et al, 1999; Widom et al., 1997).

→ *IF1* a *IF2* – inhibují transkripci genu (Ghosh, 2002)

→ *AP1* – tento transkripční faktor se váže v oblasti intronu 1 k sekvenci o velikosti 29 bp (Ghosh, 2002)

→ *NF- $\kappa$ B* – rozlišujeme tři podjednotky tohoto faktoru:

1) *NF- $\kappa$ B/Rel* – v nestimulovaných buňkách se vyskytuje v cytoplazmě ve spojení s inhibítorem *NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B)* proteinu; z tohoto komplexu je uvolňován např. *TNF- $\alpha$*  léčbou – uvolněný faktor je přemístěn do jádra, kde se váže buď na specifickou sekvenci nebo k dalším transkripčním faktorům.

2) *NF- $\kappa$ B/p50* – zvýšená exprese této podjednotky inhibuje transkripci.

3) *NF- $\kappa$ B/p65* – zvýšená exprese opět tlumí aktivitu COL1A1 promotoru.

(Ghosh, 2002; Siebenlist et al., 1994)

→ *Myb* – jedná se o skupinu faktorů s buněčně specifickým vlivem na transkripci (Ghosh, 2002).

→ *BTEB* (Basic transcription element binding protein) – váže se do tzv. GC boxů (Kobayashi et al, 1995).

→ *PP1* a *PP2A* (protein fosfatáza 1 a 2A) – zvýšená exprese *PP2A* spouští aktivitu COL1A1 promotoru (Ghosh, 2002).

→ *ERK1/2* – tato kináza potlačuje syntézu kolagenu typ I ve fibroblastech kůže (Ghosh, 2002; Reunanen et al., 2000).

→ *CTGF* – heparin vázající růstový faktor, stimuluje syntézu kolagenu typ I kožními a plicními fibroblasty (Moussad, 2000).

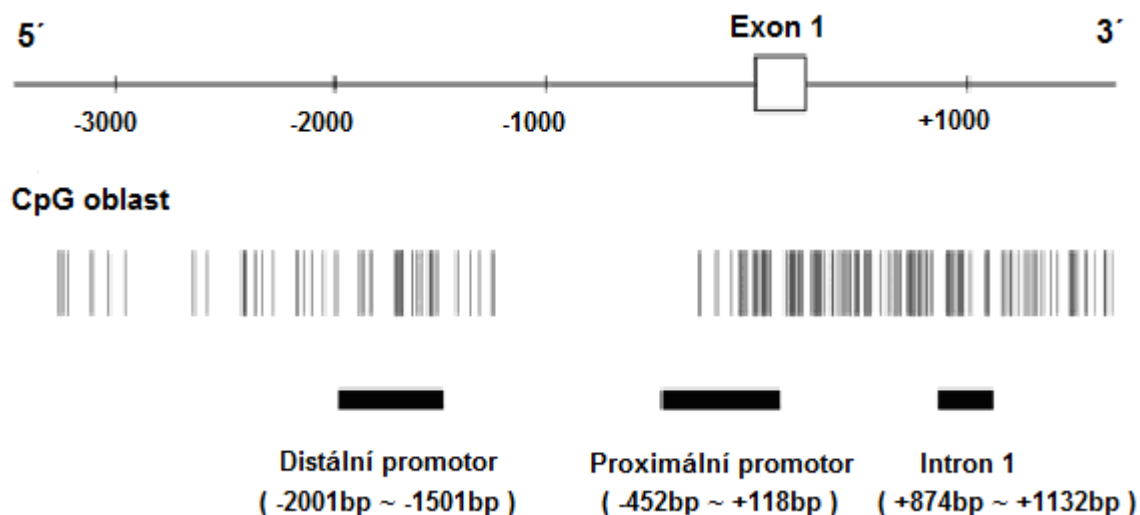
→ *Myc* a další (Ghosh, 2002).

#### **2.4.1.2 Mutace CpG dinukleotidů**

Mutace CpG dinukleotidů vyvolává metylace s následnou deaminací 5-metylcytosinu vedoucí k transici jednoho z těchto dvou nukleotidů. V genu COL1A1 může podléhat tomuto výše popsanému mutačnímu mechanismu 26 z 338 kodónů glycinu (Trummer, 2001; Marini, 2010).

Metylace CpG oblastí DNA podléhají regulační oblasti genu COL1A1 (oblast promotoru, exonu 1 a intronu 1). Vlivem tohoto procesu dochází k potlačení vazby transkripčních faktorů do těchto míst, což vede ke snížené regulaci transkripce s následnou sníženou tvorbou

mRNA. Výsledkem metylace v této oblasti genu je tvorba sníženého množství molekul kolagenu typ I (Marini, 2007; Rhodes et al., 1994). Nejčastěji metylované CpG dinukleotidy promotoru, exonu 1 a intronu 1 COL1A1 genu jsou znázorněny na obr. 14. Obecně platí, že počet metylovaných CpG ostrůvků stoupá s věkem postiženého jedince (Takatsu et al., 1999).



– vertikální linie znázorňují CpG oblasti promotoru, exonu 1 a intronu 1

Obr. 14. CpG ostrůvky regulační oblasti genu COL1A1.  
(Převzato z: Ohi et al., 2006)

Metylace CpG dinukleotidů kodónů glycinu v exonech 6–49 (tedy oblastech kódujících helix alpha 1 řetězců) se v jedné třetině případů projevují vážným klinickým obrazem Osteogenesis imperfecta, typy II a III (Marini, 2007). Z 80 % se ovšem jedná o mutace periodické, nejčastější substitucí je záměna glycinu serinem na pozici 352 (OI typ II/IV – neletální typ) (Korkko, 1997).

#### 2.4.1.3 Mutace kodónů glycinu

Mutace nahrazující kodón glycinu kodónem jiného aminokyselinového zbytku mají ve většině případů za následek vážný fenotypový projev choroby. Substituce glycinu znemožňuje vytvoření glycinového můstku mezi dvěma alpha řetězci, čímž je snížena stabilita a kvalita molekul kolagenu typ I.

#### 2.4.1.4 Mutace v oblastech stříhových míst pre-mRNA

Mutace lokalizované v oblastech stříhových míst pre-mRNA (*splice-site mutace*) se mohou projevovat třemi různými způsoby:

→ aktivace nových (= utajených) sestříhových míst

→ exon skipping (= přeskočení exonu čtecím rámcem)

→ inkorporace jednoho a více intronů do sekundární mRNA

Splice-donor-site mutace vedou zejména k efektu exon skipping, jehož následkem vzniká zkrácený protein. Dále mohou vést k aktivaci nových sestřihových míst následného intronu či sousedního exonu, nebo k začlenění krátkých intronů nebo jejich části do sekundární mRNA (Talerico a Berget, 1990).

Splice-akceptor-site mutace vedou především k aktivaci „utajených“ sestřihových míst následného či předešlého intronu (Cooper, 1995; Robberson, 1990). V jiných případech mohou vést k přeskočení exonu čtecím rámcem, vzácně k začlenění předešlého intronu do mRNA (Schwarze, 1997).

Výsledná stabilita takto mutované molekuly kolagenu závisí na několika aspektech:

- 1) Zda vedou splice-site mutace k vytvoření předčasného terminačního kodónu = STOP kodónu. Takovéto mutace vedou k tvorbě „null“ alel, jež mají za následek sníženou tvorbu mRNA a následně alpha 1 řetězců. Z toho plyne, že nemají vliv na kvalitu, ale kvantitu molekul kolagenu typ I.
- 2) Zda mutovaná mRNA kóduje *in-frame polypeptid* (vzniká prodloužením exonu o několik nukleotidů intronu). In-frame nukleotidy tvoří Gly-X-Y repetitivní sekvenci charakteristickou pro oblast helixu kolagenu. Takové mutace vedou k posunutí čtecího rámce při transkripci mRNA a k následné tvorbě strukturně postižených molekul kolagenu typ I.
- 3) Zda je terminační kodón doprovázen intronem, tedy sekvencí nekódující protein. V takovém případě je výsledkem opět tvorba abnormálních molekul proteinu kolagen typ I.

(Maquat, 1996)

## 2.5 SOUČASNÉ POZNATKY O KORELACI GENOTYP-FENOTYP U OSOB S DIAGNÓZOU OI

Neexistuje jednoduchý vztah vysvětlující spojitost mezi pozicí a typem mutace a jejím konkrétním fenotypovým projevem OI. Do dnešní doby však bylo stanoveno několik obecných zákonitostí, jako je zvyšující se fenotypová závažnost mutací směřujících od N-konce k C-konci, mutací vedoucích k substitucím glycinu (tzv. *poziční efekt* mutace) nebo k substitucím aminokyselinami s větvenými postranními řetězci, či závažnější klinický obraz choroby OI v důsledku mutací COL1A1 genu. Existuje ovšem mnoho odchylek (např. nejsou-li mutované řetězce inkorporovány do molekul prokolagenu typ I, je výsledkem mutací v C-



terminálních oblastech  $\alpha 1$  řetězců lehký fenotyp OI (typ I) (Byers, 1991; Pace, 2001), jejichž vysvětlení je následující (Tsipouras, 1993, Starman, 1989; Marini, 2007):

- 1) Oblast triplehelixu není strukturálně jednotvárná, pravděpodobnost mutací, a tudíž její stabilita, je odlišná v rámci jednotlivých oblastí triplehelixu. Na základě této skutečnosti byl vytvořen regionální model fenotypové závažnosti Osteogenesis imperfecta, vyžadující identifikaci velkého množství mutací pro přesné definování odlišných oblastí triplehelixu (Roughley, 2003).
- 2) Intracelulární dopady mutací nejsou stálé a mohou vykazovat rozdílnou míru stability mutovaných proteinů vzhledem ke katabolizmu. To může mít vliv na podíl mutovaného kolagenu spolu s tvorbou dalších produktů genu (Roughley, 2003).

Projev mutací může být modifikován faktory ovlivňujícími pevnost kostí, vyvolanými genetickými a nutričními změnami, nebo změnami životního prostředí. To je pravděpodobným důvodem různého fenotypového projevu běžných mutací.

Klinický obraz pacientů postižených touto chorobou je ovlivňován mnoha faktory, jako například:

- 1) typ mutovaného genu – mutace COL1A1 genu vedou nejčastěji v OI typ I a III, pro pacienty je charakteristickým znakem modré bělmo, častý výskyt nedoslýchavosti a dosažení normální či podprůměrné tělesné výšky (Hartikka, 2004); mutace  $\alpha 1$  řetězců jsou letální v 36 %, mutace  $\alpha 2$  řetězců způsobují letální fenotyp u 20 % případů
- 2) pozice mutace (= poziční efekt) (Marini, 2007):
  - N-terminální oblast  $\alpha 1$  řetězce – neletální OI (typ I, IV)
  - C-terminální oblast  $\alpha 1$  řetězce – substituce v oblastech 691–832 bp a 910–964 bp (MLBR = Major Ligand Binding Regions = místa vazby ligandů) vedou v letální fenotyp OI (typ II, III)
  - $\alpha 2$  řetězec – letální mutace v místech vazby proteoglykanů matrixu na fibrily kolagenu – mutace těchto oblastí (celkem 8) negativně ovlivňují fibrilogenesi kolagenu, spojování buněk kolagenu a u starších pacientů a pacientů s diabetes vedou ke glykaci kolagenu
- 3) charakter postranního řetězce nově kódovaného aminokyselinového zbytku:
  - substituce glycinu aminokyselinou s nabitým či rozvětveným postranním řetězcem vede v letální fenotyp OI (typ II a III) (Marini, 2007)
- 4) molekulární projev splice-site mutací:
  - a) exon skipping – způsobují letální fenotyp pouze v případě, je-li daný exon 3' k exonu 13

- b) aktivace „utajených“ stříhových míst – lehká forma OI vzniká pouze tehdy, je-li jejich výsledkem vznik STOP kodónu, v ostatních případech způsobují vážné typy onemocnění
- c) inkorporace intronu do mRNA – obsahuje-li zahrnutý intron terminační kodón, vedou v lehký fenotyp OI (typ I)

(Byers, 2005)

5) charakter missense mutací:

- Substituce prvních 200 aminokyselinových zbytků mají vždy za následek neletální fenotyp OI (typ I, IV). V rámci alpha 1 řetězce se dále nacházejí dva regiony (691–823 bp a 910–964 bp), tzv. MLBR = Major Ligand Binding Regions (oblasti vázající nekolagenní proteiny), jejichž mutace vedou vždy v letální fenotyp OI (typ II, III) (Marini, 2005).
- Substituce glycinu v prvních 85–90 aminokyselinových zbytcích N-terminální oblasti způsobují vzácný fenotyp OI/EDS. Vlivem mutace v této oblasti je porušeno štěpení N-propeptidu N-peptidázou během procesu tvorby alpha řetězců z pro-alpha řetězců. Alpha řetězce se zachovaným N-propeptidem dávají vznik tzv. pN-kolagenu. Takto defektní kolagen se projevuje hyperextenzibilitou kůže a laxitou kloubů (Cabral, 2005).

## 2.6 DALŠÍ ONEMOCNĚNÍ SPOJENÁ S MUTACEMI COL1A1

### 2.6.1 EHLERS-DANLOS syndrom

Mezi hlavní klinické znaky tohoto onemocnění řadíme hypermobilitu kloubů, elasticitu kůže, sklon k tvorbě modřin či špatné hojení jizev. V současnosti rozlišujeme šest typů tohoto onemocnění. Pouze jeden typ (*typ VIIA*) je podmíněný mutací genu COL1A1 (konkrétně substitucí argininu cysteinem na pozici 134) vedoucí k tvorbě abnormálních molekul kolagenu typ I a následnému defektu skládání těchto molekul (Lawrence, 2005; Uitto a Ringpfeil, 2004).

Ostatní typy mají svou molekulární podstatu v mutacích genů ADAMTS2 (kóduje prokolagen N-endopeptidázu), COL1A2, COL3A1 (*Collagen, type III, alpha 1* – kóduje alpha 1 řetězec kolagenu typ III), COL5A1 (*Collagen, type V, alpha 1* – kóduje alpha 1 řetězec kolagenu typ V), COL5A2 (*Collagen, type V, alpha 2* – kóduje alpha 2 řetězec kolagenu typ V), PLOD1 (*Procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase* – kóduje lysyl hydroxylázu), ZNF469 (*Zinc finger protein 469*), TNXB (*Tenascin XB* – kóduje glykoprotein tenascin-x) nebo chromosomu X. Dědičnost onemocnění je AD i AR.

([http://en.ganfyd.org/index.php?title=Ehlers-Danlos\\_syndrome#cite\\_ref-0](http://en.ganfyd.org/index.php?title=Ehlers-Danlos_syndrome#cite_ref-0))

### **2.6.2 CAFFEY syndrom**

Toto AD onemocnění je charakterizováno sklonem k tvorbě zánětů měkkých tkání, nadměrnou tvorbou nové kostní hmoty a přecitlivělostí. Příznaky choroby jsou patrné v prvních pěti měsících života postiženého jedince (Gensure, 2005). Výskyt Caffey choroby je typický pro pacienty afektované chorobami snižujícími imunitu (<http://emedicine.medscape.com/article/406697-overview>). Onemocnění dělíme do dvou forem – prenatální (vzácný a vážný typ) a infantilní (lehký typ). U všech postižených jedinců je popisována substituce argininu cysteinem na pozici 836 (heterozygotní) v genu COL1A1 (Gensure et al., 2005).

### **2.6.3 DERMATOFIBROSARCOMA PROTUBERANS (DFSP)**

Jedná se o málo běžné nádorové onemocnění podkožní tkáně se sklonem k lokálnímu růstu afektovaných buněk (především oblast hrudníku a končetin). DFSP lze léčit excízí postižené oblasti. Riziko opětovného výskytu nádoru je 20%. V ojedinělých případech propuká v metastázi. Tato choroba je důsledkem fúze genů COL1A1 a PDGFβ (*Platelet-Derived Growth Factor, beta polypeptide*) (výsledek translokace části 17. a 22. chromozomu) (Softah, 2003; Linn et al., 2003).

### **2.6.4 DENTINOGENESIS IMPERFECTA (DI)**

Dentinogenesis imperfecta je AD onemocnění postihující rozvoj zubů. Typickými znaky jsou modrošedé nebo jantarové zbarvení zubů, snížená mineralizace dentinu a předčasná ztráta chrupu. Na základě molekulární patogeneze rozlišujeme tři typy DI, přičemž pouze typ I má svou podstatu v mutacích genu COL1A1 nebo COL1A2 (Subramaniam, 2008). Typy II a III vznikají mutacemi genu DSPP (gen kódující *dentin sialophosphoprotein*) (Kim, 2004). DI typ I je jedním z klinických znaků onemocnění Osteogenesis imperfecta. (Gajko-Galicka, 2002; Marini, 2010).

### 3. CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem této práce je podrobný popis a porovnání nalezených genetických změn ve vazebných oblastech MLBR (konkrétně MLBR2 a MLBR3) genu COL1A1 a komplexního fenotypového obrazu u osob české populace s diagnózou Osteogenesis imperfecta, typu I–IV. Molekulárně genetická analýza je zaměřena na oblast genu COL1A1 zahrnující exony 31–40 (včetně přilehlých intronových oblastí), které jsou součástí vazebného místa pro další komponenty kostní tkáně, významné především pro integritu a pružnost kostí (např. metaloproteinázy, integriny, COMP atd).

Jednotlivé postupné cíle, které byly v průběhu řešení diplomové práce realizovány, jsou následující:

- 1) Vytipování osob s diagnózou Osteogenesis imperfecta, typu I–IV, pro molekulárně genetické zpracování.
- 2) Kompletace fenotypových dat osob s diagnózou Osteogenesis imperfecta, typu I–IV.
- 3) Příprava metodického zázemí pro experimentální část diplomové práce, vlastní molekulárně genetické zpracování vybraných vzorků DNA a identifikace nalezených mutací a polymorfismů v exonových i intronových částech vazebného místa genu COL1A1 (oblast exonů 31–40).
- 4) Popis nalezených genetických změn ve sledované vazebné oblasti genu COL1A1.
- 5) Korelace genotyp-fenotyp u osob, u nichž byla nalezena mutace či polymorfismus ve sledované oblasti genu COL1A1.
- 6) Porovnání nalezených mutací či polymorfismů osob české populace s diagnózou OI s nalezenými mutacemi a polymorfismy jiných etnických skupin.

Jak vyplývá z recentních prací (Marini et al., 2007, 2010), MLBR oblasti jsou postihovány mutacemi u osob s diagnózou OI, typ I–IV, a změny v těchto částech genu COL1A1 mohou značně ovlivňovat stabilitu vytvářené molekuly kolagenu. Úkolem diplomové práce je popsat mutace v MLBR oblastech vybraných českých pacientů s OI, především typů I, III a IV. Kompletace klinických dat českých OI pacientů nám umožní popsat fenotypové znaky jednotlivých nositelů mutací, porovnat tyto znaky se znaky konkrétních OI forem uvedených v práci Marini et al. (2010). Výsledky analýz mutací a polymorfismů v genu COL1A1 (MLBR oblasti) nám umožní porovnat mutace popsané u OI osob jiných populací.

## 4. MATERIÁL

V průběhu let 2007–2010 bylo v bance kompletováno 59 vzorků periferní krve pacientů s diagnózou OI typ I–IV (35 žen, 24 mužů). Tyto vzorky byly shromážděny z několika pracovišť České republiky (Praha, Hradec Králové, Ostrava, Brno).

Venózní krev (5–10 ml) byla pacientům odebrána lékařem, a to z povrchní žíly horní končetiny, do speciální odběrové zkumavky (obsahuje 0,5M EDTA).

Všichni testovaní jedinci podepsali informovaný souhlas. Převážná většina zkoumaných jedinců byla v minulosti nebo je dosud klinicky sledována na specializovaném pracovišti, na Ambulantním centru pro vady pohybového aparátu v Praze. Pro zpracování diplomové práce bylo finálně použito 25 vytipovaných pacientů (16 žen, 9 mužů) s diagnózou Osteogenesis imperfecta, typ I–IV (převážně IA, neboť výskyt mutací ve zkoumaných oblastech genu COL1A1 je právě u těchto pacientů nejčastější), viz. tabulka č. 6 část „Výsledky“.

Zbýlých 34 vzorků OI pacientů bylo uloženo v DNA bance na Ambulantním centru pro vady pohybového aparátu pro budoucí genetické analýzy.

## 5. MOLEKULÁRNĚ GENETICKÉ METODY

### 5.1 Izolace DNA

Genomická DNA (gDNA) byla izolována z periferní krve užitím komerčního kitu QIAamp DNA Blood MidiKit (QIAGEN, Germany). Získaná DNA byla rozpuštěna v 100–500 µl TE pufru (nebo destilované vody) a skladována v mrazícím boxu při teplotě -20°C. Koncentrace gDNA vstupující do amplifikačního procesu a její kvalita byla zjišťována elektroforeticky (obr. 19, 20 - viz. kapitola „Výsledky“).

Izolace DNA pomocí Quiagen-kitu byla prováděna certifikovanou technikou Quiagen, neboť bylo nutné zajistit uniformitu, standardní čistotu a kvantitu izolované DNA. Quiagen soupravy jsou univerzálně používanými izolačními soupravami pro rutinní molekulárně genetická stanovení.

Pracovní protokol izolace lidské genomické DNA:

- 1) Na dno centrifugační zkumavky (15 ml) napipetovat 200 µl *QIAGEN* proteázy.
- 2) Přidat 2 ml zpracovávané krve, centrifugovat po dobu 30 sekund při 1850 x g (3000 rpm).
- 3) Přidat 2,4 ml pufru – *Buffer AL*.

- 4) Inkubace 10 minut při 70 °C.
- 5) Přidat 2 ml etanolu (96–100%) a promíchat (cca 10x opatrně převrátit a následně protřepat).
- 6) Polovinu roztoku (3,3 ml) přenést do QIAamp MIDI kolony umístěné do centrifugační zkumavky (15 ml). Kolonu uzavřít, centrifugace 3 min při 1850 x g (3000 rpm).
- 7) Po uplynutí doby vyjmout QIAamp MIDI kolonu, odstranit filtrát a umístit kolonu zpět do centrifugační zkumavky.
- 8) Nanést 2 ml pufru – *Buffer AW1*, do kolony, uzavřít víčkem a centrifugovat 1 minutu při 4500 x g (5000 rpm).
- 9) Po ukončení centrifugace nanést do kolony 2 ml pufru – *Buffer AW2*, kolonu uzavřít a opět centrifugovat – 15 min při 4500 x g (5000 rpm).
- 10) Kolonu přenést do čisté centrifugační zkumavky (15 ml).
- 11) Na membránu kolony nanést 300 µl pufru – *Buffer AE*, nebo destilované vody (temperováno na teplotu 18 °C). Kolonu uzavřít a následně inkubovat 5 min při teplotě 18 °C. Následně centrifugovat 5 min při 4500 x g (5000 rpm).
- 12) Na membránu kolony napipetovat 300 µl pufru – *Buffer AE*, nebo destilované vody (temperováno na teplotu 18 °C). Uzavřenou kolonu inkubovat 5 min při teplotě 18 °C. Centrifugace 5 min při 4500 x g (5000 rpm).
- 13) Reakční nádobku se separovaným filtrátem (obsahuje DNA) řádně označit a dlouhodobě uskladnit v mrazicím boxu při teplotě -20 °C.

## 5.2 Gelová elektroforéza – kontrola izolátu a amplifikátu

Tato metoda umožňuje separaci molekul DNA na základě jejich velikosti.

Pro kontrolní horizontální elektroforézu (izolované gDNA) byl použit 1,5% agarózový gel (40 ml).

Příprava agarózového gelu byla následující:

- 1) Připravit roztok složený z 0,6 g agarózy pro DNA analýzu, 4 ml 5xTBE a 36 ml H<sub>2</sub>O. Lehce promíchat, fixem označit úroveň hladiny roztoku a dolít H<sub>2</sub>O do výše 0,5 cm nad úroveň hladiny (pro zachování objemu 40 ml po ukončení varu).
- 2) Homogenizovat připravený roztok s agarózou varem po dobu 8 minut.
- 3) Do horkého homogenizovaného roztoku přidat 4 µl GelRed (interkaluje do DNA, a tím umožňuje její vizualizaci pod UV světlem) (Biotium, USA) a důkladně promíchat.
- 4) Takto připravený roztok agarózy umístit do připravené elektroforetické vaničky s upevněným hřebínkem a ponechat zchladnout 60 minut.

Pro kontrolní elektroforézu PCR amplifikovaných vzorků byl použit 2% agarózový gel (40 ml). Příprava agarózového gelu byla následující:

- 1) Připravit roztok složený z 0,8 g agarózy pro DNA analýzu, 4 ml 5xTBE a 36 ml H<sub>2</sub>O. Lehce promíchat, fixem označit úroveň hladiny roztoku a dolít H<sub>2</sub>O do výše 0,5 cm nad úroveň hladiny (pro zachování objemu 40 ml po ukončení varu).
- 2) Homogenizovat připravený roztok s agarózou varem po dobu 8 minut.
- 3) Do horkého homogenizovaného roztoku přidat 4 µl GelRed (interkaluje do DNA, a tím umožňuje její vizualizaci pod UV světlem) a důkladně promíchat.
- 4) Takto připravený roztok agarózy umístit do připravené elektroforetické vaničky s upevněným hřebínkem a ponechat zchladnout 60 minut.

Následující kroky jsou společné pro oba typy gelu:

- 5) Po ztuhnutí gelu hřebínek opatrně vyjmout, gel vložit do elektroforetické vany a zalít 0,5xTBE pufrem tak, aby byl gel zcela ponořen.
- 6) Do první jamky gelu (umístění může být dle potřeby, není to dogma) nanést 0,5 µl velikostního markeru (100 bp DNA Ladder (Invitrogen, USA)) smíchaného s 4,5 µl destilované vody a 1 µl Load Buffer (bromfenolová modř).
- 7) Do jamek nanést vzorky – 5 µl DNA vzorku smíchat s 2 µl Load Buffer.
- 8) Spustit elektroforézu: 30–40 minut při 80 V a 500 A.
- 9) Vizualizovat DNA pomocí UV záření o vlnové délce 300 nm.

### 5.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Jedná se o citlivou metodu užívanou k detekci specifických genových sekvencí. Cílová sekvence je enzymaticky amplifikována ve třech po sobě jdoucích a opakujících se cyklech (30–40x) a nachází se mezi dvěma synteticky připravenými oligonukleotidovými primery (tab. 3) (Mullis, 1990; Thomson et al., 2001).

Pro vytvoření reakční směsi byl v naší studii použit Taq PCR MasterMix (QIAGEN, Germany), jehož složení je následující: Taq polymeráza (5 U/µl), PCR Buffer, MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM), dNTP (4 x 200 µM).

Izolovaná DNA byla spektrofotometricky změřena pro stanovení výchozí koncentrace izolátu. Koncentrace templátové DNA použité v reakční směsi byla z výchozí koncentrace izolátu upravena na 0,02–0,03 µg/µl.

Složení PCR reakční směsi:

Složka	Množství (μl)
H <sub>2</sub> O	19
Taq PCR MasterMix (1000U) (QIAGEN)	25
Forward primer	0,5
Reverse primer	0,5
DNA	5
konečný objem reakce	50

Tab. 3. Chemické složení PCR reakční směsi.

V této studii byla syntetizována pomocí šesti originálně připravených amplifikačních systémů (G1–G6) oblast exonů 31–40 (včetně přilehlých intronů) genu COL1A1, které jsou součástí vazebného místa pro další molekuly a jsou významné pro integritu a pružnost kostí (metaloproteinázy, integriny, COMP atd.).

Primery použité pro DNA analýzu byly navrženy speciálně za účelem přesné diagnostiky těchto šesti oblastí a byly vyrobeny v laboratoři GeneriBiotech (Česká republika) (tab. 4, 5).

V rámci studie byla popsána pouze část exonu 38, protože nebylo možné vhodněji navrhnout primery pro amplifikaci této části genu COL1A1.

Amplifikované oblasti mají následující sekvenci (červená kurzíva představuje oblast nasednutí forward/reverse primeru, tučně vyznačená oblast – černě i červeně, znázorňuje exon, neoznačené oblasti znázorňují přilehlé introny; čísla uvedená v závorkách u jednotlivých systémů uvádějí lokalizaci amplifikované oblasti v genu COL1A1):

Systém G1 (14 681–14 986 bp):

*gcatccgtaagggtgctg*tacttggccctatctccagagcagcctcacatgccctgtccttcccttctagggcgagagaggttt  
**ccctggcgagcgtggtgtgcaagggtcccctggtcctgctggtccccgaggggccaacggtgctcccggcaacgat**  
**ggtgctaagg**tgagggcagcgtggaaggggctctggcaagtggccaggaccaggtctacccctcctgcagcaggggat  
 ggcgggccatgaccaaagccatggagataggggtg ggggtggg*gggaaaagaccagggcagg*

Systém G2 (15 501–15 660 bp):

*ctggagtctgggctgtgag*tcttttcatcttttctcaaggctgtcgttggccttgaaacaagcctgggagataccaagcggggctta  
 gggctgtgacctcttggggccccaggcctcactccagctcttctgtgtgcacataggggtgatgctggtgcccctggagctc  
**ccggtagccagggcgcccctggccttcagggaatgcctggtgaacgtggtgcagctggtctccagggcctaaggg**  
**tgacagag**taagtcaacctccccctcccctgagccctacatggctcccctctctgctgcttgaatctctcagcatctctccttctc  
 tctgggatctgtccctctctcgctaactcctccttctccccttcccctctggccttttctgatgaatcctctccctgtggtccagggcc  
 atctatccccatgggttaccatggtgatgagaggtgggggcatctccttgggtggaggctcccctattcatcccgtacacaagtcag



gggcctttaacctcagttccacctgagtctccaggcaggcacccttttctgaaagaatctttgagtccttggcccagggtggaggc  
agggcagagctgcagagggcctctcaggaaa**cccagacaca agcagaacac**

System G3 (15 642–16 043 bp):

**ccagacacaagcagaacact**ataggtcacctccttggccccacactggaaatctcaagcttatccatgtctttagggtgatgctgg  
**cccaaagggtgctgatggctctcctggcaaagatggcgctccgtggctgactggccccattggctcctggccctgctg**  
**gtgccctggtgacaagg**tgaggtggccgctccccaccttctgcctaacacatagcctcctcagcaggcctgggcacggtt  
ccgtgggggtgctgggagagcaggtcctgccaactgagctgtcaactgggaacctggagggaccagaaggaggggag  
gctcctcctgggtcatctactaggagtattcaggggaggccctgaccctgagcc**tctgtccctgctctcag**

System G4 (15 934–16 595 bp):

**tcaacctgggaacctggag**ggaccagaaggaggggaggctcctcctgggtcatctactaggagtattcaggggaggccctgac  
cctgagcctcttgcctctgctcag**ggtgaaagtggctccagcggccctgctggctccactggagctcgtgg**tgccccctg  
aagtacagaagacctgtaagaccccatactggccctccctccctcacacagcaccctggcctgtctgtcctcacccttg  
cctcctccctcaccgcatccccgctccctcctgtcagcgcacatctccaatctgactccttttctctag**ggagaccgtgg**tgagc  
**ctggccccccggccctgctggctttgctggccccct**gtgagtaaccaagacccccatcattttcatcaccgactgggacct  
gggacctcgagggacggaatgaggacaaaggcgtcagccatcctcaggggagaagggtggagacgggattgttccaccc  
aagcatctcctgctccattactgctcctccccaggtagtggaactcctgctcctccctccattcaccgacctgctcctcccc  
aggggtgctgacggccaacctgggtgctaaaggcgaacctgggtgatgct**gggtctaaaggcgatgctg**

System G5 (16 447–16 872 bp):

**ttcctgctccattactgct**cctccccaggtagtggaactcctgctcctccctccattcaccgacctgctcctccccaggggtg  
**ctgacggccaacctgggtgctaaaggcgaacctgggtgatgctgggtgctaaaggcgatgctggctccccctggccctgcc**  
**ggacccgctggacccccctggccccatt**gtgagtggtggcctctgtgccacgaggctgggggctgggaccaggacg  
ggtccaggctgatgcctctgtctcctacag**ggtaatgttggtgctcctggagccaaagggtgctcgcggcagcgtggt**  
**ccccct**gtgagtatcaccgctctctgttgagcctctccccctccccaggcagcgggtggcaggtgagggcagctgg**gtcggat**  
**gagttggctgtt**

System G6 (16 908–17 542 bp):

**gggtgctactggtttccctgg**tgctgctggccgagtcggctcctcctggccccctctgtaagtctctgcagcagagtccactgctc  
taggttgggggtgctgggtgggggctgccagaaggatggtggggctgactgaggaccaatgatgcaccagagccccctgga  
gtctgacagccccctctatcctcatccag**ggaaatgctggacccccctggccccctggtcctgctggcaagaaggcggc**  
**aaaggctccccgtgggtgagactggccctgctggacgtcctgggtgaagttggccccctggccccctggccctgctggc**  
**gagaaaggatccccgtgctgatggtcctgctg**taagtgccagctcagatctctgcagctccggaggtgtgcagagctggg  
gaggggtccctgtgctgctctctggcacctcaccctgtttgctcccaaagggtgctcctgggtactccccggcctcaaggatt  
**gctggacagcgtgggtggtcgccctgcctggctcagagaggagagaggcttccctggtcttctcctggccccctctgta**  
agtccccctcaccttggggggcctgagaaaaacatcacaggacttgagtggg**gctggagccaaggagaacaga**

Následující tabulka uvádí charakteristiku analyzovaných COL1A1 systémů. Reverse primer systému G4 se nachází v sekvenci exonu 36 genu COL1A1.

System	Zahrnuté exony	Forward primer	Reverse primer	PCR produkt	Ta (°C) optimální
G1	31	CATCCGTCAAGGTGCGTCG	CCTGCCCTGGTCTTTTCCC	305 bp	60,7
G2	32	CTGGAGTCTGGGCTGTGAG	GTGTTCTGCTTGTGTCTGGG	660 bp	57,7
G3	33	CCAGACACAAGCAGAACACT	CTGAGAGCAAGGGACAAGA	402 bp	57,2
G4	34, 35	TCAACCTGGGAACCTGGAG	CAGCATCGCCTTTAGCACC	662 bp	59,4
G5	36, 37	TTCCTGCCTCCATTACTGC	AACAGCCAACTCATCCGAC	426 bp	59,3
G6	38, 39, 40	GGTGCTACTGGTTCCCTGG	TCTGTTCTCCTTGGCTCCGC	645 bp	60,5

Tab. 4. Specifikace systémů a použitých primerů (5'→3' orientace).

Následující tabulka uvádí charakteristiku primerů jednotlivých systémů:

System	Primer	Název	Velikost (bp)	Tm (°C)	Obsah GC (%)	Komplementarita
<b>G1</b>	forward	hCOL1A1_G1#1	19	57,1	63,2	100%
	reverse	hCOL1A1_G1#2	19	55,7	63,2	100%
<b>G2</b>	forward	hCOL1A1_G2#1	19	50,1	63,2	100%
	reverse	hCOL1A1_G2#2	20	50,2	55	100%
<b>G3</b>	forward	hCOL1A1_G3#1	20	47,2	50	100%
	reverse	hCOL1A1_G3#2	19	47,3	52,6	100%
<b>G4</b>	forward	hCOL1A1_G4#1	19	52	57,9	100%
	reverse	hCOL1A1_G4#2	19	53,3	57,9	100%
<b>G5</b>	forward	hCOL1A1_G5#1	19	50,1	52,6	100%
	reverse	hCOL1A1_G5#2	19	49,6	52,6	100%
<b>G6</b>	forward	hCOL1A1_G6#1	20	53,3	60	100%
	reverse	hCOL1A1_G6#2	20	56,7	60	100%

Tab. 5. Charakteristika použitých primerů.

PCR amplifikace jednotlivých oblastí byla optimalizována a provedena dle uvedených protokolů na přístroji *MJ Research Minicycler PTC 150* (MJ Research/Bio-Rad Inc, USA):

System G1:

Fáze	Teplota	Čas
1. Počáteční denaturace	95 °C	10 min
2. Denaturace	95 °C	30 s
3. Annealing	59 °C	30 s
4. Extense	72 °C	60 s
5. Finální extense	72 °C	10 min
6. Chlazení	4 °C	15 min

35x

System G2, G4 a G6:

Fáze	Teplota	Čas
1. Počáteční denaturace	95 °C	10 min
2. Denaturace	95 °C	30 s
3. Annealing	58 °C	30 s
4. Extense	72 °C	60 s
5. Finální extense	72 °C	10 min
6. Chlazení	4 °C	15 min

35x

System G3:

Fáze	Teplota	Čas
1. Počáteční denaturace	95 °C	10 min
2. Denaturace	95 °C	30 s
3. Annealing	57 °C	30 s
4. Extense	72 °C	60 s
5. Finální extense	72 °C	10 min
6. Chlazení	4 °C	15 min

35x

System G5:

Fáze	Teplota	Čas
1. Počáteční denaturace	95 °C	10 min
2. Denaturace	95 °C	30 s
3. Annealing	53 °C	30 s
4. Extense	72 °C	60 s
5. Finální extense	72 °C	10 min
6. Chlazení	4 °C	15 min

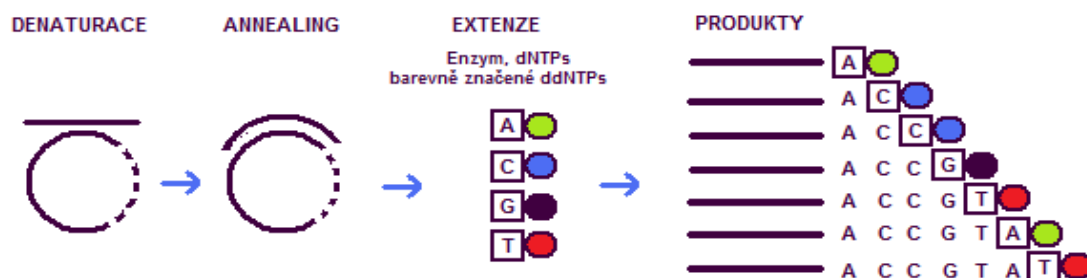
35x

## 5.4 Automatické sekvencování s kapilární elektroforézou

Cílem této metody je stanovení primární struktury, tedy pořadí nukleotidů v molekule DNA. V naší studii bylo provedeno tzv. automatické sekvencování s kapilární elektroforézou.

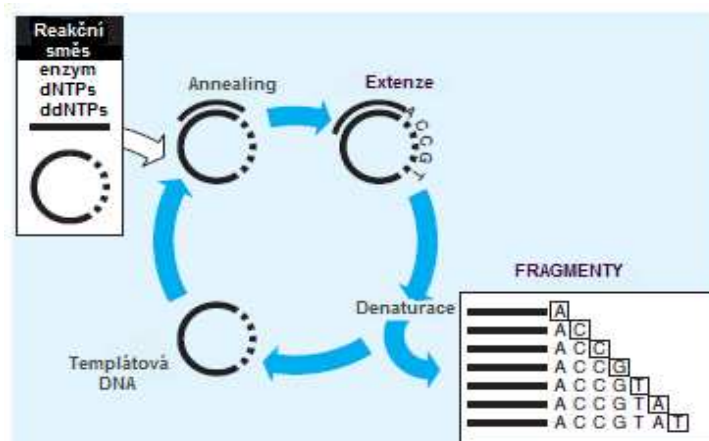
Tento typ sekvencování vychází z tzv. Sangerova sekvencování. Sangerovo sekvencování je založeno na schopnosti DNA-polymerázy inkorporovat do rostoucího řetězce 2',3' dideoxynukleotidy (ddNTPs) postrádající 3'OH skupinu. Takto upravené nukleotidy mají funkci terminátoru. Reakční směs obsahuje templátovou DNA, DNA-polymerázu, specifické primery, nukleotidy (dNTPs), dideoxynukleotidy (ddNTPs) a reakční pufr. Reakční směs se připravuje ve čtyřech zkumavkách, přičemž obsah jednotlivých zkumavek se liší pouze v použitém ddNTP (ddATP x ddTTP x ddGTP x ddCTP). Každá směs podstupuje tři cykly: denaturaci, annealing a extenzi. DNA polymeráza zařazuje do syntézovaného řetězce dNTPs nebo ddNTPs. Inkorporace konkrétního typu nukleotidu závisí na koncentraci dNTPs x ddNTPs v reakční směsi (nejčastěji se jedná o koncentraci 100:1). Výsledkem je tvorba různě dlouhých fragmentů DNA zakončených dideoxynukleotidem. Detekce nově syntetizovaných řetězců je umožněna radioaktivním /neradioaktivním označením primeru, ddNTPs nebo jednoho ze čtyř dNTPs. Vzniklé fragmenty jsou následně elektroforeticky separovány na gelu, a to ve čtyřech řadách. Rychlost pohybu jednotlivých fragmentů médiem v elektrickém poli je přímo úměrná jejich velikosti.

Automatické kapilární sekvencování užívá oproti Sangerovu typu fluorescenčně značených ddNTPs (ddNTPs jsou označeny odlišnými barvami, které emitují světlo o různých vlnových délkách, (obr. 15)) a reakční směs se připravuje pouze v jedné zkumavce, která výsledně obsahuje všechny čtyři typy ddNTPs. Takto připravená reakční směs podstupuje tři cykly sekvenční PCR v termálním cykleru: annealing, extenzi a denuraci (obr. 16). Poměr dNTPs a ddNTPs je optimalizován tak, aby byl produkován vyrovnaný počet dlouhých a krátkých segmentů. Výsledkem je opět tvorba fragmentů zakončených jedním ze čtyř ddNTPs.



Obr. 15. Schéma cyklů sekvenční amplifikace s užitím barevně značených ddNTPs.

(Převzato z: DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis – Applied Biosystems Chemistry Guide | Second Edition, 2009)

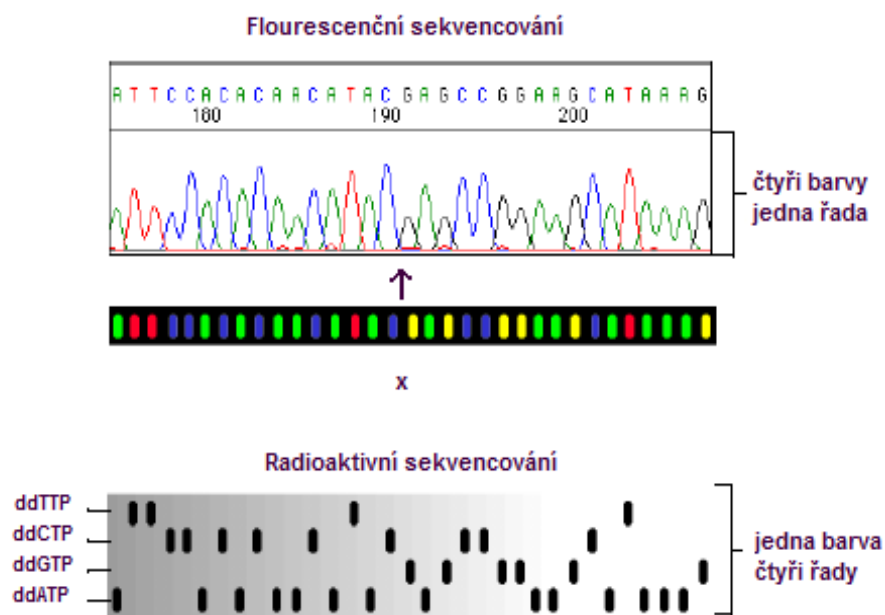


Obr. 16. Jednotlivé cykly sekvenační směsi v termocyklu.

(Převzato z: DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis – Applied Biosystems Chemistry Guide | Second Edition, 2009)

Následujícím krokem je purifikace vzniklé směsi fragmentů. Jejím cílem je odstranění nenavázaných dNTPs a ddNTPs. To zabraňuje nebo snižuje riziko vzniku falešných signálů během ozáření fragmentů laserem v elektroforetické kapiláře.

Elektroforetická separace vzniklých fragmentů probíhá v kapiláře obsahující médium. Fragmenty jsou separovány na základě velikosti jejich celkového náboje. Těsně před kladnou elektrodou je umístěn laser. Ozáření fragmentů, zakončených fluorescenčně značenými dideoxynukleotidy, laserovým paprskem dochází k fluoreskovaní barvy. Ta je zachycena optickým zařízením. Software sekvenačního přístroje pak převede fluorescenční signál do digitálních dat. K analýze získaných dat používáme speciálních softwarů.



Obr. 17. Porovnání fluorescenčního a radioaktivního sekvenování.

(Převzato z: DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis – Applied Biosystems Chemistry Guide | Second Edition, 2009)

Pro DNA sekvenční analýzu byl v této studii použit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies Corporation, USA). Tento kit obsahuje: BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix, -21 M13 Control Primer (forward), pGEM®-3Zf(+) double-stranded DNA Control Template a Big Dye Terminator v3.1 Sequencing Buffer (5X).

Vzorky byly nanášeny do sekvenačního plata s 96 reakčními jamkami.

### Pracovní postup:

- 1) Ve zkumavce připravit reakční směs o následujícím složení:

Složka	Množství (μl)
Terminator Ready Reaction Mix	8
Sequencing Buffer	4
DNA	5
Primer	0,64
H <sub>2</sub> O	6,36
konečný objem reakce	20

Pro každý vzorek byly připraveny dvě reakční směsi lišící se v použitém primeru (forward x reverse).

- 2) Vložit do termocykleru sekvenačního zařízení, nastavit parametry amplifikace:

1.	Nastavit objem reakce (= 20 μl)
2.	Počáteční denaturace: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Rapid thermal ramp – 96 °C</li> <li>• 1 min při 96 °C</li> </ul>
3.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rapid thermal ramp* – 96 °C</li> <li>• 10 sec při 96°C</li> <li>• Rapid thermal ramp – 50 °C</li> <li>• 5 sec při 50°C</li> <li>• Rapid thermal ramp – 60 °C</li> <li>• 4 min při 60°C</li> </ul>
4.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rapid thermal ramp – 4 °C</li> <li>• 10 min při 4 °C</li> </ul>

\* rapid thermal ramp = vzestup/pokles T o 1 °C za 1 sec

3) Etanol/EDTA precipitace – odstranění nenavázaných ddNTPs:

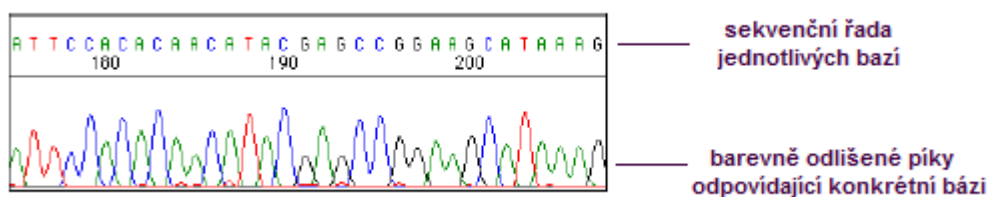
1. Vyndat sekvenační plato z termocykleru.
2. Přidat 5  $\mu$ l 125mM EDTA ke každému vzorku.
3. Přidat 60  $\mu$ l 100% etanolu ke každému vzorku.
4. Uzavřít plato aluminiovým víkem, 4x přetočit.
5. Inkubovat 15 min při 18  $^{\circ}$ C.
6. Centrifugovat 30 (45) min při 2000 – 3000 (1400 – 2000) x g.
7. Obrátit plato a centrifugovat 1 min při 185 x g.
8. Přidat 60  $\mu$ l 70% etanolu ke každému vzorku.
9. Centrifugovat 15 min při 1650 x g při 4  $^{\circ}$ C.
10. Obrátit plato a centrifugovat 1 min při 185 x g.
11. Umístit plato do digestoře a nechat 15 min schnout.
12. Jednotlivé vzorky rozpustit ve 20  $\mu$ l destilované vody.

4) Umístit sekvenační plato do sekvenačního zařízení (3130 Genetic Analyzer, Life Technologies Corporation, USA) a zahájit kapilární elektroforézu.

## 5.5 Odečet sekvenogramů

Data získaná sekvenací templátu DNA jsou znázorňována ve formě sekvenogramů. Jednotlivé báze analyzované DNA jsou znázorněny formou píků, které jsou barevně odlišeny v závislosti na konkrétní bázi, a dále sekvenční řadou nad těmito píky (obr. 18). Dle charakteru jednotlivých píků posuzujeme kvalitu sekvence (v optimálním případě jsou ostré a nepřekrývají se).

Produkty sekvenační amplifikace byly porovnávány s normosekvencemi daných oblastí v programu *DNA Baser* (HeracleSoftware, Germany) a v programu *SeqScape® Software for Mutation Profiling v2.7* (Life Technologies Corporation, USA). Nalezené mutace byly dále porovnávány s databází OMIM (NIH, Bethesda, USA).



Obr. 18. Ilustrativní obrázek sekvenogramu.

(Převzato z: DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis – Applied Biosystems Chemistry Guide | Second Edition)

## 6. VÝSLEDKY

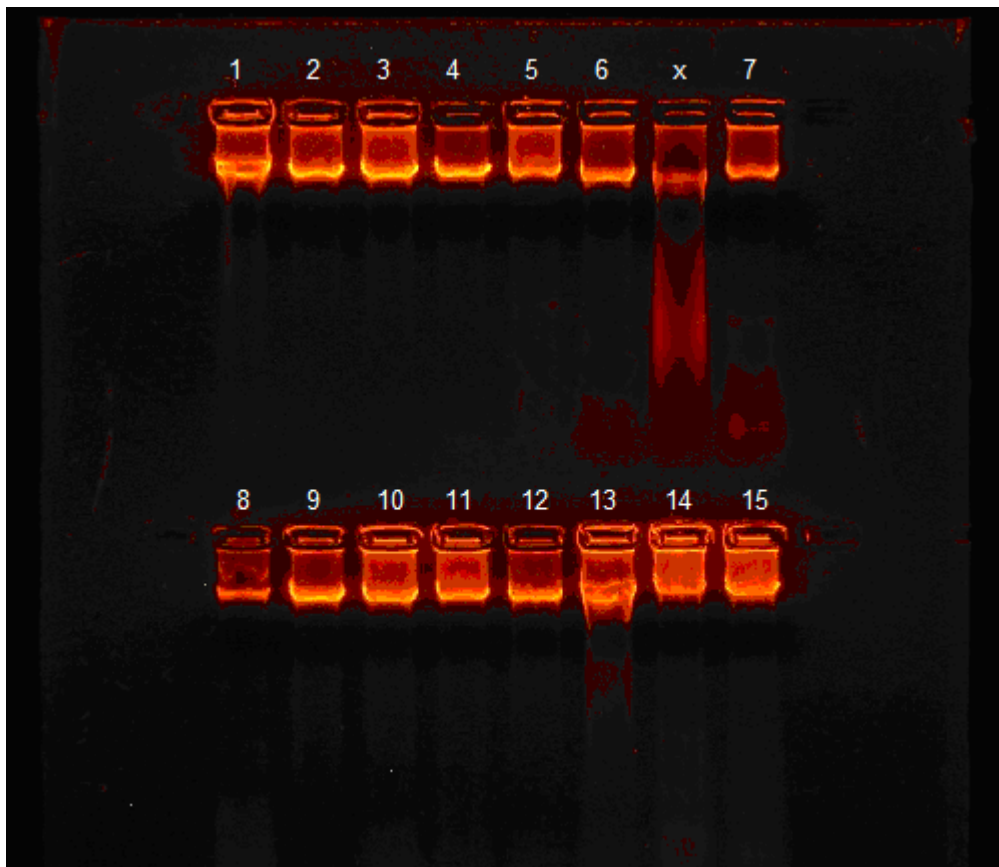
Tato studie je zaměřena na genetickou analýzu šesti oblastí (systémů) genu COL1A1 zahrnujících exony 31–40 a přilehlé intronové oblasti. Zkoumáno bylo celkem 25 českých pacientů (tab. 6), kteří jsou dlouhodobě sledováni v Ambulantním centru pro vady pohybového aparátu v Praze, nebo na odděleních klinické genetiky dalších pracovišť – Brno, Ostrava, Hradec Králové atd.. Žlutě označení pacienti nesou mutaci v analyzované oblasti COL1A1 genu.

Číslo pacienta	Pohlaví	Věk (rok, měsíc)	Klinická forma OI
1	žena	50 r. 1 m.	IA
2	muž	20 r. 1 m.	IA
3	muž	12 r. 7 m.	IA
4	žena	27 r. 1 m.	IA
5	muž	17 r. 10 m.	IVB
6	žena	21 r. 1 m.	III
7	žena	21 r. 5 m.	IA
8	žena	36 r. 1 m.	III
9	muž	27 r. 8 m.	IA
10	žena	9 r. 0 m.	IA
11	muž	37 r. 1 m.	IA
12	žena	22 r. 11 m.	IA
13	žena	11 r. 9 m.	IA
14	žena	30 r. 8 m.	IA
15	muž	17 r. 2 m.	IA
16	žena	27 r. 1 m.	IA
17	žena	41 r. 1 m.	IA
18	žena	10 r. 11 m.	IA
19	žena	11 r. 6 m.	III
20	žena	18 r. 0 m.	I, suspektní
21	muž	11 r. 11 m.	IA
22	žena	22 r. 5 m.	IA
23	muž	39 r. 8 m.	III
24	muž	18 r. 4 m.	III
25	žena	23 r. 11 m.	IA

Tab. 6. Přehled 25 analyzovaných českých pacientů s OI.

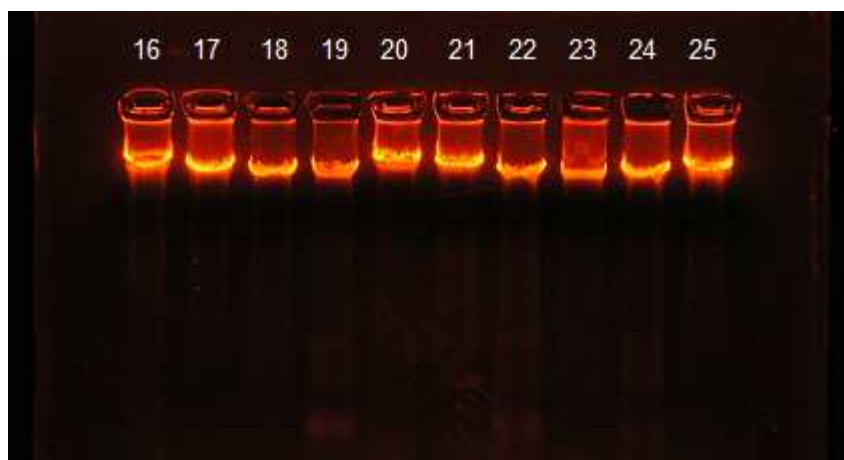


Následující obrázky (obr. 19, 20) znázorňují kontrolní elektroforézu izolované gDNA studovaných pacientů. Čísla uvedená nad jednotlivými vzorky odpovídají číslům analyzovaných pacientů.



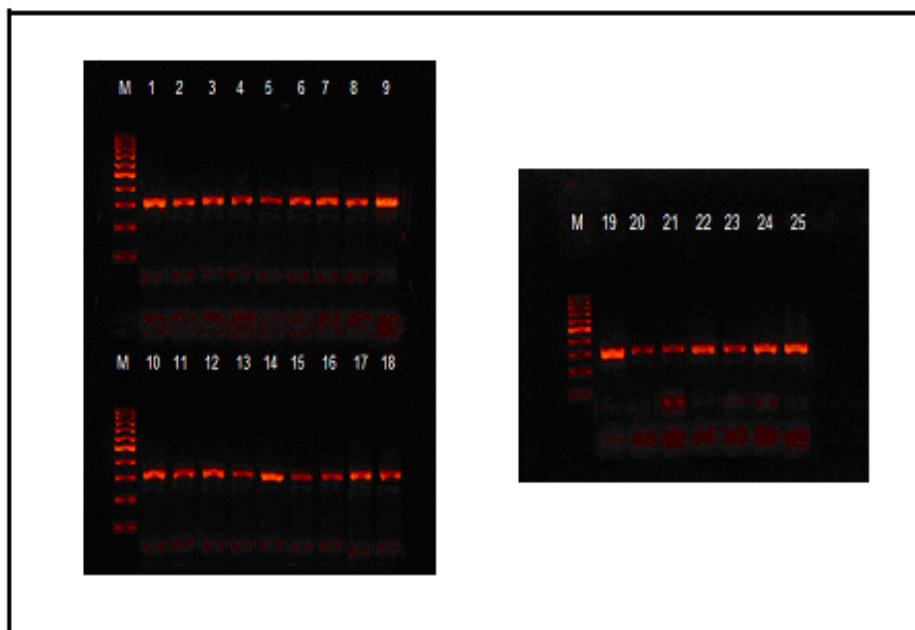
– vzorek označený symbolem x nebyl do studie zahrnut

Obr. 19. Kontrolní elektroforéza DNA izolátů pacientů číslo 1–15.



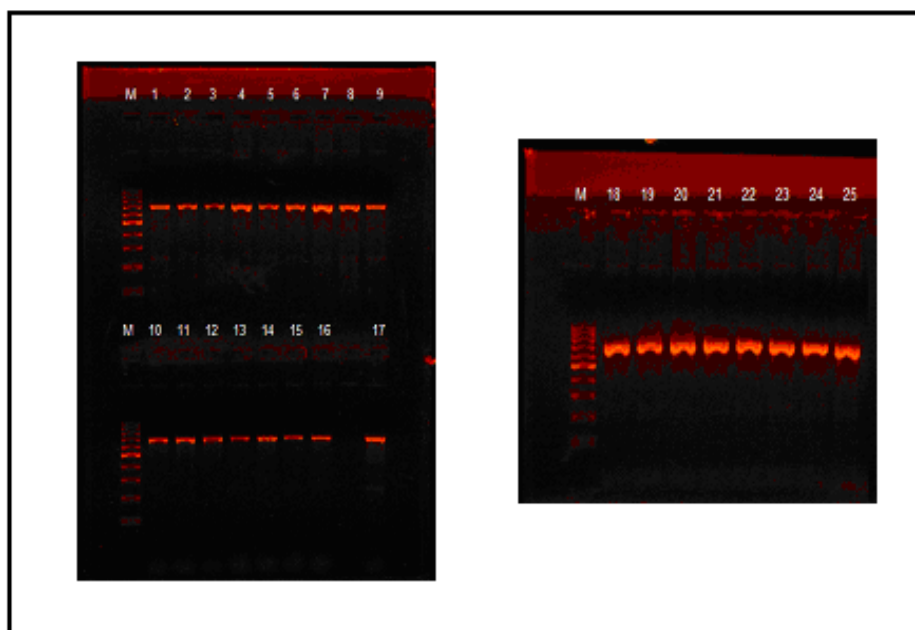
Obr. 20. Kontrolní elektroforéza DNA izolátů pacientů číslo 16–25.

Níže uvedené obrázky znázorňují kontrolní elektroforézu kvality PCR produktů pacientů číslo 1–25 pro jednotlivé zkoumané systémy (G1–G6) genu COL1A1. Čísla uváděná nad jednotlivými jamkami agarózového gelu odpovídají číslům analyzovaných pacientů. Písmeno M je zkratkou pro kontrolní marker (100 bp DNA Ladder – velikost fragmentů = 100 bp) .



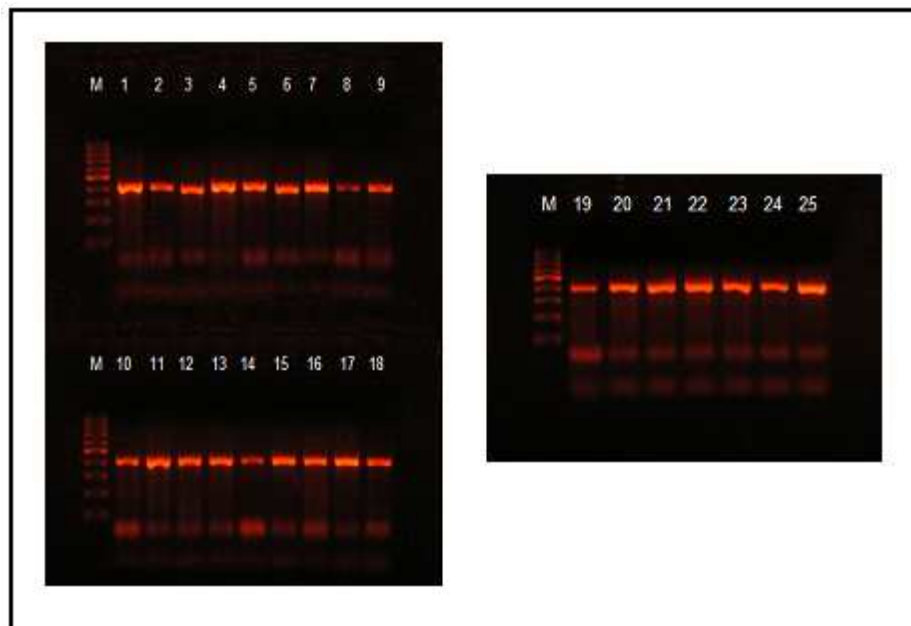
– velikost PCR fragmentů = 305 bp, M = 100 bp velikostní marker

Obr. 21. Kontrolní elektroforéza PCR fragmentů systému G1 pacientů číslo 1–25.



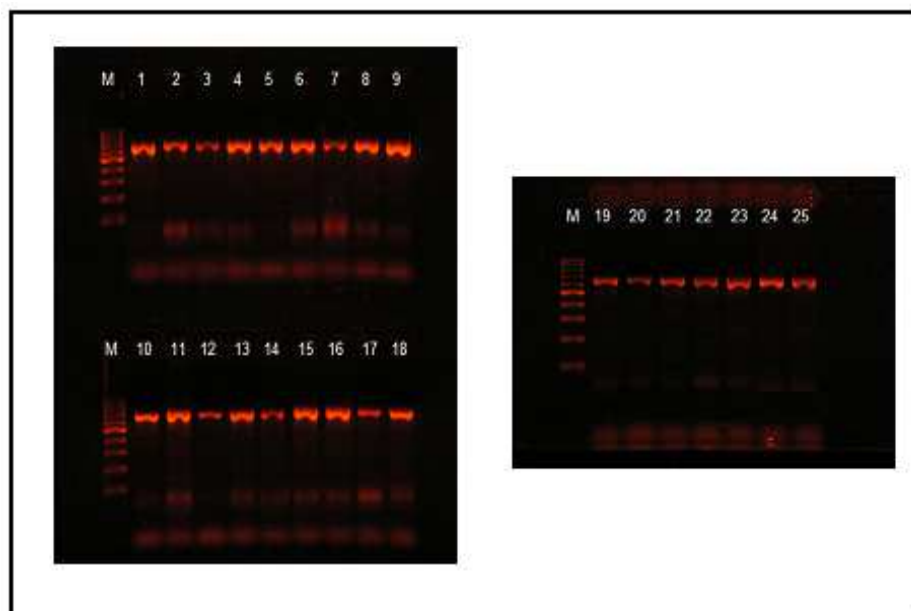
– velikost PCR fragmentů = 660 bp, M = 100 bp velikostní marker

Obr. 22. Kontrolní elektroforéza PCR fragmentů systému G2 pacientů číslo 1–25.



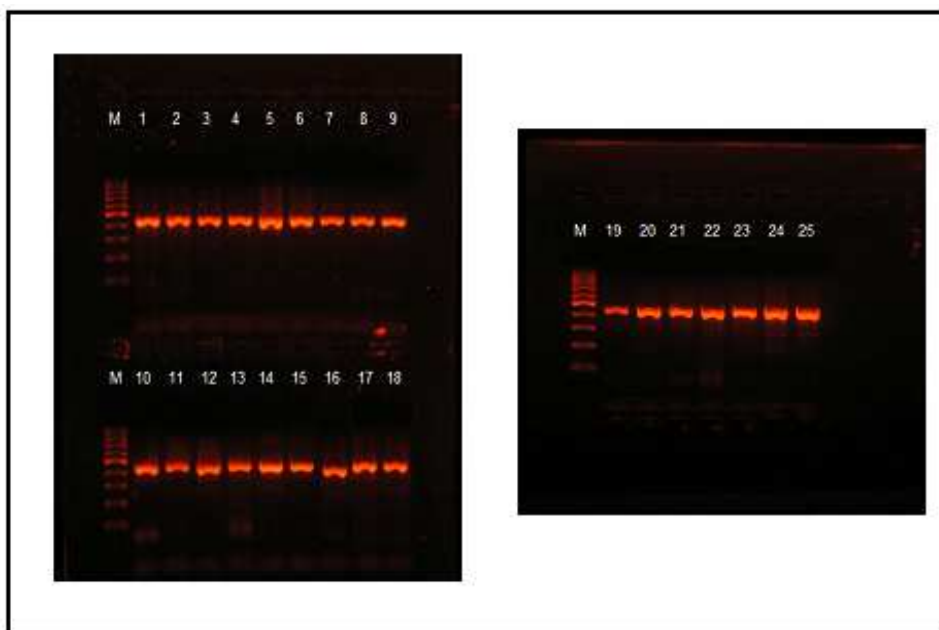
– velikost PCR fragmentů = 402 bp, M = 100 bp velikostní marker

Obr. 23. Kontrolní elektroforéza PCR fragmentů systému G3 pacientů číslo 1–25.



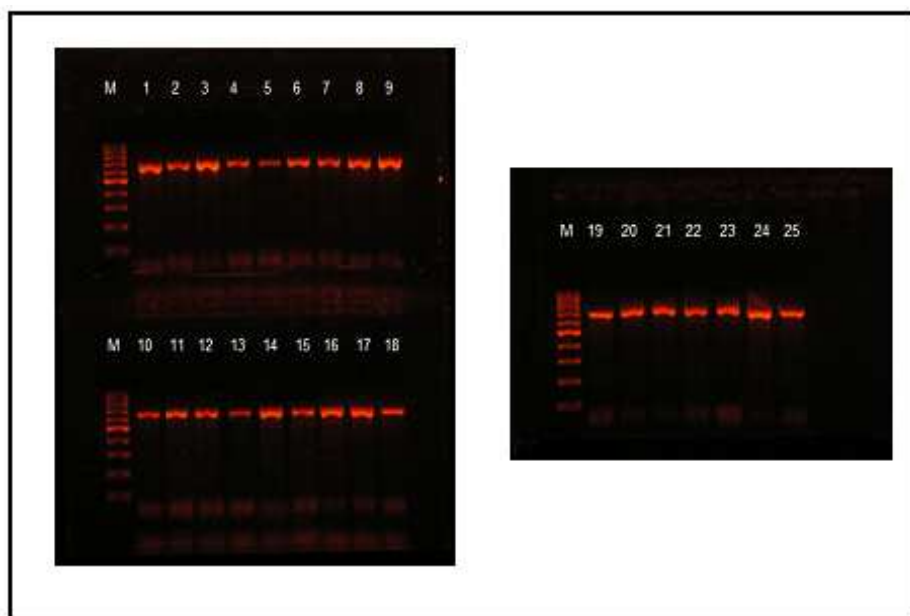
– velikost PCR fragmentů = 662 bp, M = 100 bp velikostní marker

Obr. 24. Kontrolní elektroforéza PCR fragmentů systému G4 pacientů číslo 1–25.



– velikost PCR fragmentů = 426 bp, M = 100 bp velikostní marker

Obr. 25. Kontrolní elektroforéza PCR fragmentů systému G5 pacientů číslo 1–25.



– velikost PCR fragmentů = 645 bp, M = 100 bp velikostní marker

Obr. 26. Kontrolní elektroforéza PCR fragmentů systému G6 pacientů číslo 1–25.

## 6.1 Fenotypy vybraných českých OI pacientů s nalezenými mutacemi

Klinická data byla kompletována dle kritérií používaných v Ambulantním centru pro vady pohybového aparátu v Praze (Mařík, 2001).

### 1) OI typ IA

**Pacient číslo 1 (žena, označení viz. tab. 7)**

**RA:** Rodiče i sourozenci jsou zdraví; manžel a dcera jsou postiženi syndromem Charcot-Marie-Tooth v kombinaci s diabetickou neuropatií; dcera dále trpí slabostí dolních a horních končetin, svalovou atrofií, křečemi a parestézií dolních končetin.

**OA:** Pacientka se narodila v termínu, záhlavím, porod byl spontánní, 2840g/47cm. Poporodní adaptace dobrá, prodělala novorozeneckou žloutenku. OI byla diagnostikována již v dětství – od 2 let utrpěla opakované fraktury hlavně dolních končetin, od 15 let patrná hyperextenze. Předčasně ztratila dentici ve 20 letech, po 40. roce nastal rozvoj nedoslýchavosti.

Pacientka má namodralé skléry a trpí nedoslýchavostí (horší v levém uchu). V mládí u ní byla diagnostikována Dentinogenesis imperfecta, jejímž následkem byla předčasná ztráta druhé dentice (ve 20 letech můstek horní i dolní čelisti). U pacientky je patrná hypermobilita kloubů – hlavně levého kolenního kloubu. Pohyblivost Th a L páteře je mírně omezena, C páteř bez omezení. Chůze je kolébavá s napadáním na LDK. Pacientka trpí bolestmi zad při dlouhém stání a bolestmi nohou při zátěži. Pacientka má krátký trup, zkrácené kosti DK, širokou mezeru mezi palcem a ostatními prsty DK. Rotace kyčlí a pohyblivost páteře (flexe a extenze) je omezená.

Od 2 let utrpěla opakované fraktury (přibližně 20), a to zejména dolních končetin – kosti bérce, kost stehenní. Dvakrát prodělala zlomeninu distálního konce kosti vřetenní. K posledním zlomeninám došlo v roce 1974 – L kost stehenní a suprakondylární fraktura P kosti stehenní.

Pacientka trpí mírnou skoliózou páteře (Th – vybočení doprava, L – vybočení mírně doleva). Obratle dolní Th a L páteře jsou bikonkávní – tzv. „rybí“ obratle. Dolní třetina kostí bérce a pravý femur vykazují mírnou asymetrii a anteriorní vybočení – šavlovitá deformace. Distální konce kostí bérce a paty jsou valgózní, krčky kostí stehenních varózní.

Poslední antropologické vyšetření probanda proběhlo ve věku 49 let – výška vestoje bez podložení 135,5 cm, s podložním o 2,5 cm vpravo 137 cm, výška vsedě 73,5 cm, váha 47 kg. Obvod hlavy 55,5 cm, hrudníku 97 cm, obvod pravé paže 27,5 cm, levé paže 27,0 cm. Rozpětí horních končetin dosahuje 159,5 cm. Obvod pravého bérce je 27 cm, obvod levého bérce je o 2 cm menší, tedy 25 cm. Držení těla pacienta je dobré, páteř se mírně vybočuje doprava. Flexe a extenze páteře je plynule omezená. Pacientka má dále omezenou rotaci

kyčlí, a to vnitřní i zevní. Vnitřní rotace v P kyčelním kloubu je omezena do 10°, v L kyčelním kloubu do 30°. Zevní rotace je u obou kyčelních kloubů omezena do 40°. Omezena je též zevní torze bérců, a to oboustranně na 15–20°. Podogramy odhalily *pedes plani* vlevo II. stupně, vpravo III. stupně.

Denzitometrické vyšetření odhalilo nehomogenní BMD v oblasti L páteře – vyšší v L1 (snížené tělo obratle), oblast L2–L4 odpovídá pásmu osteoporózy. Proximální oblast L kosti stehenní odpovídá pásmu osteopenie, BMD pánve odpovídá pásmu osteoporózy.

U pacientky byla zároveň nalezena mutace vedoucí v *Gilbertův syndrom* – TTA/TTA, a dále *trombofilní mutace v genu MTHFR* (C677T, A1298C heterozygotní).

Biochemické vyšetření z roku 2009 prokázalo mírně zvýšenou hladinu cholesterolu – 5,4 mmol/l (norma 3,6–5,2), ostatní základní biochemické parametry krevního séra byly v mezích referenčních hodnot. Hodnoty markerů kostního obratu byly v normě.

Medikamentózní léčba byla zahájena v roce 2000, kdy bylo pacientce předepsáno užívání léků *Tridin* a *Fosavance*. V roce 2007 byla zahájena léčba *Vigantolem* a léčba osteoporózy lékem *Fosamax*.

V roce 2007 podstoupila operaci L kosti stehenní, kdy byl pacientce do kosti zaveden Küntscherův hřeb.

Pacientka zároveň používá stabilizační ortézu L kolenního kloubu, francouzské hole, vozíček a ortopedické vložky do bot.

## 2) OI typ IA

### Pacient číslo 2 (muž, označení viz. tab. 7)

**RA:** Matka a sourozenci probanda (2 bratři) jsou zdraví, otec zemřel na plicní embolii ve věku 55 let. Strýc A zemřel ve věku 52 let na IM, strýc B trpěl poruchou hltanu – zemřel ve věku 42 let na následky karcinomu jícnu.

**OA:** Pacient se narodil z 3. gravidity – porod byl v termínu, záhlavím, 2800g/50cm; ve dvou letech podstoupil operaci pupeční kýly. Od dětství prodělal opakované zlomeniny HK i DK. U probanda byla objevena čerstvá AD mutace genu COL1A1. Pacient trpí občasnými bolestmi Th páteře a za krkem.

Pacient má modré skléry, trpí oboustrannou nedoslýchavostí (zhoršený převod hlubokých a středních frekvencí) a tinnitem (= pískání v uších). Pokožka je sušší, ale bez ekzému. Na obličeji, krku a horní části hrudníku se vyskytují četné lentiginosy. Na loketních kloubech je patrný sklon k tvorbě koloidních jizev (následek úrazu).

První zlomenina byla zaznamenána ve věku 2 let (kosti bérce). Ve věku 9 let prodělal frakturu Th obratlů. O dva roky později utrpěl zlomeninu L a P kosti loketní a v 15 letech zlomeninu 2. metakarpu PHK. K poslední zlomenině došlo v roce 2007 – abrupce dorsální aponouerózy 5. prstu L ruky.

Pacient má výrazně deformovanou Th páteř – napřímenou hrudní kyfosu, oploštělou bederní lordosu. Th páteř zároveň vybočuje mírně doprava, L páteř mírně doleva. Z RTG vyšetření byla zjištěna platyspondylie Th obratlů, a to zejména Th 7 a Th 9. Dále můžeme u pacienta zaznamenat deformaci malíku PHK (pooperační následek), mírné zakřivení diafýz kostí stehenních a holenních a zkrácení 4. a 5. prstů nohou. Kolenní klouby jsou valgózní s blokádami.

Pacient byl ve věku 19 let vysoký 164 cm (výška vsedě 85,5 cm) a vážil 54 kg. Rozpětí horních končetin bylo 160 cm. Držení těla probanda je vadné. Klouby vykazují hypermobilitu. Th a L oblast páteře je omezená ve flexi, krční páteř v rotaci a úklonech o cca 10°. Pohyb metakarpofalangeálního kloubu 2. prstu PHK je omezen na 60°. Vnitřní rotace kyčlí je symetrická do 50°, zevní rotace je v P kyčelním kloubu omezena do 30°, v L kyčelním kloubu do 45°. Zevní torze bérce je do 20°. Intermaleolární vzdálenost je ve stoje 2 cm, vleže 0 cm. PDK je kratší o 0,5 cm, obě nohy jsou ploché. Pacient má dále vysoké patro, širší krk, asymetrická ramena, prominující a odstávající lopatky (levá lopatka situována výše než pravá), úzký hrudník se svisle postavenými tenkými žebry. Páneve je postavena horizontálně.

U pacienta byla zjištěna osteoporóza L ruky v oblasti metafýz. BMD páteře je nižší oproti kalendářnímu věku (nejnižší v L3 – pásmo osteopenie). Také proximální konec L kosti stehenní spadá do pásma osteopenie. Prevertebrální svalstvo je ochablé, svalstvo HK i DK vykazují lehkou hypotrofii. Obsah minerálů je snížený oproti normě pro daný věk a pohlaví.

Poslední biochemické vyšetření a vyšetření markerů kostního metabolismu proběhlo v roce 2009. Byla zjištěna snížená hladina 25-hydroxyvitaminu D v krevním séru (32,7 nmol/l; pozn.: referenční hodnota = 47,7–144 nmol/l), zvýšená hladina kreatininu v moči (13,29 mmol/l; pozn.: ref. hodnota = 3–12 mmol/l) a snížená mineralizace skeletu.

Medikamentózní léčba byla zahájena v roce 2002. Do roku 2005 pacient užíval *Caltrate* – později nahrazen lékem *Osteocare*. Dále byl léčen bisfosfonáty *Fossamax*, od roku 2008 *Fosavance* a od roku 2010 *Bonviva*. Zároveň užívá *vitamin D*, *kalcium*, *Biomín H*, *Vigantol*, *Ascorutin* a *Acidum folicum*.

První operaci podstoupil v roce 1992 – operace pupeční kýly. V roce 2003 následovala operace fraktury lokte. Ve věku 14 let byl pacientovi operativně vyříznut fibrolipom L kosti pažní (následek příčné zlomeniny v horní třetině diafýzy). V roce 2005 byla pacientovi provedena tympanotomie L ucha s interpozicí chrupavkou (mezi kovadlinkou a třmínkem) a operace 2. metakarpu PHK – zavedení Kirschnerova drátu. Poslední zákrok byl uskutečněn v roce 2007, kdy byla pacientovi sešita dorzální aponeuróza 5. prstu L ruky.

Pacient nosí speciální ortopedické vložky a podstupuje kompletní lázeňskou léčbu.

### 3) OI typ IA

#### Pacient číslo 3 (muž, označení viz. tab. 7)

**RA:** Příbuzní nemají příznaky OI. Matka je postižena srdeční vadou (*Foramen ovale apertum*) a prodělala retrobulbární neuritidu (zánět očního nervu) – podezření na roztroušenou sklerózu.

**OA:** Pacient narozen v termínu z 1. gravidity, 3800g/52cm. Od raného dětství trpí bolestmi kolen a bérců – především v noci. OI byla diagnostikována ve věku 2 let.

Skléry jsou namodralé. Pacient je astenický s mírně kratším trupem. Držení těla je chabé. Trpí hyperextenzí loketních kloubů a zvýšenou mobilitou drobných kloubů rukou a páteře. Výška probanda byla ve věku 7 let 124 cm, vsedě 64 cm. Vážil 24 kg. Obvod hlavy je 51,5 cm, hrudníku 57 cm, L i P paže 17 cm. Paty jsou valgózní – mírně vybočují cca do 5°, osy DK a přednoží jsou fyziologická. Pacient má *pedes excavati* II. stupně bilaterálně. Vnitřní rotace L i P kyčle dosahuje 50°, zevní rotace 45° bilaterálně. Zevní torze bérců je do 15°.

První zlomeninu utrpěl ve věku dvou let – subperiostální fraktura distální metafýzy L kosti vřetení. V témže roce prodělal frakturu distální metafýzy P kosti holenní. Poslední zlomenina byla zaznamenána v roce 2000, kdy pacient utrpěl dislokační frakturu diafýzy levé kosti holenní.

U pacienta nebyly doposud zaznamenány žádné deformace kostí.

Z rozborů krve pacienta byly zjištěny zvýšené hladiny markerů kostního obratu – konkrétně osteokalcinu (syntéza) a ACP (resorpce).

Pacient užívá *Vitakalcin* a *Vigantol*, byla mu doporučena racionální strava a dostatek mléčných výrobků.

### 4) OI typ IA

#### Pacient číslo 4 (žena, označení viz. tab. 7)

**RA:** V rodině postižení OI otec, sourozenci – bratr a sestra, a babička ze strany otce probanda. Otec a sestra jsou postiženi typem I A, u bratra byla diagnostikována OI typu IV A.

– Otec, narozen 1955, sledován v Ambulantním centru. Naposledy byl vyšetřen v roce 2007. Pacient prodělal opakované mikrofraktury páteře, má omezenou hybnost L a L-S páteře při flexi a extenzi, trpí bolestmi bederní páteře. Užívá *Fosamax* a *Voltaren rapid*. Nosí bederní podporu. Otcí byla doporučena rehabilitace a kompletní lázeňská léčba.

– Bratr, narozen 1988, sledován v Ambulantním centru od roku 1998. Poslední vyšetření se uskutečnilo v roce 2009. Pacient trpí bolestmi zad a kolen, vykazuje deformity skeletu – skolióza (omezení extenze Th a flexe Th-L páteře, snížená hybnost C páteře), deformace P kosti holenní (chirurgicky vložena výztuž), PDK výrazně kratší (cca o 5,5 cm), P kolenní kloub hypervalgózní – operativní vyrovnání v roce 2002. Svalstvo HK i DK je hypotrofické.



Pacient je astenický, vysoký 155 cm (s podložením PDK o 5 cm) – vsedě 79,5 cm, a váží 45 kg. Rozpětí HK dosahuje 166 cm. Obvod hlavy je 57 cm, hrudníku 80 cm, P paže 23 cm, L paže 24 cm a bérců 27,5 cm. Vnitřní rotace kyčlí je omezená do 20°, zevní rotace dosahuje 60°. Torze bérců je v normě – 15–20°. Z podogramů bylo zjištěno oboustranné *pedes plani* II. stupně.

Při chůzi používá francouzské hole a odlehčuje PDK, která je kratší a více hypotrofická. Držení těla je chabé. Pacient nosí speciální ortopedickou obuv a používá ortopedické vložky. Užívá léky *Caltrate*, *Vigantol*, *Ibandronát*, *kalcitonin*, *Fosamax* a *Vitakalcin*.

– Sestra, narozena 1991, je v Ambulantním centru sledována od roku 1998. Naposledy vyšetřena v roce 2007. Horní segment těla je mírně kratší. Držení těla je stejně jako u bratra chabé. Pacientka nevykazuje deformace skeletu – pouze mírná valgozita pat (do 5°) a kolen ve stoje. Ve věku 16 let dosahovala výšky 157,5 cm, vážila 42,5 kg. Obvod hlavy je 56 cm, hrudníku 78 cm, L i P paže 21 cm. Rozpětí paží dosahuje 160 cm. Flexe páteře je mírně omezena v Th-L oblasti. Vnitřní rotace kyčlí dosahuje 40°, zevní rotace 60°. Zevní torze bérců je přibližně 15°. U pacientky bylo diagnostikováno *pedes plani* I. stupně bilaterálně.

Z biochemických vyšetření je u této pacientky patrna zvýšená hladina osteokalcinu a ALP (kostní izoenzym).

Pacientka dříve nosila reklináčnickou bandáž. Používá speciální vložky do bot pro korekci příčné klenby. Užívá *Vigantol*, *Caltrate Plus*, *Vitakalcin*, *vitamin D*, *Osteogenon*, *B komplex* a *kalcium*.

**OA:** Pacientka se narodila v termínu z první gravidity, při porodu prodělala zlomeninu L kosti stehenní. OI byla diagnostikována ve věku 13 let.

Pacientka vykazuje podobné znaky jako její výše uvedená sestra. Hlava pacientky je ultrabrachycefální s širokým čelem. Trup je zkrácený, ramena jsou užší, bicristální šířka pánve je širší. Pacientka má osteoporózu, skoliózu (vybočení Th oblasti doleva, Th-L oblasti doprava a L oblasti doleva) a jsou u ní patrné deformace kostí ruky, jednostranně i kostí DK (např. valgozita pat). První zlomeninu měla při narození (L femur), druhou prodělala v 10 letech (zlomenina P předloktí) a poslední zaznamenanou frakturu utrpěla o dva roky později (olecranon ulnae – léčena chirurgicky). Pacientka užívá léky *kalcitonin*, *vitamin D* a *Caltrate Plus*, nosí speciální ortopedické vložky (korekce příčné klenby).

## 5) OI typ IVB

**Pacient číslo 5 (muž, označení viz. tab. 7)**

**RA:** Rodiče i sourozenec (bratr) pacienta jsou zdraví. Babička z matčiny strany zemřela na karcinom prsu.

**OA:** Pacient narozen v termínu, 3400g/50cm. Ve věku 14 let byl hospitalizován v nemocnici pro bolesti bederní páteře – podezření na dg. *Morbus Scheuermann*. OI byla diagnostikována v 15 letech, jedná se o čerstvou mutaci.

První zlomenina byla zaznamenána ve 14 letech, kdy byl hospitalizován pro bolesti L páteře. Jednalo se o frakturu Th8 – odhalena scintigrafií skeletu. Rentgeny dále odhalily klínové deformity 7.–11. Th obratle.

Proband trpí lehkou skoliózou Th a L segmentu, mírnou valgozitou kolenních kloubů a má sníženou podélnou nožní klenbu. Tělo je lehce disproportionální – relativně krátký trup, delší DK a kratší HK. Rentgenovým vyšetřením bylo zjištěno zároveň zesílení a prodloužení krčků, deformace hlavic (zejména L) a drobné nerostoucí exostózy na distálních metafýzách obou kostí stehenních. Páneve je zešikmena mírně doleva. Pacient má zkrácené hamstringy (funkce: flexe kolene, extenze kyčle) bilaterálně, následkem je omezený předklon páteře (prsty 40 cm od země).

Výška pacienta je mírně podprůměrná – 171,3 cm (-0,8 SD), výška vsedě je 86,4 cm. Váží 55,9 kg (opět podprůměr). Rozpětí HK dosahuje 166,5 cm. Obvod hlavy pacienta je 56 cm, hrudníku 82,5 cm, paží 25 cm a bérců 36 cm. Vnitřní rotace kyčlí je omezena do 20°, zevní rotace dosahuje 60°. Pacient trpí *pedes plani* I.–II. stupně.

Z densitometrického vyšetření, provedeného v roce 2008, byl zjištěn snížený celotělový obsah minerálů vzhledem k danému kalendářnímu věku.

Vyšetření markerů kostního metabolismu odhalilo zvýšenou hladinu osteokalcinu a kostní ALP.

Pacient užívá lék *Vigantol*, byla mu doporučena konzumace dostatku mléka a mléčných výrobků.

## 6) OI typ III

### Pacient číslo 6 (žena, označení viz. tab. 7)

**RA:** V rodině se nevyskytují zlomeniny, matka má skoliózu – nosí korzet, a prodělala dva potraty (1. a 3. gravidita).

**OA:** Pacientka se narodila v termínu z 2. gravidity, porod byl proveden císařským řezem, po porodu byla kříšena. Porodní váha byla na dolní hranici – 2450 g, porodní délka 45 cm. Po porodu podstoupila oxygenoterapii. Pacientka prodělala kojeneckou žloutenku a plané neštovice. První fraktura byla prodělána již při narození, a to fraktura obou dolních končetin. Chůze byla schopna až v šesti letech v ortézách a s přidržením. Od jedenácti let není schopná chůze – pohybuje se ležením po zemi. OI byla diagnostikována v 1. roce života. Jedná se o čerstvou AD mutaci.

Pacientka má modrý kolorit sklér, krátký krk, bledou kůži z výraznou žilní kresbou, špatnou dentici (z RTG snímků dolní čelisti viditelné zúžení až vymizení zubních kanálků,

porucha skloviny a dentinu zejména na horních řezácích, jantarový kolorit korunek) – ale bez DI, naznačený exoftalmus, deformované kosti – deformovaná lebka, trigonocefalie a hyperbrachycefalie, wormianské kosti v parietální a okcipitální krajině lebky, šavlovité deformity kostí pažních a holenních, zakřivené pravé předloktí, zkrácené a anterolaterálně zakřivené kosti stehenní, ventrodorzálně rozšířený hrudník s deformovanými žebry, pectus carinatum a skoliózu (vybočení Th páteře doleva, Th-L páteře doprava). Rentgenologické vyšetření dále odhalilo mírnou platyspondylii dolní části Th páteře a naopak vyšší těla L obratlů, bikonkávní tvar hrudních a bederních obratlů a varozitu distálního konce P kosti stehenní. V oblasti kolenních kloubů je na RTG snímcích zobrazena nepravidelná kostní struktura metafýz a epifýz vzhledu popcornu či včelí plástve, která je charakteristickým znakem tohoto typu onemocnění. LDK je o 10 cm kratší než PDK. Pacientka trpí bolestmi zad.

První zlomeniny prodělala již při narození – fraktura obou DK. Z rentgenových snímků byly patrné zhojené zlomeniny žeber a levého klíčku prodělané v prenatálním období. Do 2 let utrpěla frakturu diafýz P a L kosti stehenní a levé tibie, v 6 letech frakturu levého a následně pravého bérce, infrakci pravého klíčku. V 8 letech měla zlomeninu levé kosti stehenní v distální třetině a zlomeninu diafýzy pravé kosti pažní. Ve věku 11 let prodělala frakturu levé kosti pažní a pravého bérce, ve 13 letech frakturu distální třetiny levé kosti stehenní. V 15 letech utrpěla frakturu diafýzy levé kosti loketní, infrakci pravé lopatky a příčnou frakturu v distální třetině levé kosti holenní a lýtkové bez dislokace. Poslední zlomeninu utrpěla v roce 2009 při pádu z vozíčku – nedislokovaná fraktura klíčku vpravo v mediální třetině.

V 15 letech dosahovala pacientka tělesné výšky 80 cm dle kratší LDK, 90 cm dle PDK a výšky vsedě 52 cm (-11,6 SD). SD-skóre subischialní délky dosahovalo pro LDK -12,5 SD, pro PDK na -9,9 SD.

V 18 letech pacientka měřila 90 cm. Výška vsedě činila opět 52 cm. Obvod hlavy byl 57 cm (0,8 SD) – hyperbrachycefalie, hrudníku 84 cm. Obvod L paže činil 25 cm, P paže 24 cm. Rozpětí HK dosahovalo 116 cm.

Denzitometrické vyšetření provedené ve věku 18 let odhalilo snížený celotělový obsah minerálů. Rozložení denzity kolem páteře je nehomogenní. Pacientka je postižena vrozenou sekundární osteoporózou.

Z vyšetření markerů kostního obratu, provedeného v roce 2009, je patrna mírně zvýšená hladina osteokalcinu.

Molekulárně-genetické vyšetření odhalilo mimo mutací genu COL1A1 dále *trombofilní mutaci v genu MTHFR (A1298C, heterozygotní)*.

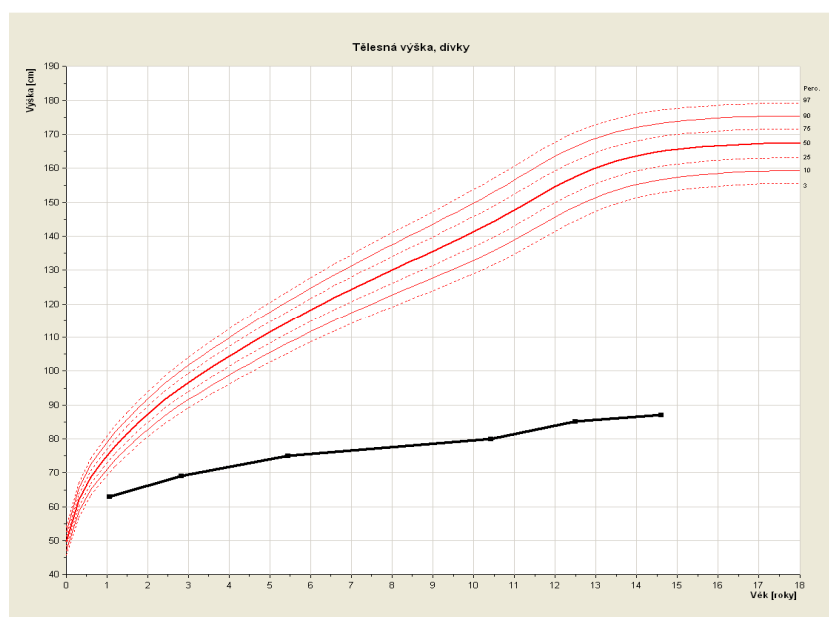
Pacientka je medikamentózně léčena od 7 let *kalcitoninem*. Od 14 let užívala bisfosfonát *Fosamax*, který byl v roce 2008 nahrazen bisfosfonátem *Fosavance* (výsledkem je

mineralizace těl obratlů). Léčba je doplněna o užívání kalcia a vitamínu D3. Od roku 2008 užívá dále lék *Provera* (derivát progesteronu (<http://www.lekarna.cz/provera-250mg-tbl-40x250mg-bli/>)).

Ortotická léčba zahrnovala od 6 do 11 let Sarmientovy ortézy na DK a ortézu na levou paži od 10 let. V sedmi letech začala používat mechanický vozík. V roce 2008 byl pacientce předepsán korzet, který je zhotoven na užívání pouze v poloze vleže.

Ve 2 letech podstoupila pacientka chirurgickou fixaci levé kosti stehenní a holenní Kirschnerovými dráty – extrakce z kosti holenní ve 4 letech. Ve věku 4 let byla provedena korekční osteotomie pravé kosti stehenní a zkrácení Kirschnerova drátu v levé kosti stehenní. V 5 letech byl extrahován Kirschnerův drát z levé kosti stehenní a dále byla provedena segmentární osteotomie a nitrodřeňová fixace Kirschnerovými dráty pravé kosti loketní a vřetenní. V 6 letech byla pacientce operována LDK dvakrát a PHK, v 7 letech následovala reoperace pravé kosti stehenní (extrakce 3 Kirschnerových drátů, segmentární osteotomie pravé kosti stehenní s nitrodřeňovou fixací). V 8 letech podstoupila frakturu a repozici pravé kosti pažní a stehenní, v 11 letech segmentární a klínovitou osteotomii pravé kosti loketní a vřetenní spojenou s transfixací Kirschnerovým drátem a zkrácení Kirschnerova drátu kosti loketní. Poslední chirurgický zákrok byl proveden v roce 2004 (věk 15 let) – extrakce Kirschnerova drátu z pravé kosti loketní.

Následující obrázek znázorňuje graf vývoje tělesné výšky pacientky číslo 6 ve věkovém období 1–15 let. Ve sledovaném období bylo provedeno 6 měření tělesné výšky jedince. Z grafu je patrné, že pacientka dosahovala v průběhu těchto 14 let podprůměrné tělesné výšky. Tento znak je typický pro všechny jedince postižené OI typem III.



Obr. 27. Percentilový graf pro vývoj tělesné výšky pacienta číslo 6.

(Převzato z: Maříková-Hudáková, 2007)

Fenotypový popis pacienta číslo 21 nebylo možné uvést, neboť tento pacient není sledován Ambulantním centrem pro vady pohybového aparátu v Praze a pacient neposkytl souhlas pro uvedení klinických dat v této studii.

Následující tabulka uvádí shrnutí typických klinických znaků zkoumaných jedinců, u nichž byla objevena mutace v analyzované oblasti COL1A1 genu.

Číslo pacienta	Forma OI	Barva sklér	DI	Nedoslýchavost	Fraktury při narození	Počet zaznamenaných fraktur	Deformity
1	IA	namodralé	+	+	–	20	+
2	IA	modré	–	+	–	5	+
3	IA	namodralé	–	–	–	3	–
4	IA	bílé	–	–	+	3	+
5	IVB	bílé	+	–	–	1	+
6	III	modré	–	–	+	18	+
21	IA	x	x	x	x	x	x

– → absence daného znaku

+ → přítomnost daného znaku

X → data nebyla k dispozici

Tab. 7. Klinická manifestace OI u pacientů s identifikovanou mutací.

## 6.2 Výsledky molekulárně-genetické analýzy systémů G1–G6 COL1A1 genu

Mutace byly objeveny u sedmi (tři ženy, čtyři muži) z pětadvaceti vyšetřovaných pacientů. Jedná se o mutace jak v kódujících sekvencích (tab. 7), tak v intronových oblastech (tab. 8). Ve všech případech byly nalezeny jednonukleotidové záměny.

Číslo kodónů zaměněných aminokyselin odpovídají pozici dané aminokyseliny v oblasti helixu (vymezené exony 6–49), neboť pouze tato oblast kóduje výsledný COL1A1 protein. Pozice polymorfismu (bp) odpovídá umístění zaměněného nukleotidu v genu COL1A1.

	Číslo pacienta	Forma OI	Pohlaví	Věk (rok, měsíc)	Záměna dNTP	Záměna amk	Reference
Exon 31	4	IA	žena	27 r. 1 m.	CGA>TGA	Arg519STOP	Willing et al. 1996
	5	IVB	muž	17 r. 10 m.	GGT>TGT	Gly523Cys	Sarafova et al. 1998
	6	III	žena	21 r. 1 m.	GGC>TGC	Gly526Cys	Starman et al.1989
Exon 33	1	IA	žena	50 r. 1 m.	ACT>ACC	Thr588Thr	—
	2	IA	muž	20 r. 1 m.	ACT>ACC	Thr588Thr	—
	3	IA	muž	12 r. 7 m.	ACT>ACC	Thr588Thr	—
	21	IA	muž	11 r. 11 m.	ACT>ACC	Thr588Thr	—

– Kodóny aminokyselin jsou číslovány pouze pro oblast helixu alpha řetězců.

– symbol „—“ → mutace nebyla doposud popsána v odborné studii

Tab. 8. Přehled mutací v kódujících oblastech genu COL1A1.

Číslo pacienta	Forma OI	Pohlaví	Věk (rok, měsíc)	Číslo intronu	Pozice polymorfismu v genu	Záměna nukleotidu	Reference
1	IA	žena	50 r. 1 m.	32	15 375 bp	T>C	—
				39	17 332 bp	C>G	—
2	IA	muž	20 r. 1 m.	32	15 375 bp	T>C	—
				39	17 332 bp	C>G	—
21	IA	muž	11 r. 11 m.	32	15 375 bp	T>C	—
				39	17 332 bp	C>G	—

– Pozice polymorfismu odpovídá pozici v genu COL1A1.

– symbol „—“ → mutace nebyla doposud popsána v odborné studii

Tab. 9. Přehled polymorfismů v nekódujících oblastech – intronech 32 a 39, genu COL1A1.

Mutace kódujících sekvencí byly objeveny pouze v exonech 31 (3 pacienti) a 33 (4 pacienti).

V exonu 31 byly objeveny celkem tři odlišné mutace, které již byly v odborné literatuře popsány dříve. Pouze jedna z těchto mutací, konkrétně u pacienta číslo 4, vede k vytvoření STOP kodónu. Jedná se o transici C>T na pozici 14 814 bp COL1A1 genu, měnící kodón argininu 519 na STOP kodón (Arg519STOP) (obr. 28).

---

ggcgagagaggtttcctggcgagcgtggtgtgcaaggtccccctggtcctgctggtccc**C>T**gaggggccaacggtgctccc  
gcaacgatggtgctaag

---

– tučně znázorněná oblast představuje kodón 519 pro arginin

– červeně označené nukleotidy znázorňují C>T substituci

Obr. 28. Mutace COL1A1 genu v kodónu 519 pro arginin vedoucí v STOP kodón (Arg519STOP), exon 31, pacient číslo 4.

Zbylé dvě mutace představují substituce guaninu thyminem na pozici 14 825 bp, jež má za následek záměnu glycinu cysteinem v kodónu 523 (pacient číslo 5) (obr. 29), a substituce guaninu thyminem na pozici 14 835 bp vedoucí v substituci glycinu 526 cysteinem (pacient číslo 6) (obr. 30).

---

```
ggcgagagaggtttccctggcgagcgtggtgtgcaagggtccccctggtcctgctggtccccgaggggccaacG>Tgtgctcccg  
gcaacgatggtgctaag
```

---

- tučně znázorněná oblast představuje kodón 523 pro glycin
- červeně označené nukleotidy znázorňují G>T substituci

Obr. 29. Mutace COL1A1 genu v kodónu 523 – Gly523Cys, exon 31, pacient číslo 5.

---

```
ggcgagagaggtttccctggcgagcgtggtgtgcaagggtccccctggtcctgctggtccccgaggggccaacggtgctcccG>T  
gcaacgatggtgctaag
```

---

- tučně znázorněná oblast představuje kodón 526 pro glycin
- červeně označené nukleotidy znázorňují G>T substituci

Obr. 30. Mutace COL1A1 genu v kodónu 526 – Gly526Cys, exon 31, pacient číslo 6.

V exonu 33 se ve všech případech jedná o *silent* (= tichou) mutaci v kodónu 588 pro threonin (obr. 31). Substituce byla identifikována u pacientů číslo 1 (obr. 32), 2 (obr. 33) a 3 (obr. 34).

---

```
ggtgatgctggtcccaaaggtgctgatggctctcctggcaaagatggcgtccgtggtctgacT>Cggccccattggtcctcctggc  
cctgctggtgccctggtgacaag
```

---

- tučně znázorněná oblast představuje kodón 588 pro threonin
- červeně označené nukleotidy znázorňují T>C substituci

Obr. 31. Silent mutace v kodónu 588 pro threonin (Thr588Thr), exon 33.



– červeně zakroužkované oblasti označují kodón 588 se substitucí ACT→ACC

Obr. 32. Silent mutace v kodónu 588 pro threonin (Thr588Thr), exon 33, pacient číslo 1.



– červeně zakroužkované oblasti označují kodón 588 se substitucí ACT→ACC

Obr. 33. Silent mutace v kodónu 588 pro threonin (Thr588Thr), exon 33, pacient číslo 2.





– červeně zakroužkované oblasti označují kodón 588 se substitucí ACT→ACC

Obr. 34. Silent mutace v kodónu 588 pro threonin (Thr588Thr), exon 33, pacient číslo 3.

Polymorfismy nekódujících oblastí byly objeveny u tří z výše uvedených sedmi pacientů – pacienti číslo 1, 2 a 21. Jedná se o dva typy substitucí – I32T15375C (obr. 35) a I39C17332G (obr. 37), které se vyskytují u každého z těchto tří pacientů. Pod jednotlivými obrázky sekvencí mutovaných intronů jsou umístěny ilustrativní obrázky sekvenogramů těchto intronů pacienta číslo 1 (obr. 36 – I32T15375C, obr. 38 – I39C17332G).

---

```

gtaagttcaacctccccctcccctgagccctacatggctcccatctctgctgctttgaatctctcagcatctctccttctctctgggatctg
tcctcttctcgttaatcctcccT>Ccttcccctttcccctctggcctttttgctgatgaatctctccctgtggtccaggcccatctatcccc
atgggttaccatggtgatgagaggtgggggcatctccttggtggaggctccctattcatcccgctacacaagtcaggggctcttaac
ctcagttccacctgagtctccaggcaggcacccttttctgaaagaatctttgagtccttgcccaggtggaggcagggcagagctg
cagagggcctctcaggaaaccagacacaagcagaacactataggtcacctcctgccccactggaatctcaagcttatcca
tgtcttag

```

---

– červeně označené nukleotidy znázorňují T>C substituci

Obr. 35. T>C transice na pozici 15 375 v intronu 32 genu COL1A1 pacientů číslo 1, 2 a 21.



– červeně zakroužkovaná oblast označuje pozici T>C substituce

Obr. 36. Polymorfismus I32T15375C v intronu 32 genu COL1A1 pacienta číslo 1.

---

gtaagtgccagctcagatctctgcagctccggaggtgtgcagagctggggaggggtccctgtgctgctC>Gtctggcacctcacc  
cctgtttgcctcccaaag

---

– červeně označené nukleotidy znázorňují C>G substituci

Obr. 37. Substituce cysteinu guaninem na pozici 17 332 v intronu 39 genu COL1A1 pacientů číslo 1, 2 a 21.



– červeně zakroužkovaná oblast označuje pozici C>G substituce

Obr. 38. Polymorfismus I39C17332G v intronu 39 genu COL1A1 pacienta číslo 1.

## 7. DISKUZE

Ačkoliv fenotyp jedinců s klinickými znaky Osteogenesis imperfecta byl poprvé popsán již v roce 1788 Ekmanem (Sillence, 1979), k rozvoji znalostí o molekulární podstatě OI došlo až o dvě století později, v osmdesátých letech 20. století, kdy byly poprvé identifikovány mutace genů COL1A1 a COL1A2 jako příčina vzniku OI (Barsch a Byers, 1981).

V této studii byla použita metoda PCR pro genetickou analýzu tzv. MLBR genu COL1A1 – konkrétně exonů 31–40. Mutace byly odhaleny u sedmi z pětadvaceti pacientů, a to v exonech 31 a 33, a dále v intronech 32 a 39.

V exonu 31 byly objeveny celkem tři odlišné mutace. Pouze jedna z těchto mutací, konkrétně u pacienta číslo 4, vede k vytvoření STOP kodónu (**Arg519STOP**). Výsledkem mutace je tvorba zkrácených forem alpha řetězců kolagenu typ I. Takto postižené řetězce jsou zadržovány a degradovány v buňkách. To má za následek produkci sníženého množství molekul kolagenu typ I, čímž je snížena pevnost a pružnost kostí. Mutace se tedy u pacientů projevuje zvýšenou četností zlomenin. Pacient číslo 4 je postižen OI typem IA. Jedinec utrpěl první zlomeninu již během porodu (důsledek produkce sníženého množství kolagenu typ I), má hypermobilní klouby, deformace končetin a osteoporózu. Od ostatních studovaných pacientů se stejnou formou onemocnění se odlišuje tvarem hlavy – ultrabrachycefalie, a vysokým čelem.

Mutace Arg519STOP byla poprvé popsána v roce 1996 (Willing et al.). V této studii však nebyl uveden ani etnický původ ani klinické znaky studovaných pacientů.

Dále byla tato transice popsána u čínských jedinců ve studii z roku 2007. Liu et al. zde analyzovali gen COL1A1 v celém jeho rozsahu u sedmnácti členů pěti-generační rodiny, kteří byli postiženi OI typem I. Všichni jedinci utrpěli od narození několik zlomenin a měli modré skléry. Kromě kodónu 519 byl tento typ transice (CGA→TGA) odhalen i v dalších exonech (9, 11, 17, 19 a 21) (Liu et al., 2007). Tyto exony nebyly v naší studii analyzovány, tudíž nemůžeme transici CGA→TGA v těchto exonech českých OI pacientů potvrdit. Proto je vhodné zahrnout tyto oblasti genu COL1A1 do dalších studií.

Protože se jedná o mutaci snižující celkové množství molekul kolagenu typ I na poloviční množství, projevuje se tato mutace zvýšenou četností zlomenin. Mutace není vázána na určité etnikum.

Substituce glycinu cysteinem v kodónu 523 (**Gly523Cys**) je lokalizována v oblasti vazby kyanogen bromid (CNBr) peptidů. Následkem této mutace dochází k narušení skládání alpha řetězců do triplehelixu a ke snížení teploty tání (T<sub>m</sub>) molekul kolagenu typ I v důsledku zvýšení posttranslačních modifikací alpha 1 řetězců (hydroxylace lysinu, glykosylace).

Metabolismus postižených molekul může být buněčně specifický. Sarafova et al. – 1998, prokázali, že mutované molekuly kolagenu produkované buňkami fibroblastu vykazují nižší  $T_m$  než molekuly se stejnou bodovou mutací, které jsou syntetizovány buňkami osteoblastu. Modifikované řetězce mohou být zadrženy v buňkách a následně degradovány (Bateman, 1984). Tato studie (Sarafova et al., 1998) neuvádí etnický původ a klinický popis zkoumaných jedinců.

Mutace byla identifikována u pacienta číslo 5 postiženého OI typem IVB, formou s typickým výskytem DI. Pacient vykazuje následující klinické znaky: DI, skolióza, mírné deformace kostí, disproportionálnost těla a ploché nohy. V roce 2001 byla publikována studie (Pallos et al., 2001), v níž byla prokázána korelace mezi DI typ I a genotypem brazilských pacientů s OI IVB. Jedná se o mutaci Gly559Cys v exonu 32. Tato mutace nebyla u námi vyšetřovaného pacienta prokázána. Z toho lze usuzovat, že tento klinický znak je projevem jiné mutace specifické právě pro DI typ I.

Substituce glycinu cysteinem v kodónu 526 (**Gly526Cys**) je jednou z nejběžnějších substitucí vyskytujících se u pacientů postižených třetí formou OI (Sorin et al., 2008). Tato mutace se projevuje progresivními deformacemi po narození postiženého jedince. Jedná se o neletální substituci, neboť se tato mutace nalézá N-terminálně ke kodónu 688 (substituce glycinu směřující k C-terminálnímu konci od kodónu 688 mají za následek letální fenotyp) (Bodian, 2009).

Substituce Gly526Cys byla objevena u pacienta číslo 6 postiženého třetím typem OI. Pacient má deformované kosti, wormianské kosti (lebka), poruchu tvorby dentinu, modré skléry, exoftalmus, předozadně zploštělý hrudník, pectus carinatum a další.

Starman et al. popsal tuto mutaci ve studii z roku 1989 u iráckého probanda. Tento jedinec vykazoval následující znaky: wormianské kosti (lebka), deformace kostí, osteopenie, trojúhelníkový obličej, modré skléry, duhové zabarvení dentinu. První zlomenina byla zaznamenána při porodu.

Při porovnání klinických znaků českého a iráckého pacienta lze vyvodit závěr, že tato mutace má za následek deformity kostní hmoty postižených jedinců.

Kromě substituce cysteinem byla v této oblasti dále popsána záměna glycinu serinem, jejímž výsledkem byl opět OI typ III (Ward et al., 2001).

Z výše uvedených dat lze odvodit, že se tato mutace nevztahuje k určitému etniku.

Všechny tři výše popsané mutace se nacházejí v oblasti genu vázající integriny  $\alpha_1\beta_1$  a  $\alpha_2\beta_1$  (tzv. integrin-binding sites). Tato oblast zahrnuje kodóny 488–541. Integriny jsou transmembránové proteiny zajišťující adhezi mezi extracelulární matrix a buňkou, ale také mezi dvěma sousedícími buňkami. Zároveň plní roli aktivátorů mnoha intracelulárních signálních cest (Hynes, 2002). Mutace Arg519STOP se navíc vyskytuje v místě vázajícím

Hsp47 (Heat shock protein 47) protein během procesu skládání alpha 1 řetězců. Tento protein zajišťuje shromažďování molekul prokolagenu, zadržení strukturálně poškozených molekul kolagenu typ I v lumen endoplazmatického retikula a transport nepostižených molekul COL1A1 proteinu z endoplazmatického retikula do Golgiho aparátu buňky (Tasab et al., 2000). Z toho vyplývá, že jakákoliv substituce aminokyselin v kodónu 519 pro arginin má za následek inkorporaci strukturálně poškozených alpha řetězců do molekul kolagenu typ I. Výskyt abnormálních molekul v kostní tkáni má za následek snížení stability kolagenové molekuly, a tím i pevnosti a pružnosti kostí. V našem případě má stejné následky nonsense mutace produkující zkrácené formy alpha řetězců, které nejsou začleněny do molekul kolagenu a snižují tak celkové množství kolagenu v kostní tkáni.

Z porovnání kodónů 519, 523 a 526 lidského genu COL1A1 (obr. 39) s tímto genem jiných obratlovců je patrné, že všechny kodóny se nalézají ve vysoce konzervativních oblastech exonu 33. Kodón 519 se nalézá na hranici této oblasti. Zároveň se v těchto oblastech vyskytují konkrétní substituované nukleotidy výše uvedených kodónů. Z toho vyplývá, že se jedná o klíčové oblasti genu, jejichž mutace mají negativní vliv na výsledný fenotyp všech organismů uvedených v obr. 39. Substituce jinými aminokyselinami nebyly ve výše uvedených kodónech doposud popsány.

	519			523			526																							
Homo sapiens	C	C	C	C	G	A	G	G	G	G	C	C	A	A	C	G	G	T	G	C	T	C	C	C	G	G	C	A	A	C
Pan troglodytes	C	C	C	C	G	A	G	G	G	G	C	C	A	A	C	G	G	T	G	C	T	C	C	C	G	G	C	A	A	C
Pongo pygmeus	C	C	C	C	G	A	G	G	G	G	C	C	A	A	C	G	G	T	G	C	T	C	C	C	G	G	C	A	A	T
Macaca mulatta	C	C	C	C	G	A	G	G	G	G	C	C	A	A	T	G	G	T	G	C	T	C	C	C	G	G	C	A	A	T
Mus musculus	C	C	C	C	G	A	G	G	A	A	A	C	A	A	T	G	G	T	G	C	C	C	C	C	G	G	C	A	A	C
Rattus norvegicus	C	C	C	C	G	A	G	G	A	A	A	C	A	A	T	G	G	T	G	C	C	C	C	C	G	G	C	A	A	C
Bos taurus	C	C	C	C	G	T	G	G	G	G	C	C	A	A	T	G	G	T	G	C	C	C	C	T	G	G	C	A	A	C
Canis familiaris	C	C	C	C	G	A	G	G	A	G	C	C	A	A	C	G	G	T	G	C	C	C	C	T	G	G	C	A	A	T
Equus caballus	C	C	C	C	G	T	G	G	G	T	C	C	A	A	C	G	G	T	G	C	C	C	C	T	G	G	C	A	A	C

- zarámovaná oblast ohraničuje porovnávané oblasti kodónů lidského genu COL1A1
- čísla uvedená nad zarámovanými oblastmi uvádějí čísla sledovaných kodónů v lidském genu COL1A1
- červeně zvýrazněné nukleotidy znázorňují pozici substituovaného nukleotidu v konkrétním kodónu a porovnání tohoto nukleotidu s homologní sekvencí jiných obratlovců
- žlutě podbarvené oblasti znázorňují vysoce konzervativní oblasti genů COL1A1 u člověka a u ostatních obratlovců

Obr. 39. Porovnání kodónů 519, 523 a 526 lidského genu COL1A1 s homologní sekvencí jiných obratlovců.

Transice T>C na pozici 15 778 bp exonu 33 má za následek silent mutaci v kodónu 588 pro threonin. Ačkoliv se tato mutace neprojevuje na výsledném množství a kvalitě molekul kolagenu typ I, může mít záměna vliv na rychlost translace mRNA nebo může být

indikátorem predispozice k rozvoji osteoporózy či osteoartritidy (Roughley, 2003). Mutovaný kodón se nachází v oblasti vázající COMP (Cartilage oligomeric matrix protein), vymezené kodóny 582–638. Tato mutace může mít tudíž negativní vliv na navázání COMP proteinu během posttranslačních úprav do oblasti zahrnující kodóny 582–638 molekuly kolagenu typ I. V takovém případě by tato záměna snižovala pružnost a pevnost kostí. Pacienti s touto mutací (pacienti číslo 1, 2 a 3) jsou postiženi stejnou formou onemocnění – OI typ IA. Všichni mají modré bělmo, trpí hypermobilitou kloubů a první zlomenina byla zaznamenána nejdříve po druhém roce života (souvislost s rozvojem lokomoce). Společným znakem jsou abnormality nohou – pedes plani či pedes excavati, a astenický typ postavy. Při dlouhodobé zátěži pacienti trpí bolestmi zatěžovaných oblastí těla (pacient číslo 1 – záda a dolní končetiny, číslo 2 – Th a C páteř, číslo 3 – kolena a kosti bérců). U pacientů číslo 1 a 2 byla diagnostikována nedoslýchavost, deformace kostí, osteoporóza a nehomogenní BMD v oblasti páteře – případný rozvoj těchto znaků je tedy vhodné sledovat u pacienta číslo 3 jako soubor prediktivních markerů.

Níže uvedený obrázek (obr. 40) porovnává kodón 588 lidského genu pro kolagen typ I s homologní sekvencí genu COL1A1 jiných obratlovců. U všech porovnávaných obratlovců se tento kodón nalézá na hranici vysoce konzervativní oblasti genu. Substituovaný nukleotid je z této oblasti vyčleněn, ve všech případech však kodón kóduje stejnou aminokyselinu – threonin. Mutace v této oblasti mohou mít za následek narušení posttranskripčních a posttranslačních úprav, konkrétně navázání COMP proteinu, jejichž výsledkem je snížená stabilita proteinu a pokles pevnosti kostí.

	588																													
Homo sapiens	G	T	C	C	G	T	G	G	T	C	T	G	A	C	T	G	G	C	C	C	C	A	T	T	G	G	T	C	C	T
Pan troglodytes	G	T	C	C	G	T	G	G	T	C	T	G	A	C	C	G	G	C	C	C	C	A	T	T	G	G	T	C	C	T
Pongo pygmeus	G	T	C	C	G	T	G	G	T	C	T	G	A	C	T	G	G	C	C	C	C	A	T	T	G	G	T	C	C	T
Macaca mulatta	G	T	C	C	G	T	G	G	T	C	T	G	A	C	T	G	G	C	C	C	C	A	T	T	G	G	T	C	C	T
Mus musculus	G	C	C	C	G	T	G	G	T	C	T	G	A	C	T	G	G	T	C	C	C	A	T	T	G	G	T	C	C	T
Rattus norvegicus	G	T	C	C	G	T	G	G	T	C	T	G	A	C	T	G	G	T	C	C	C	A	T	T	G	G	T	C	C	T
Bos taurus	G	T	C	C	G	T	G	G	T	C	T	G	A	C	T	G	G	T	C	C	C	A	T	C	G	G	T	C	C	T
Canis familiaris	G	T	C	C	G	T	G	G	T	C	T	G	A	C	T	G	G	C	C	C	C	A	T	T	G	G	T	C	C	T
Equus caballus	G	T	C	C	G	T	G	G	T	C	T	G	A	C	T	G	G	C	C	C	C	A	T	C	G	G	T	C	C	T

- zarámovaná oblast ohraničuje porovnávanou oblast kodónu 588 lidského genu COL1A1
- číslo uvedené nad zarámovanou oblastí uvádí číslo sledovaného kodónu v lidském genu COL1A1
- červeně zvýrazněné nukleotidy znázorňují pozici substituovaného nukleotidu v konkrétním kodónu a porovnání tohoto nukleotidu s homologní sekvencí jiných obratlovců
- žlutě podbarvené oblasti znázorňují vysoce konzervativní oblasti genu COL1A1 u člověka a u ostatních obratlovců

Obr. 40. Porovnání kodónu 588 lidského genu COL1A1 s homologní sekvencí jiných obratlovců.

Žádná z námi odhalených mutací se nenalézá v oblastech MLBR2 a MLBR3 genu COL1A1.

Genetická analýza odhalila polymorfismy v intronech číslo 32 a 39 genu COL1A1. Intron 32 se nachází v oblasti genu, ke které se během posttranslačních úprav váží keratan sulfát proteoglycan, integriny a Hsp47 protein. Intron 39 se nalézá v oblasti COL1A1 genu vázající v průběhu posttranslačních úprav fibronectin. U nalezených polymorfismů se jedná o substituci thyminu cytosinem na pozici 15 375 bp (Intron 32) a dále o substituci cytosinu guaninem na pozici 17 332 bp (Intron 39). V případě, že by obě tyto mutace měly za následek vytvoření nového stříhového místa, nebo byly umístěny v oblasti stříhových míst, byly by produkovány prodloužené formy alpha 1 řetězců. Takto strukturálně chybné řetězce by výsledně nebyly začleněny do molekul kolagenu typ I, čímž by došlo ke snížení celkového množství tohoto proteinu. V našem případě však ani k jedné z výše uvedených situací nedošlo, tudíž vliv těchto mutací na kvalitu molekul COL1A1 proteinu není doposud zcela jasný.

Dopad těchto polymorfismů na translaci, posttranslační úpravy či na skládání molekul kolagenu typ I nebyl doposud odhalen. Protože tyto změny v genu COL1A1 pacientů s diagnózou Osteogenesis imperfecta dosud nebyly popsány v odborné literatuře, bude třeba ještě ověřit tato pozorování nejméně dvěma nezávislými obousměrnými sekvenacemi z oddělených odběrů periferní krve téhož pacienta, což bude prováděno v rámci navazujícího doktorandského studia.

## 8. ZÁVĚR

1) Metodou DNA sekvencování bylo analyzováno 25 pacientů s diagnózou Osteogenesis imperfecta, typ IA, III a IVB, z celkového počtu 59 OI pacientů kompletovaných v DNA bance v České republice. Studie je zaměřena na analýzu exonů 31–40 a přilehlých intronových sekvencí genu COL1A1. Jedná se o oblasti vazující ligandy – komponenty kostní hmoty. Mutace této části genu jsou typické zejména pro pacienty s OI typem I, neboť mají za následek snížení pružnosti a pevnosti kostní hmoty, čímž se může zvyšovat i četnost zlomenin.

2) Byla kompletována fenotypová data osob zařazených do analyzovaného souboru (25 pacientů), ale i dalších jedinců, kteří v této práci prezentováni nejsou (34 pacientů).

3) Byly zpracovány periferní krve vytipovaných jedinců, z leukocytů byla izolována genomická DNA (gDNA), elektroforeticky byla ověřena její kvalita i kvantita a tyto vzorky gDNA byly amplifikovány v 6 částech MLBR oblasti. Pro amplifikace byly připraveny původní amplifikační systémy, včetně navržených původních, dosud nepublikovaných, primerů. Byla provedena optimalizace všech 6 amplifikačních systémů MLBR oblastí, a poté byly elektroforeticky ověřené amplifikáty obousměrně sekvenovány.

4) Mutace byly nalezeny u sedmi pacientů. Pět z těchto pacientů (pacienti číslo 1, 2, 3, 4 a 21) je postiženo OI typem IA, jeden pacient (pacient číslo 6) trpí OI typem III a u jednoho pacienta, číslo 5, byla diagnostikována OI typ IVB.

Ve všech případech se jedná o jednobodové mutace či polymorfismy. Pouze tři z uváděných mutací (Arg519STOP – pacient číslo 4, Gly523Cys – pacient číslo 5 a Gly526Cys – pacient číslo 6) z odhalených mutací (všechny se vyskytují v exonu 31) již byly popsány v odborné literatuře (Willing et al., 1996, Liu et al., 2007; Sarafova, 1998; Starman, 1989). V exonu 33 byla odhalena jednobodová záměna cytosinu thyminem v kodónu 588 pro threonin. Tato mutace byla objevena u čtyř pacientů (pacienti číslo 1, 2, 3 a 21) a má za následek silent mutaci threoninu. V nekódujících oblastech byly odhaleny dva polymorfismy (I32T15375C a I39C17332G).

Žádná záměna odhalená v námi zkoumané části COL1A1 genu se nenalézá v oblastech MLBR2 a MLBR3 tohoto genu.

5) Konkrétní projev mutací identifikovaných v exonu 31, tedy Arg519STOP (pacient číslo 4, OI typ IA), Gly523Cys (pacient číslo 5, OI typ IVB) a Gly526Cys (pacient číslo 6, OI typ III),



nebyl ve výsledném fenotypu pacientů doposud odhalen. Pacienti číslo 4 a 6 vykazují fenotypové znaky popsané již dříve v zahraničních studiích u jiných etnik. U pacienta číslo 4 se jedná o zvýšenou frekvenci zlomenin a modré skléry, u pacienta číslo 6 jsou těmito stejnými klinickými znaky deformace kostí, wormianské kosti lebky a porucha tvorby dentinu. Všichni pacienti s mutací v exonu 33 (Thr588Thr) jsou postiženi OI typem IA. Mutace nemění smysl čtení řetězce během translace. Následkem může být zpoždění translace a posttranslačních úprav. Tři pacienti (číslo 1, 2 a 3) ze čtyř projevují mnoho stejných klinických znaků, jako například modré zbarvení sklér, zvýšená frekvence zlomenin, hypermobilní klouby či mírné deformace kostí. Klinická data pacienta číslo 21 nebyla pro tuto práci k dispozici. Protože se tato mutace vyskytuje v oblasti proteinu COL1A1 vázající COMP protein, můžeme předpokládat, že jejím následkem může být snížení pevnosti kostí. U dvou pacientů (číslo 1 a 2) již byla diagnostikována osteoporóza. Sledováním projevu tohoto znaku u pacienta číslo 3 může být potvrzen předpoklad, že silent mutace jsou signálním znakem pro rozvoj osteoporózy. Vhodné by bylo zároveň provést sekvenční analýzu tohoto exonu pro výskyt Thr588Thr u dalších českých pacientů s diagnózou OI IA a následně porovnat klinický popis pacientů s identifikovanou mutací s pacienty této studie.

**6)** V zahraničních studiích byly již dříve popsány mutace Arg519STOP, Gly523Cys a Gly526Cys. Mutace Arg519STOP byla popsána u brazilských pacientů postižených formou I OI (Liu et al., 2007), záměna Gly526Cys byla popsána u iráckého probanda s OI typ III (Starman et al., 1989). Ostatní studie, popisující tyto tři výše uvedené mutace, neinformují o etnickém původu vyšetřovaných jedinců. Mutace Thr588Thr a polymorfismy I32T15375C a I39C17332G nebyly doposud popsány v odborné literatuře.

Na diplomovou práci budou v příštích letech navazovat kontrolní analýzy všech 25 zkoumaných jedinců, dále molekulárně genetické analýzy zbylých oblastí genu COL1A1 nejen u těchto 25 pacientů, ale také u zbývajících 34 pacientů, jejichž gDNA je uložena v Ambulantním centru po vady pohybového aparátu v Praze. Zároveň bude vykonána laserová mikrodisekce kostní tkáně odebrané při chirurgických zákrocích vybraných pacientů. Navazující studie mají za cíl odhalit co možná nejširší spektrum mutací u OI pacientů České republiky a popsat fenotypový projev těchto mutací. To vše může přispět ke včasnému rozpoznání konkrétní formy OI a zavedení vhodné a včasné medikamentózní léčby pro usnadnění a zlepšení kvality života postižených jedinců.

## 9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

*A* – adenin

*ACP* – kyselá fosfatáza

*AD* – autosomálně dominantní

*ADAMTS2* – a disintegrin-like and metallo proteinase with thrombospondin type 1 motif, 2

*ALP* – alkalická kostní fosfatáza

*AMK* – aminokyselina

*AP1* – activator protein 1

*AR* – autosomálně recesivní

*Arg* – arginin

*BI* – basilární imprese

*BMD* – bone mineral density

*pb* – pár báze

*BTEB* – basic transcription element binding protein

*C* – cytosin

*C páteř* – krční segment páteře

*CBF* – Core-binding factor

*CBF-A* – core-binding factor, alpha subunit

*CBF-B* – core-binding factor, beta subunit

*CBF-C* – core-binding factor, gamma subunit

*cKrox* – collagen krox protein

*CNBr* – cyanogen bromide peptide

*COL1A1* – alpha 1 řetězec kolagenu typ I; kolagen, typ I

*COL1A2* – alpha 2 řetězec kolagenu typ I

*COL3A1* – alpha 1 řetězec kolagenu typ 3

*COL5A1* – alpha 1 řetězec kolagenu typ 5

*COL5A2* – alpha 2 řetězec kolagenu typ 5

*COMP* – Cartilage oligomeric matrix protein

*CRTAP* – Cartilage associated protein

*CTGF* – connective tissue growth factor

*Cys* – cystein

*ddATP* – dideoxyadenintrifosfát

*ddCTP* – dideoxynukleotidtrifosfát

*ddGTP* – dideoxynukleotidtrifosfát

*ddNTP* – dideoxynukleotidtrifosfát

*ddNTPs* – dideoxynukleotidtrifosfáty  
*ddTTP* – dideoxynukleotidtrifosfát  
*dg.* – diagnóza  
*dNTP* – deoxynukleotidtrifosfát  
*dNTPs* – deoxynukleotidtrifosfáty  
*DFSP* – Dermatofibrosarcoma protuberans  
*DI* – Dentinogenesis imperfecta  
*DK* – dolní končetina  
*DNA* – deoxyribonucleic acid  
*DPD* – deoxypyridinolin  
*DSPP* – dentin sialophosphoprotein  
*E* – exon  
*EDTA* – kyselina ethylendiamintetraoctová  
*ERK1/2* – extracelular signal-regulated kinases 1,2  
*FKBP10* – FK506-binding protein  
*G* – guanin  
*gDNA* – genomic deoxyribonucleic acid  
*Gly* – glycin  
*Gly-X-Y* – glycin-X-Y triplet  
*HK* – horní končetina  
*Hsp47* – Heat shock protein 47  
*I* – intron  
*IF1* – iniciační faktor 1  
*IF2* – iniciační faktor 2  
*IM* – infarkt myokardu  
*I $\kappa$ B* – nuclear factor kappa-B inhibitor  
*kb* – kilo báze  
*L* – levý/á  
*L páteř* – lumbální segment páteře  
*LDK* – levá dolní končetina  
*LEPRE1* – leucine-and proline-enriched proteoglycan 1    *LH1* - lysyl hydroxyláza 1  
*LH2* – lysyl hydroxyláza 2  
*LH3* – lysyl hydroxyláza 3  
*MLBR* – multi ligand binding region  
*mRNA* – messenger ribonucleic acid  
*MTHFR* – methylenetetrahydrofolate reductase  
*Myb* – V-Myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog

*Myc* – V-MYc avian myeloblastosis viral oncogene homolog  
*NF- $\kappa$ B* – nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells  
*NF- $\kappa$ B/Rel* – nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells podjednotka  
 vázající c-Rel transkripčnímu faktor  
*NF- $\kappa$ B/p50* – p 50 podjednotka NF- $\kappa$ B  
*NF- $\kappa$ B/p52* – p 52 podjednotka NF- $\kappa$ B  
*OA* – osobní anamnéza  
*OI* – Osteogenesis imperfecta  
*OIC* – Osteogenesis imperfecta congenita  
*OI/EDS* – Osteogenesis imperfecta/Ehlers-Danlos syndrom  
*P* – pravý/á  
*PCR* – správně polymerase chain reaction  
*PDGF $\beta$*  – platelet-derived growth factor, beta polypeptide  
*PDK* – pravá dolní končetina  
*PHK* – pravá horní končetina  
*PLOD1* – procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase  
*PPIB* – peptidylprolyl isomerase 1 (cyclophilin B)  
*PP1* – protein fosfatáza 1  
*PP2A* – protein fosfatáza 2A  
*Pro $\alpha$ 1* – pro-alpha řetězec 1  
*Pro $\alpha$ 2* – pro-alpha řetězec 2  
*pre-mRNA* – premature - messenger ribonucleic acid  
*P3H1* – prolyl 3-hydroxyláza 1  
*RA* – rodinná anamnéza  
*RNA* – ribonucleic acid  
*RTG* – rentgenové vyšetření  
*S páteř* – sakrální segment páteře  
*SD* – směrodatná odchylka  
*SP1* – transkripční faktor Sp1 (~ specificity protein 1)  
*T* – tyrosin  
*Ta* – teplota annealingu  
*TBE* – Tris/Borate/EDTA pufr  
*Th páteř* – hrudní segment páteře  
*Thr* – threonin  
*Tm* – teplota tání  
*TNXB* – *tenascin XB*  
*U* – uracil

*YY1* – transkripční faktor YY1 (~ yin yang 1)

*ZNF469* – zinc finger protein 469

## 10. SEZNAM LITERATURY

Alanay Y, Avaygan H, Camacho N, Utine GE, Boduroglu K, Aktas D, Alikasifoglu M, Tuncbilek E, Orhan D, Bakar FT, Zabel B, Superti-Furga A, et al.. 2010. Mutations in the gene encoding the RER protein FKBP65 cause autosomal-recessive osteogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet.* **86**: 551–559.

Artlett CM, Chen S-J, Varga J, Jimenez SA. 1998. Modulation of basal expression of the human alpha1(I) procollagen gene (COL1A1) by tandem NF-1/Sp1 promoter elements in normal human dermal fibroblasts. *Matrix Biology.* **17**(6): 425–434.

Barnes AM, Chang W, Morello R, Cabral WA, Weis M, Eyre DR, Leikin S, Makareeva E, Kuznetsova N, Uveges TE, Ashok A, Flor AW, Mulvihill JJ, Wilson PL, Sundaram UT, Lee B, Marini JC. 2006. Deficiency of cartilage-associated protein in recessive lethal osteogenesis imperfecta. *New Eng J Med.* **355**: 2757–2764.

Barsh GS, Byers PH. 1981. Reduced secretion of structurally abnormal type I procollagen in a form of osteogenesis imperfecta. *Proc Natl Acad Sci USA.* **78**(8): 5142–5146.

Bates G, Lehrach H. 1994. Trinucleotide repeat expansions and human genetic disease. *BioEssays.* **16**: 277–284.

Bateman JF, Mascara T, Chan D, Cole WG. 1984. Abnormal type I collagen metabolism by cultured fibroblasts in lethal perinatal osteogenesis imperfecta. *Biochem J.* **217**: 103–115.

Bodian DL, et al. 2009. Mutation and polymorphism spectrum in osteogenesis imperfecta type II: implications for genotype–phenotype relationships. *Human Molecular Genetics.* **18**(3): 463–471.

Brett D. 2008. A Review of Collagen and Collagen-based Wound Dressings. *Wounds.* **20**(12): 347–356.

Burjanadze TV, Veis A. 1997. A thermodynamic analysis of the contribution of hydroxyproline to the structural stability of the collagen triple helix. *Connect Tissue Res.* **36**: 347–365.

Byers PH, Tsiopouras P, Bonadio JF, Starman BJ, Schwarz RC. 1988. Perinatal lethal osteogenesis imperfecta (OI type II): a biochemically heterogeneous disorder usually due to mutations in the genes for the type I collagen. *Am J Hum Genet.* **42**: 237–248.

Byers PH, Wallis GA, Willing MC. 1991. Osteogenesis imperfecta: translation of mutation to phenotype. *J Med Genet.* **28**: 433–442.

Byers PH, Steiner RD. 1992. Osteogenesis imperfecta. *Annu Rev Med.* **43**: 269–282.

Byers PH. 1993. Osteogenesis imperfecta. In: Royce PM, Steinmann B, Editors. *Connective Tissue and Its Heritable Disorders: Molecular, Genetic, and Medical Aspects.* p 317–350.

Byers PH, Cole WG. 2002. Osteogenesis imperfecta. In: Royce PM, Steinmann B, Editors. *Connective Tissue and Its Heritable Disorders: Molecular, Genetic and Medical Aspects.* p 385–430.

Brinckmann J. 2005. Collagens at a glance. *Topics in current chemistry.* **247**: 1–6.

Cabral WA, et al.. 2007. Prolyl 3-hydroxylase 1 causes a recessive metabolic bone disorder resembling lethal/severe osteogenesis imperfecta. *Nat Genet.* **39**(3): 359–365.

Charnas LR, Marini JC. 1993. Communicating hydrocephalus, basilar invagination, and other neurologic features in osteogenesis imperfecta. *Neurology.* **43**: 2603–2608.

Chen SJ, Artlett CM, Jimenez, SA, Varga J. 1998. Modulation of human  $\alpha 1(I)$  procollagen gene activity by interaction with Sp1 and Sp3 transcription factors in vitro. *Gene.* **215**: 101–110.

Cole WG. 1994. Collagen genes: mutations affecting collagen structure and expression. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* **47**: 29–80.

Cooper DN, Krawczak M, Antonarakis SE. 1995. The nature and mechanisms of human gene mutation. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease.* **7**: 259–292.

Dalgleish R. 1997. The human type I collagen mutation database. *Nucleic Acids Res.* **25**: 181–187.

DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis – *Applied Biosystems Chemistry Guide* | Second Edition. 05/2009.

Dombrowski KE, Prockop DJ. 1988. Cleavage of type I and type II procollagens by type I/II procollagen N-proteinase. Correlation of kinetic constants with the predicted conformations of procollagen substrates. *J Biol Chem.* **263**: 16545–16552.

Engel J, Prokop DJ. 1991. The zipper-like folding of collagen triple helices and the effects of mutations that disrupt the zipper. *Annu Rev Biophys Biophys Chem.* **20**: 137–152.

Engel J, Bächinger HP. 2005. Structure, stability and folding of the collagen triple helix. In: Brinckmann J, Notbohm H, Müller PK, Editors. *Topics in Current Chemistry.* **247**: 7–34.

Hansen B, Jemec GBE. 2002. The Mechanical Properties of Skin in Osteogenesis Imperfecta. *Arch Dermatol.* **138**: 909–911.

Hartikka H, Kuurila K, Körkkö J, Kaitila I, Grénman R, Pynnönen S, Hyland JC, Ala-Kokko L. 2004. Lack of correlation between the type of COL1A1 or COL1A2 mutation and hearing loss in osteogenesis imperfecta patients. *Hum Mutat.* **24**: 147–154.

Hayes M, Parker G, Eil J, Sillence D. 1999. Basilar impression complicating osteogenesis imperfecta type IV: the clinical and neuroradiological findings in four cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* **66**: 357–364.

Hynes RO. 2004. The emergence of integrins: a personal and historical perspective. *Matrix Biology.* **23**: 333–340.

Gajko-Galicka A. 2002. Mutations in type I collagen genes resulting in osteogenesis imperfecta in humans. *Arch Biochim Pol.* **49**: 433–441.

Gensure RC, et al.. 2005. A novel COL1A1 mutation in infantile cortical hyperostosis (Caffey disease) expands the spectrum of collagen-related disorders. *J Clin Invest.* **115**(5): 1250–1257.

Ghosh AK. 2002. Factors Involved in the Regulation of Type I Collagen Gene Expression: Implication in Fibrosis. *Exp Biol Med.* **227**: 301–314.

Glorieux FH, Rauch F, Plotkin H, Ward L, Travers R, Roughley PJ, Lalic L, Glorieux DF, Fassier F, Bishop NJ. 2000. Type V osteogenesis imperfecta: a new form of brittle bone disease. *J Bone Miner Res.* **15**: 1650–1658.



Glorieux FH, Ward LM, Rauch F, Lalic L, Roughley PJ, Travers R. 2002. Osteogenesis imperfecta type VI: a form of brittle bone disease with a mineralization defect. *J Bone Miner Res.* **17**: 30–38.

Kagan HM, Li W. 2003. Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell. *J Cell Biochem.* **88**: 660–672.

Kamoun-Goldrat A, le Merrer M. 2008. Infantile cortical hyperostosis (Caffey disease): a review. *J Oral Maxillofac Surg.* **66**(10): 2145–2150.

Kashyap RR. 2009. Osteogenesis imperfecta type IV. *Kerala Dental Journal.* **32**(1): 47–49. ISSN 0972-396X.

Kellokumpu S, Sormunen R, Heikkinen J, Myllyl, R. 1994. Lysyl hydroxylase, a collagen processing enzyme, exemplifies a novel class of lumenally-oriented peripheral membrane proteins in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* **269**: 30524–30529.

Kielty CM, Hopkinson I, Grant ME. 1993. Collagen: the collagen family: structure, assembly, and organization in the extracellular matrix. In: Royce PM, Steinmann B, Editors. *Connective tissue and its heritable disorders: Molecular, genetic and medical aspects.* p 103–147.

Kielty CM, Grant ME. 2002. The collagen family: structure, assembly, and organization in the extracellular matrix. In: Royce PM, Steinmann B. Editors. *Connective Tissue and Its Heritable Disorders.* p 159–221.

Kim JW, Nam SH, Jang KT, Lee SH, Kim CC, Hahn SH, et al.. 2004. A novel splice acceptor mutation in the DSPP gene causing dentinogenesis imperfecta type II. *Hum Genet.* **115**: 248–254.

Kivirikko KI, Myllylä R. 1982. Posttranslational enzymes in the biosynthesis of collagen: intracellular enzymes. *Methods Enzymol.* **82**: 245–304.

Kivirikko KI, Pihlajaniemi T. 1998. Collagen hydroxylases and the protein disulfide isomerase subunit of prolyl 4-hydroxylases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* **72**: 325–398.

Kobayashi A, Sogawa K, Imataka H, Fujii-Kuriyama Y. 1995. Analysis of functional domains of a GC box-binding protein, BTEB. *J Biochem.* **117**: 91–95.

Korkko J, et al.. 1997. Two new recurrent nukleotide mutations in the COL1A1 gene in four patients with osteogenesis imperfecta: about one-fifth are recurrent. *Hum Mutat.* **9**: 148-156.

Kuivaniemi H, Tromp G, Prokop DJ. 1991. Mutations in collagen genes: causes of rare and some common diseases in humans. *FASEB J.* **5**: 2052–2060.

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

Lawrence EJ. 2005. The clinical presentation of Ehlers-Danlos syndrome. *Advances in Neonatal Care.* **5**: 301.

Li SW, Sieron AL, Fertala A, Hojima Y, Arnold WV, Prokop DJ. 1996. The C-proteinase that processes procollagens to fibrillar collagens is identical to the protein previously identified as bone morphogenic protein-1. *Proc Natl Acad Sci USA.* **93**: 5127–5130.

Linn SC, West RB, Pollack JR, Zhu S, Hernandez-Boussard T, Nielsen TO, Rubin BP, Patel R, Goldblum JR, Siegmund D, Botstein D, Brown PO, Gilks CB and van de Rijn M. 2003. Gene Expression Patterns and Gene Copy Number Changes in Dermatofibrosarcoma Protuberans. *American Journal of Pathology.* **163**: 2383–2395.

Liu W, Gu F, Ji J, Lu D, Li X, Ma X. 2007. A novel COL1A1 nonsense mutation causing osteogenesis imperfecta in a Chinese family. *Molecular Vision.* **13**: 360–365.

Maatta A, Bornstein P, Penttinen RP. 1991. Highly conserved sequences in the 3'-untranslated region of the COL1A1 gene bind cell-specific nuclear proteins. *Febs Letters.* **279**(1): 9–13.

Maity SN, Sinha S, Ruteshouser EC, de Crombrughe B. 1992. Three different polypeptides are necessary for DNA binding of the mammalian heteromeric CCAAT binding factor. *J Biol Chem.* p 267.

Maquat LE. 1996. Defects in RNA splicing and the consequence of shortened translational reading frames. *Am J Hum Genet.* **59**: 279–286.

Marini JC, et al.. 2007. Consortium for Osteogenesis Imperfecta Mutations in the Helical Domain of Type I Collagen: Regions Rich in Lethal Mutations Align With Collagen Bonding Site for Integrins and Proteoglycans. *Hum Mutat.* **28**(3): 209–221.

Marini JC. 2010. Osteogenesis imperfecta. *Bone & Extracellular Matrix.* p 1–28.

Mařík I. 2001. Systémové, končetinové a kombinované vady skeletu: Diagnostické, terapeutické a biomechanické aspekty. Habilitační práce, obhajoba PŘ.F-UK, Praha.

Maříková-Hudáková O. 2007. Deformity skeletu u kostních dysplázií se sníženou kostní hustotou: osteogenesis imperfecta. PhD práce, obhajoba PŘ.F-UK, Praha.

McLaughlin, SH, Bulleid NJ. 1998. Molecular recognition in procollagen chain assembly. *Matrix Biology.* **16**: 369–377.

Morello, et al.. 2006. CRTAP is required for prolyl-3-hydroxylation and mutations cause recessive osteogenesis imperfecta. *Cell.* **127**(2): 291–304.

Moussad EE-DA, Brigstock DR. 2000. Connective tissue growth factor: what's in a name? *Mol Genet Metabol.* **71**: 276–292.

Mullis K. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American.* p 56-65.

Mundlos S, Chan D, Weng YM, Silence DO, Cole WG, Bateman JF. 1996. Multiexon deletions in the type I collagen COL1A2 gene in osteogenesis imperfecta type IB. Molecules containing the shortened alpha2(I) chains show differential incorporation into the bone and skin extracellular matrix. *J Biol Chem.* **271**: 21068–21074.

Myllyharju, J, Kivirikko KI. 2001. Collagens and collagen-related diseases. *Annals of Medicine.* **33**: 7–21.

Myllyharju J. 2003. Prolyl 4-hydroxylases, the key enzymes of collagen biosynthesis. *Matrix Biol.* **22**: 15–24.

Nakai K, Sakamoto H. 1994. Construction of a novel database containing aberrant splicing mutations of mammalian genes. *Gene.* **141**: 171–177.

Obafemi AA, Bulas DI, Troendle J, Marini JC. 2008. Popcorn calcification in osteogenesis imperfecta: incidence, progression, and molecular correlation. *Am J Med Genet A*. **146A**: 2725–2732.

O'Connell AC, Marini JC. 1999. Evaluation of oral problème in an osteogenesis imperfecta population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. **87**: 189–96.

Ohi T, Uehara Y, Takatsu M, Watanabe M, Ono T. 2006. Hypermethylation of CpGs in the Promoter of the COL1A1 Gene in the Aged Periodontal Ligament. *J Dent Res*. **85**(3): 245–250.

Pace JM, Atkinson M, Wallis G, Willing M, Byers PH. 2001. Small in-frame deletions and duplications in the triple helical domains encoded by the COL1A1 and COL1A2 genes of type I procollagen result in osteogenesis imperfecta. *Hum Mutat*. **18**: 319–326.

Pallos D, Hart PS, Cortelli JR, Vian S, Wright JT, Korkko J, et al. 2001. Novel COL1A1 mutation (G559C) associated with mild osteogenesis imperfecta and dentinogenesis imperfecta. *Arch Oral Biol*. **46**: 459–470.

Paterson CR, McAllion S, Miller R. 1983. Heterogeneity in osteogenesis imperfecta type I. *J Med Genet*. **20**: 203–205.

Peterkofsky B, Gosiewska A, Singh K, Pearlman S, Mahmoodian F. 1999. Species differences in cis-acting elements of the pro  $\alpha$ 1(I) procollagen promoter and their binding proteins. *J Cell Biochem*. **73**: 408–422.

Plotkin H, Rauch F, Bishop NJ, et al. 2000. Pamidronate Treatment of Severe Osteogenesis Imperfecta in Children under 3 Years of Age. *J Clin Endocrinol Metab*. **5**: 1846-1850.

Primorac D, Rowe DW, Mottes M, Barišić I, Antičević D, Mirandola S, Lira MG, Kalajzić I, Kušec V, Glorieux FH. 2001. Osteogenesis Imperfecta at the Beginning of Bone and Joint Decade. *Croatian Medical Journal*. **42**(4): 393–415.

Prokop DJ, Kuivaniemi H, Tromp G. 1994. Molecular basis of osteogenesis imperfecta and related disorders of bone. *Clin Plast Surg*. **21**: 407–413.

Redford-Badwal DA, Stover ML, Valli M, McKinstry MB, Rowe. 1996. Nuclear retention of COL1A1 messenger RNA identifies null causing mild osteogenesis imperfecta. *J Clin Invest.* **97**: 1035–1040.

Reunanen N, Foschi M, Han J, Kahari VM. 2000. Activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 inhibits type I collagen expression by human skin fibroblasts. *J Biol Chem.* p 275.

Rhodes K, Rippe RA, Umezawa A, Nehls M, Brenner DA, Breindl M. 1994. DNA methylation represses the murine alpha1(I) collagen promoter by an indirect mechanism. *Mol Cell Biol.* **14**: 5950–5960.

Riquet FB, Tan L, Choy BK, et al.. 2001. YY1 is a positive regulator of transcription of the Co 11a1 gene. *J Biol Chem.* **276**(42): 38665–38672.

Robberson BL, Cote GJ, Berget SM. 1990. Exon definition may facilitate splice site selection in RNAs with multiple exons. *Mol Cell Biol.* **10**: 84–94.

Rossouw CMS, Vergeer WP, du Plooy SJ, Bernard MP, Ramirez F, de Wet WJ. 1987. DNA sequences in the first intron of the human pro- $\alpha$  1(I) collagen gene enhance transcription. *J Biol Chem.* **262**: 15151–15157.

Roughley PJ, Rauch F, Glorieux FH. 2003. Osteogenesis imperfecta – clinical and molecular diversity. *European Cells and Materials.* **5**: 41–47.

Saitta B, Gaidarova S, Cicchillitti L, Jimenez SA. 2000. CCAAT binding transcription factor binds and regulates human COL1A1 promoter activity in human dermal fibroblasts: demonstration of increased binding in systemic sclerosis fibroblasts. *Arthritis Rheum.* **43**: 2219–2229.

Sarafova AP, Choi H, Forlino A, Gajko A, Cabral WA, Tosi L, Ring CM, Marini JC. 1998. Three Novel Type I Collagen Mutations in Osteogenesis Imperfecta Type IV Proband Are Associated With Discrepancies Between Electrophoretic Migration of Osteoblast and Fibroblast Collagen. *Hum Mutat.* **11**(5): 395–403.

Schegg B, Hülsmeier AJ, Rutschmann Ch, et al.. 2009. Core glycosylation of collagen is initiated by two  $\beta$ (1-O)Galactosyltransferases. *Mol Cell Biol.* **29**(4): 943–952.

Schwarze U, Goldstein JA, Byers PH. 1997. Splicing defects in the COL3A1 gene: marked preference for 50 (donor) splice-site mutations in patients with exon-skipping mutations and Ehlers-Danlos syndrome type IV. *Am J Hum Genet.* **61**: 1276–1286.

Siebenlist U, Franzoso G, Brown K. 1994. Structure, regulation and function of NF- $\kappa$ B. *Annu Rev Cell Biol.* **10**: 405–455.

Sillence DO, Senn A, Danks DM. 1979. Genetic heterogeneity in osteogenesis imperfecta. *J Med Genet.* **16**: 101–116.

Sillence DO, Barlow KK, Garber AP, Hall JG, Rimoin DL. 1984. Osteogenesis imperfecta type II: delineation of the phenotype with reference to genetic heterogeneity. *Am J Med Genet.* **17**: 407–423.

Sillence D, Butler B, Latham M, Barlow K. 1993. Natural history of blue sclerae in osteogenesis imperfecta. *Am J Med Genet.* **45**: 183–186.

Sillence DO. 1994. Craniocervical abnormalities in osteogenesis imperfecta: genetic and molecular correlation. *Pediatr Radiol.* **24**: 427–30.

Softah A. 2003. Recurrence of Dermatofibrosarcoma Protuberans: A Case Report and a Review of Literature. *Indian J Chest Dis Allied Sci.* **45**: 261–263.

Sorin H, Căpăţînă C, Curcă GC, Picioruş. 2008. Osteogenesis imperfecta: forensic assessment of traumatic injuries. Case report and literature review. *Rom J Leg Med.* **16**(4): 275–282.

Stankiewicz P, Lupski JR. 2002. Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. *Trends Genet.* **18**: 74–82.

Starman BJ, Eyre D, Charbonneau H, Harrylock M, Weis MA, Weiss L, Graham JM, Byers PH. 1989. The position of substitution for glycine by cysteine in the triple helical domain of the pro $\alpha$ 1(I) chains of type I collagen determines the clinical phenotype. *J Clin Invest.* **84**: 1206–1214.

Subramaniam P, Mathew S, Sugnani SN. 2008. Dentinogenesis imperfecta: A case report. *J Indian Soc Pedod Prevent Dent.* p 85–87. ISSN 0970-4388.

Sweeney SM, et al. 2008. Candidate Cell and Matrix Interaction Domains on the Collagen Fibril, the Predominant Protein of Vertebrates. *J Biol Chem.* **283**(30): 21187–21197

Takatsu M, Uyeno S, Komura J, Watanabe M, Ono T. 1999. Age-dependent alterations in mRNA level and promoter methylation of collagen alpha1(I) gene in human periodontal ligament. *Mech Ageing Dev.* **110**: 37–48.

Talerico M, Berget, SM. 1990. Effect of 50 splice site mutations on splicing of the preceding intron. *Mol Cell Biol.* **10**: 6299–6305.

Tasab M, Batten MR, Bulleid NJ. 2000. Hsp47: a molecular chaperone that interacts with and stabilizes correctly-folded procollagen. *Embo J.* **19**(10): 2204–2211.

Tsipouras P. 1993. Osteogenesis imperfecta. In: Beighton P, Editor. *McKusick's Heritable Disorders of Connective Tissue.* p 281–314.

Trummer T, Brenner R, Just W, Vogel W, Kennerknecht I. 2001. Recurrent mutations in the COL1A2 gene in patients with osteogenesis imperfecta. *Clin Gene.* **59**: 338–43.

Uitto J, Ringpfeil F. 2004. Ehlers–Danlos Syndrome—Molecular Genetics Beyond the Collagens. *Journal of Investigative Dermatology.* **122**: xii–xiii.

van der Rest M, Garrone R. 1991. Collagen family of proteins. *FASEB J.* **5**: 2814–2823.

Vyskočil V. 2009. Osteogenesis imperfecta - diagnostika a medikamentózní a chirurgická léčba. *Postgraduální medicína.* **1**: 57–67.

Vyskočil V, Pikner R, Kutílek S. 2005. Effect of alendronate therapy in children with osteogenesis imperfecta. *Joint Bone Spine.* **72**(5): 416–423.

Ward LM, Lalic L, Roughley PJ, Glorieux FH. 2001. Thirty-three novel COL1A1 and COL1A2 mutations in patients with osteogenesis imperfecta types I–IV. *Hum Mutat.* **17**: 434.

Ward LM, Rauch F, Travers R, Chabot G, Szout EM, Lalic L, Roughley PJ, Glorieux FH. 2002. Osteogenesis imperfecta type VII: an autosomal recessive form of brittle bone disease. *Bone.* **31**: 12–18.

Widom RL, Culic I, Lee JY, Korn JH. 1997. Cloning and characterization of hcKrox, a transcriptional regulator of extracellular matrix gene expression. *Gene*. **198**: 407–420.

Williams CJ, Prockop DJ. 1983. Synthesis and processing of a type I procollagen containing shortened pro-alpha-1(I) chains by fibroblasts from a patient with osteogenesis imperfecta. *J Biol Chem*. **258**: 5915–5921.

Willing MC, John DH, and P H Byers PH. 1990. Frameshift mutation near the 3' end of the COL1A1 gene of type I collagen predicts an elongated Pro alpha 1(I) chain and results in osteogenesis imperfecta type I. *J Clin Invest*. **85**(1): 282–290.

Willing MC, et al.. 1994. Osteogenesis imperfecta type I: molecular heterogeneity for COL1A1 null alleles of type I collagen. *AmJ Hum Genet*. **55**: 638–647.

Wildmann R, Bitan F, Laplaza F, et al.. 1999. Spinal Deformity, Pulmonary Compromise, and Quality of Life in Osteogenesis Imperfecta. (Miscellaneous Article). *Spine*. **24**: 1673.

Wollina U, Koch A. 2006. Osteogenesis imperfecta type I and psoriasis - a report on two CASE. *Egyptian Dermatology Online Journale*. **2**(1):15.

## 11. INTERNETOVÉ ZDROJE

<http://akimichi.homeunix.net/~emile/aki/html/medical/Image/blue-sclera-1.jpeg> (7.5.2010)

<http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/COL1A1ID186.html> (13.6.2010)

<http://emedicine.medscape.com/article/406697-overview> (29.6.2010)

<http://emedicine.medscape.com/article/411919-imaging> (11.5.2010)

[http://en.ganfyd.org/index.php?title=Ehlers-Danlos\\_syndrome#cite\\_ref-0](http://en.ganfyd.org/index.php?title=Ehlers-Danlos_syndrome#cite_ref-0) (29.6.2010)

<http://ghr.nlm.nih.gov/condition=osteogenesisimperfecta> (15.5.2010)

<http://image.absoluteastronomy.com/images/encyclopediainages/x/xr/xrayoitypev-kid-wardhan.jpg> (12.5.2010)

<http://library.med.utah.edu/WebPath/jpeg3/PERI022.jpg> (11.5.2010)

[http://wiki.medpedia.com/Collagen,\\_type\\_I,\\_alpha\\_1\\_\(COL1A1\)](http://wiki.medpedia.com/Collagen,_type_I,_alpha_1_(COL1A1)) (13.6.2010)

<http://www.athenadiagnostics.com/servlet/DownloadServlet?id=253> (16.5.2010)

<http://www.hawaii.edu/medicine/pediatrics/pemxray/v6c02a.jpg> (11.5.2010)

<http://www.hypro.cz/hyRubrIn.aspx?intRubrKis=1251&intLang=0> (18.6.2010)



<http://www.le.ac.uk/ge/collagen/col1a1.html> (18.5.2010)

<http://www.lekarna.cz/provera-250mg-tbl-40x250mg-bli/> (14.7.2010)

[http://www.niams.nih.gov/Health\\_Info/Bone/Osteogenesis\\_Imperfecta/default.asp](http://www.niams.nih.gov/Health_Info/Bone/Osteogenesis_Imperfecta/default.asp) (5.5.2010)

[http://ww2.healthhaven.com/cases/www.drtabib.com---New\\_York\\_City\\_Cosmetic\\_Dentist---graphics---rotated\\_before.jpg](http://ww2.healthhaven.com/cases/www.drtabib.com---New_York_City_Cosmetic_Dentist---graphics---rotated_before.jpg) (7.5.2010)

<http://www.genetests.org/servlet/access?db=geneclinics&site=gt&id=8888890&key=ESfTfPUK9UbL8&gry=&fcn=y&fw=uVOB&filename=/profiles/oi/index.html> (7.5.2010)

## **PŘÍLOHY**

## Příloha 1 Seznam použitých chemikálií a roztoků

### Použité chemikálie:

Agaróza .....	Roth, Germany
100bp DNA Ladder .....	Qiagen, Germany
Etanol 100% .....	Roth, Germany
Etanol 70% .....	Roth, Germany
Ethylendiaminotetraoctova kyselina (EDTA) .....	Roth, Germany
GelRed .....	Biotium, USA
Loading Buffer (Bromophenol Blue) .....	Sigma-Aldrich, USA
Primery .....	GeneriBiotech, Česká republika
QIAamp DNA Blood MidiKit .....	Qiagen, Germany
Taq PCR MasterMix .....	Qiagen, Germany
Terminátor v3.1 Cycle Sequencing Kit .....	Life Technologies Corporation, USA
Tris base .....	Roth, Germany

### Použité roztoky:

TBE pufr - složení (1 litr):	54 g Tris base
	27,5 g boric acid
	20 ml 0,5 EDTA pH 8.0
	doplnit destilovanou vodou do objemu 1 litr

**Příloha 2** Publikace článku

**Šormová L, Mazurová F, Mazura I.**

**Effect of mutation type in gene COL1A1 on phenotype patients with diagnosis  
Osteogenesis imperfecta**

**Vliv typu mutace v genu COL1A1 na genotyp osob s diagnózou Osteogenesis  
imperfecta**

2008. Pohybové ústrojí: Pokroky ve výzkumu, diagnostice a terapii. 15(3-4):332-338

---

**REVIEW ARTICLE**

**EFFECT OF MUTATION TYPE IN  
GENE COL1A1 ON PHENOTYPE  
PATIENTS WITH DIAGNOSIS  
OSTEOGENESIS IMPERFECTA  
VLIV TYPU MUTACE V GENU  
COL1A1 NA FENOTYP OSOB  
S DIAGNÓZOU OSTEOGENESIS  
IMPERFECTA**

Šormová L.<sup>1</sup>, Mazurová F.<sup>3</sup>, Mazura I.<sup>2</sup>

1 Přírodovědecká fakulta UK Praha, Katedra  
antropologie a genetiky člověka

E-mail: black.luca@seznam.cz

2 Ústav informatiky AV ČR, Praha

3 Mediekos Labor, s.r.o., Zlín

**Abstrakt**

Osteogenesis imperfecta je dědičné onemocnění člověka, postihující především pohybový aparát, a charakterisované křehkými kostmi a zvýšenou náchylností ke zlomeninám. Jedná se o poruchu kolagenu, typu I. V současnosti je popisováno celkem

---

osm klinicky odlišných typů Osteogenesis imperfecta, přičemž poslední typ, typ VIII, byl popsán teprve nedávno. První čtyři typy jsou považovány za základní, neboť u nich byly nalezeny mutace v genech kolagenu typ I (COL1A1, COL1A2), zatímco u typů V-VIII nebyly tyto mutace zjištěny. Výsledným efektem mutací genů kolagenu typ I je snížená nebo strukturálně chybná tvorba kolagenu.

Fenotypová závažnost onemocnění je závislá na typu a umístění mutace v rámci konkrétního genu kolagenu typ I. Stálým problémem pro genetiky zabývající se Osteogenesis imperfecta je stanovení vztahu mezi typem a pozicí mutace (genotypem) a výsledným klinickým projevem mutace (12). Doposud bylo z celkového mutačního spektra identifikováno pouhých 10% mutací měnících kodon glycinu. Je tedy důležité, aby byl v budoucnu prostřednictvím molekulárně-genetických analýz odhalen co možná nejvyšší počet mutací pro zjištění jejich vlivu na výsledný fenotyp pacientů s OI.

**Klíčová slova:** Osteogenesis imperfecta, COL1A1, kolagen, kolagenopatie, mutace

## Abstract

Osteogenesis imperfecta is an inherited disorder which concerns especially bones, characterized by fragile bones and increased propensity to fractures. It's worldwide extensive disorder of collagen, type I. In the present in human population occur in total eight clinically different types Osteogenesis imperfecta, whereas the last type (type VIII) was detected not long time ago. First four forms are considered as basic, because there were

found mutations in genes of collagen type I (COL1A1, COL1A2), while at forms V-VIII these mutations were not detected. These mutations result in decreased or structurally poor production of collagen.

Phenotype severity OI is dependent on type and placing mutation in gene of collagen type I. Continual problem for genetics conversant Osteogenesis imperfecta is assesment relation among type and position of mutation (genotype) and resulting clinical manifestation of mutation (12). Till now of the total mutational spectrum was identified pure c. 10% mutations transformative codon of glycine.

In the future it is important to detect (through molecular-genetic analysis) maximum of mutations for identification influence on resulting phenotype in patients with OI.

**Key words:** Osteogenesis imperfecta, COL1A1, collagen, collagenopathies, mutations

## Úvod

Kolageny tvoří největší skupinu živočišných bílkovin. Molekuly těchto proteinů se skládají z aminokyselin a jsou tvořeny třemi alpha řetězci, vytvářejícími trojitou spirálu, tzv. tropokolagen. Mohou podléhat následujícím mutacím: substituce aminokyselin, delece, inserce, duplikace, posunové mutace, splice-site mutace, missense mutace, exon-skipping mutace (2).

V současné době neexistuje léčba, která by mohla účinně ovlivnit tvorbu kolagenových molekul. Postiženým je poskytována pouze podpůrná léčba pro omezení počtu zlomenin a zvýšení funkčnosti pojivové tkáně. Zároveň je studována terapie prostřednictvím bisfosfonátů, snižujících

Typ	Dědičnost	Závažnost	Deformace kostí	Vzrůst	Typické rysy
I	AD	lehká	x	normální	modré či šedé bělmo, nedoslýchavost, DI
II	AD	prenatálně letální	letální	podprůměrný	zkrácené končetiny, velká a měkká lebka, zlomeniny během prenatálního vývoje
III	AD/AR	vážná	vážná	podprůměrný	hypermobilita kloubů, nedoslýchavost, DI
IV	AD	variabilní	x / lehká / vážná	variabilní	našedlé bělmo, mírná DI

**Tabulka 1:** Klinické rysy kolagenních forem OI (typ I-IV) (11)

Typ	Dědičnost	Závažnost	Deformace kostí	Vzrůst	Typické rysy
V	AD	mírná	mírná	podprůměrný	tvorba hypertorrického kalu, kalcifikace mezikostní membrány k. vřetenní a k. loketní
VI	AD/AR	mírná	mírná	podprůměrný	kostní lamely tvaru rybích šupin
VII	AR	mírná	lehká	podprůměrný	rhizomelické zkrácení femuru a humeru
VIII	AR	vážná	vážná	podprůměrný	podobné OI typu II a III

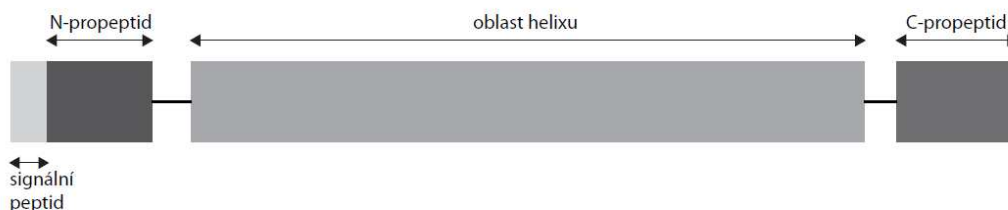
**Tabulka 2:** Klinické rysy nekolagenních forem OI (11)

Typ	Mutovaný gen	Typy mutací	Produkce kolagenu I
I	COL1A1	delece/inserce nukleotidů (počtu nedělitelným třemi) splétací mutace substituce (málo běžné)	tvorba sníženého množství molekul
II, III, IV	COL1A1/COL1A2	substituce glycinu delece/duplikace	tvorba strukturálně postižených molekul
V, VI	-	-	tvorba strukturálně postižených molekul
VII	CRTAP	-	tvorba strukturálně postižených molekul
VIII	LEPRE1	-	tvorba strukturálně postižených molekul

**Tabulka 3:** Molekulární podstata jednotlivých typů OI (1, 13, 2, 9)



Obr. 1: Struktura genu COL1A1



Obr. 2: Primární struktura proteinu, kódovaného genem COL1A1

resorpci kostní tkáně a riziko zlomenin a zvyšujících minerální densitu kostní tkáně a pevnost svalů (5).

### Klinický obraz oi

Klinické znaky Osteogenesis imperfecta se liší nejen mezi jednotlivými typy tohoto onemocnění, ale zároveň uvnitř těchto typů. Pacienti postižení stejným typem OI mohou mít zcela odlišnou klinickou prezentaci choroby, a to i v rámci jedné rodiny. Následující tabulka (tabulka 1) popisuje OI, typ I-IV, tedy formy s mutací genů kolagenu typ I. Klinické znaky dalších typů OI (typ V-VIII) uvádí tabulka 2.

### Molekulární patogeneze

Příčinou onemocnění OI jsou z 90% případů mutace genů COL1A1 nebo COL1A2, jež kódují kolagen typ I (tabulka 3).

### Gen COL1A1

Gen COL1A1 dosahuje velikosti 18kb a kóduje primární strukturu proteinu COL1A1. Skládá se z 51 exonů, jejichž

velikost se rovná násobku 9bp (nejčastěji 45bp a 54bp). Pouze exony 6-49, jež kódují oblast helixu proteinu COL1A1, zůstávají zachovány v konečném alfa 1(I) řetězci (obr. 1) (4). Exony 1-5, kódující oblast N-terminálního propeptidu, a exony 50 a 51, kódující oblast C-terminálního propeptidu, jsou během procesu tvorby konečných alfa řetězců odštěpeny speciálními enzymy (prokolagen N-peptidázou a prokolagen C-peptidázou).

### PROTEIN, kódovaný genem COL1A1

Molekula kolagenu typ I má charakter trojšroubovice tvořené dvěma alfa 1(I) řetězci a jedním řetězcem alfa 2(I). Nachází se v ní celkem 21 druhů aminokyselin, z nichž nejdůležitějšími jsou glycin (tvorba glycinových můstků mezi řetězci → těsné přiblížení alfa řetězců), prolin a hydroxyprolin (snížování denaturační teploty molekul kolagenu typ I) a lysin a hydroxylysin (tvorba pevných intra- a extracelulárních vazeb v koncových oblastech (pro)alfa řetězců, vazba sacharidových řetězců galaktosy a glukosylgalaktosy).



---

## MUTACE nalézané v genu COL1A1

Nejčastěji nalézanými mutacemi v genu COL1A1 jsou:

- **mutace měnící smysl čtení kodonu** (*missense mutace*) – mění kodon glycinu na kodon jiné aminokyseliny. Závažnost závisí na pozici v alfa 1(I) řetězci a na charakteru substituované aminokyseliny (10).
- **nesmyslné** (*nonsense*) **mutace** – změna jednoho nukleotidu za vzniku STOP kodonu, což vede k tvorbě zkrácených forem alfa řetězců (11)
- **posunové** (*frameshift*) **mutace** – inserce/delece jednoho či více nukleotidů vedoucí k posunu čtecího rámce při transkripci pre-mRNA a následně translaci mRNA do polypeptidického řetězce (14). Výsledkem může být jak tvorba sníženého množství normálního kolagenu I, tak tvorba strukturálně postižených molekul kolagenu I (1).
- **sestřihové** (*splice-site*) **mutace** (2) – inserce/delece či substituce jednoho a více nukleotidů v oblasti sestřihových míst pre-mRNA; tři odlišné následky:
  1. zadržení intronu v sekundární mRNA
  2. vynechání části či celého exonu ve výsledné mRNA (tzv. exon skipping)
  3. vytvoření zcela nových sestřihových míst v pre-mRNA

## Kvalita molekuly kolagenu TYP I

Mutace v genu COL1A1, jež vedou k tvorbě abnormálních molekul, jsou více závažné než v genech COL1A2, neboť postižují 75% syntetizovaných molekul kolagenu typ I (6).

Mutace v signální sekvenci promotorní oblasti potlačují aktivaci transkripce a mají tedy za následek tvorbu sníženého

množství molekul kolagenu typ I (fenotyp OI I). Ve většině případů ovšem vedou ve vážnější formy OI (typ II, III a IV). Porucha transkripce může být dále způsobena mutacemi v místech vazeb tzv. aktivačních proteinů (enhancerů či silencerů).

CpG dinukleotidy regulační oblasti genu mohou podléhat metylaci způsobující potlačení vazby aktivačních proteinů. Výsledkem je tvorba sníženého množství molekul kolagenu typ I. Mutace postihující tyto dinukleotidy kodonu glycinu v oblastech kódujících helix alfa 1(I) řetězců vedou v 1/3 případů k vážným fenotypům OI (typ II a III) (8).

Mutace měnící kodon glycinu vedou ve většině případů k vážnému klinickému obrazu choroby OI. V alfa 1(I) řetězci jsou letální z 36%, zatímco v alfa 2(I) řetězci jsou letální v pouhých 20% případů. Závažnost se zvyšuje směrem k C-terminální oblasti alfa řetězců a závisí dále na charakteru substituované aminokyseliny (př. valin – v alfa 1(I) řetězci ze 73% letální X v alfa 2(I) řetězci letální v 17% případů) (8).

## Korelace genotyp-fenotyp u pacientů s diagnózou OI

V několika posledních letech je patrná stále intenzivnější snaha uvést do příčinného vztahu typ nalezené mutace a klinický obraz nositele této mutace. Doposud bylo identifikováno několik takových vzájemných souvislostí mezi nalezeným genotypem a fenotypovým obrazem pacienta s OI:

- Mutace genu COL1A1 vedou častěji v OI typ I a III, projevují se modrým bělmem, normálním či mírně podprůměrným vzrůstem a rozvojem nedoslýchavosti během dospívání (7).
- Sestřihové mutace vedou v lehký fenotyp (OI typ I), pokud dojde k zahr-

---

nutí intronu obsahujícího terminační kodon do mRNA, nebo pokud dochází při užití nových sestřihových míst ke vzniku předčasného terminačního kodonu. Je-li výsledkem sestřihových mutací exon skipping, pak mají za následek letální fenotyp OI tehdy, je-li daný exon 3 k exonu 13 (2).

- Mutace měnící smysl čtení kodonu - při substituci prvních 200 aminokyselinových zbytků v alfa 1(I) řetězcích neletální fenotyp OI (typ I, IV). Substituce v oblastech 691-823bp a 910-964bp mají vždy za následek letální fenotyp OI (typ II a III) (8). Při substituci glycinu v prvních 85-90 aminokyselinových zbytcích N-terminální oblasti je výsledkem vzácný fenotyp OI/EDS (3).

Z celkového mutačního spektra bylo dodnes identifikováno pouhých 10 % mutací měnících smysl čtení kodonu pro glycin. Proto je důležité v budoucnu odhalit co možná nejvyšší počet mutací pro zjištění jejich vlivu na výsledný fenotyp pacientů s OI.

### Poznámka

*Tato práce vznikala s vyhradní podporou Centra biomedicínské informatiky AV ČR, č. uděleného projektu MŠMT ČR: 1M06014*

### Literatura

1. BYERS, P. H. Osteogenesis imperfecta. In: Royce, P. M., Steinmann, B. Connective Tissue and Its Heritable Disorders: Molecular, Genetic, and Medical Aspects. 1993. s. 317-350
2. BYERS, P.H., COLE, W.G. Osteogenesis imperfecta. In: Royce P.M. and Steinmann B. (eds.) Connective Tissue and Its Heritable Disorders: Molecular, Genetic, and Medical Aspects. 2002. s. 385-430
3. CABRAL a kol. Prolyl 3-hydroxylase 1 causes a recessive metabolic bone disorder resembling lethal/severe osteogenesis imperfecta. *Nat. Genet.* 2007. 39(3). s. 359-365
4. DALGLEISH, R. The human type I collagen mutation database. *Nucleic. Acids. Res.* 1997. 25, s. 181-187
5. FLEISCH, H. Bisphosphonates: mechanism of action. *Endocrine Rev.* 1998. 19, s. 80-100
6. GAJKO-GALICKA, A. Mutations in type I collagen genes resulting in osteogenesis imperfecta in humans. *Arch. Biochim. Pol.* 2002. 49, s. 433-411
7. HARTIKKA H., KUURILA K., KÖRKKÖ J, KAITILA I., GRÉNMAN R., PYNNÖNEN S., HYLAND J.C., ALA-KOKKO L. Lack of correlation between the type of COL1A1 or COL1A2 mutation and hearing loss in osteogenesis imperfecta patients. *Hum Mutat.* 2004. 24(2), s. 147-54.
8. MARINI, J.C. a kol. Consortium for Osteogenesis Imperfecta Mutations in the Helical Domain of Type I Collagen: Regions Rich in Lethal Mutations Align With Collagen Bonding Site for Integrins and Proteoglycans. *Human Mutation.* 2007. 28(3), s. 209-221
9. MORELLO a kol. CRTAP is required for prolyl-3-hydroxylation and mutations cause recessive osteogenesis imperfecta. *Cell.* 2007. 127(2), s. 291-304
10. PROKOP, D.J., KUIVANIEMI, H. and TROMP, G. Molecular basis of osteogenesis imperfecta and related disorders of bone. *Clin. Plast. Surg.* 1994. 21, s. 407-413
11. REDFORD-BADWAL, D. A., STOVER, M. L., VALLI, M., MCKINSTRY, M. B. AND ROWE. Nuclear retention of COL1A1 messenger RNA identifies null causing mild osteogenesis imperfecta. *J. Clin. Invest.* 1996. 97, s. 1035-1040
12. ROUGHLEY, P.J., RAUCH, F., and GLORIEUX, F.H. Osteogenesis imperfecta - clinical and mole-

---

cular diversity. *European Cells and Materials*. 2003. 5, s. 41-47

13. WILLIAMS, C.J., PROKOP, D.J. Synthesis and processing of a type I procollagen containing shortened pro-alpha-1(I) chains by fibroblasts from a patient with osteogenesis imperfecta. *J. Biol. Chem.* 1983. 258, s. 5915-5921

14. WILLING, M.C. a kol. Osteogenesis imperfecta type I: molecular heterogeneity for COL1A1 null alleles of type I collagen. *Am. J. Hum. Genet.* 1994. 55, s. 638-647