

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.¹, Mazurová F.³, Mazura I.²

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

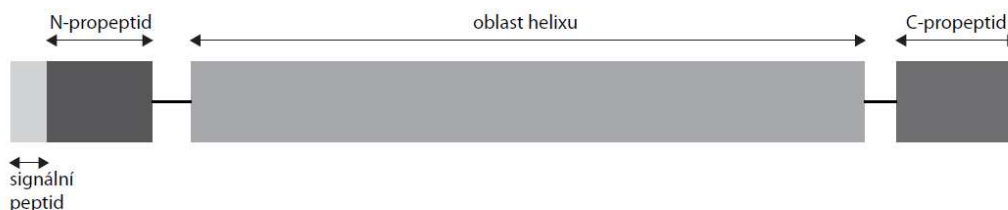
Tabulka 2: Klinické rysy nekolagenních forem OI (11)

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 promotorové 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 postižující 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) řetězcích 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) řetězcích ze 73 % letální X v alfa 2(I) řetězcích letální v 17 % případů) (8).

Korelace genotyp-fenotyp u pacientů s diagnózou OI

V několika posledních letech je patrna 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