

Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra antropologie a genetiky člověka



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

Bakalářská práce

Lucie Šormová

Praha 2008


Vedoucí bakalářské práce : Doc.RNDr. Ivan Mazura, CSc.

## Prohlášení

„ Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně  
s použitím uvedené literatury a pramenů. “

V Praze dne 24.dubna 2008

Lucie Šormová

  
.....

## Poděkování

Ráda bych poděkovala všem , kteří se podíleli na vzniku této bakalářské práce. Především děkuji panu Doc.RNDr. Ivanu Mazurovi, CSc. za cenné podněty k této práci, poskytnutí podkladů a za ochotu při konzultacích mé bakalářské práce .

## Obsah

<b>1. Abstrakt</b> .....	<b>5</b>
<b>2. Úvod</b> .....	<b>7</b>
<b>3. Klinický obraz poruchy – Osteogenesis imperfecta (OI)</b> .....	<b>8</b>
<b>3.1 Formy choroby</b> .....	<b>8</b>
3.1.1 <i>Osteogenesis imperfecta typ I</i> .....	<b>8</b>
3.1.2 <i>Osteogenesis imperfecta typ II</i> .....	<b>9</b>
3.1.3 <i>Osteogenesis imperfecta typ III</i> .....	<b>10</b>
3.1.4 <i>Osteogenesis imperfecta typ IV</i> .....	<b>11</b>
3.1.5 <i>Osteogenesis imperfecta typ V</i> .....	<b>11</b>
3.1.6 <i>Osteogenesis imperfecta typ VI</i> .....	<b>12</b>
3.1.7 <i>Osteogenesis imperfecta typ VII</i> .....	<b>12</b>
3.1.8 <i>Osteogenesis imperfecta typ VIII</i> .....	<b>13</b>
<b>4. Molekulární patogeneze</b> .....	<b>13</b>
<b>4.1 Molekulární podstata lehké formy OI (typ I)</b> .....	<b>14</b>
<b>4.2 Molekulární podstata vážných forem OI (typ II, III, IV)</b> .....	<b>14</b>
<b>4.3 Molekulární podstata nově vyčleněných forem OI (typ V, VI, VII, VIII)</b> .....	<b>14</b>
<b>4.4 Testovací metody užívané u genetické poruchy Osteogenesis imperfecta</b> .....	<b>14</b>
4.4.1 <i>Biochemický test kolagenu</i> .....	<b>15</b>
4.4.2 <i>Molekulárně genetické testování</i> .....	<b>16</b>
4.4.3 <i>Prenatální testování</i> .....	<b>17</b>
<b>5. COL1A1 – struktura</b> .....	<b>17</b>
<b>5.1 Struktura genu COL1A1</b> .....	<b>18</b>
<b>5.2 Primární struktura proteinu COL1A1</b> .....	<b>19</b>
<b>5.3 Formace alpha řetězce</b> .....	<b>20</b>
<b>5.4 Trojrozměrná struktura proteinu COL1A1</b> .....	<b>21</b>

<b>6. Typy mutací nalezených v COL1A1</b> .....	<b>22</b>
<b>6.1 Základní dělení mutací</b> .....	<b>22</b>
<b>6.2 Diverzita mutací v COL1A1</b> .....	<b>24</b>
<b>7. Kvalita molekuly kolagenu</b> .....	<b>25</b>
<b>7.1 Oblastí ovlivňující kvalitu molekul kolagenu typ I</b> .....	<b>26</b>
7.1.1 Oblast promotoru genu COL1A1 .....	27
7.1.2 Mutace v oblastech CpG dinukleotidů .....	27
7.1.3 Mutace postihující kodony glycinu .....	28
7.1.4 Mutace v oblastech sestřihových míst pre-mRNA .....	29
<b>8. Korelace genotyp-fenotyp u osob s diagnózou OI</b> .....	<b>30</b>
<b>8.1 Korelace genotyp-fenotyp u pacientů s OI typ I</b> .....	<b>30</b>
<b>8.2 Korelace genotyp-fenotyp u pacientů s OI typ II, III, IV</b> .....	<b>31</b>
<b>8.3 Korelace genotyp-fenotyp u pacientů s diagnózou OI</b> .....	<b>31</b>
<b>9. Závěr</b> .....	<b>34</b>
<b>10. Seznam použité literatury</b> .....	<b>35</b>
<b>11. Internetové zdroje</b> .....	<b>40</b>
<b>11.1 Zahraniční internetové zdroje</b> .....	<b>40</b>
<b>11.2 České internetové zdroje</b> .....	<b>40</b>

## 1. Abstrakt

Osteogenesis imperfecta je dědičné onemocnění člověka, postihující především pohybový aparát, a je charakteristické křehkými kostmi a zvýšenou náchylností ke zlomeninám. Jedná se o poruchu kolagenu, typu I, která je popisována ve všech populacích bez ohledu na věk, pohlaví, národnost či etnickou skupinu. Pouze diagnostika nemoci se liší podle věku postiženého jedince. Postihuje, uvažujeme-li všechny dosud popsané typy choroby I-VIII, přibližně každého 6-7/100 000 obyvatel (Sillence 1979). V současnosti je popisováno celkem osm klinicky odlišných typů Osteogenesis imperfecta, přičemž poslední typ, typ VIII, byl objeven a popsán teprve nedávno. První čtyři typy jsou považovány za základní, neboť u nich byly nalezeny mutace v genech kolagenu typ I, zatímco u typů V-VIII nebyly tyto mutace zjištěny. Proto je možné, že v budoucnu budou typy V-VIII ze skupiny OI vyřazeny. Příčinou tohoto onemocnění jsou mutace v genech kolagenu typ I, COL1A1 a COL1A2, jejichž výsledným efektem je snížená nebo strukturálně chybná tvorba kolagenu, hlavní složky pojivové tkáně. OI typ I-IV se projevuje klinickými znaky charakteristickými pro jednotlivé typy choroby, jako je malý vzrůst, modré skléry, zvýšená četnost fraktur, deformace kostí a další. Mortalita pacientů je typická především pro typ II, kdy nastává úmrtí často v prenatálním období nebo během prvních deseti dnů života kojence. Letální formou OI je dále OI typ III, ovšem pacienti postižení tímto typem mají vyšší šanci na přežití perinatálního období, nežli pacienti afektovaní OI typ II (Roughley, 2003).

Bakalářská práce je zaměřena na strukturu a funkci kolagenové molekuly, typu I (především jejího alfa 1 řetězce, který je kódován genem COL1A1) a vliv změn v genu COL1A1 na expresi defektních kolagenových proteinů u osob s diagnózou osteogenesis imperfecta. Tato práce se věnuje podstatě vzniku této choroby, jejím příčinám a formám. Zejména se zaměřuje na hledání souvislostí mezi typem mutace a fenotypem pacientů s diagnózou OI.

Cílem této bakalářské práce je snaha o nalezení závislosti fenotypu postižených jedinců na typu a umístění mutace v COL1A1 genu. Velká fenotypová variabilita onemocnění Osteogenesis imperfecta je výsledkem různorodosti mutací v genu COL1A1.

**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, regardless of age, sex, nationality or races. Only diagnostics diseases odd according to age affected individuals. Prevalence considering all types is approximately each of 6 - 7/100 000 inhabitant (Sillence 1979). 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, while at forms V-VIII these mutations were not detected. Therefore it is possible that in the future the forms V-VIII will not be included in Osteogenesis imperfecta. Causes of this disorder are mutations in genes of collagen type I (COL1A1 and COL1A2) and their resulting effect is decreased or structurally poor production of collagen, the major component connective tissue. For the types I-IV of OI are characteristic clinical features typical for individual forms this disorder, as small growth, blue sclera, increased frequency of fractures, deformations of bones etc.. The mortality is typical especially for the type II, when the death occurs often in the prenatal periode or when the infants die during first ten days of their lives, less for the type III (Roughley, 2003).

The object of this work is structure and function molecule of collagen type I (especially alpha 1 chain, coded by gene COL1A1) and effects of changes in gene COL1A1 in expression of defective molecules of collagen near persons with diagnosis Osteogenesis imperfecta. This work is devoted to the substance of rise, course and forms of Osteogenesis imperfecta. It especially directs to detecting dependence between mutation type and phenotype patients with diagnosis OI.

The goal of this work is the endeavour to detect phenotype-genotype relationship at affected individuals. The diversity of mutations in the gene COL1A1 is the cause of the great phenotypic variability.

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

## 2. Úvod

Kolageny tvoří největší skupinu živočišných bílkovin. Představují přibližně jednu čtvrtinu všech proteinů a jsou hlavní složkou pojivové tkáně, tedy kostí, chrupavek, šlach, vaziva a kůže, ale také cévních stěn, bazálních membrán rohovek či jiných orgánů těla. V současnosti je známo 27 druhů kolagenu (<http://www.grc.org/programs.aspx?year=2005&program=collagen>). Molekuly těchto proteinů se skládají především z aminokyselin glycinu, prolinu, hydroxyprolinu a hydroxylysinu a jsou tvořeny třemi alpha řetězci, vytvářející trojitou spirálu, tzv. tropokolagen. Molekula kolagenu typ I je tvořena dvěma řetězci alpha1 a jedním řetězcem alpha2. Uspořádání molekul vytváří specifické vlastnosti jednotlivých typů kolagenu a jakákoliv změna uvnitř této struktury má zásadní vliv na funkci proteinu. Tyto změny nazýváme mutacemi a jedná se nejčastěji o substituce aminokyselin, delece, inserce, duplikace, posunové mutace, splice-site mutace, missense mutace, exon-skipping mutace. Mutace vyvolávají tzv. kolagenové poruchy, charakteristické patologickými degradovanými formami kolagenu, tzn. strukturálně změněnými formami kolagenu či sníženým množstvím strukturálně nezměněného kolagenu. Mezi kolagenové poruchy řadíme např. Osteogenesis imperfecta, Ehlers-Danlos syndrom, Osteoporosis pseudoglioma syndrom, Dentinogenesis imperfecta, Caffey choroba, Bruck syndrom a další.

Osteogenesis imperfekta typ I-IV je vyvolána mutacemi v genech kolagenu typ I, tedy v COL1A1 a COL1A2. Tyto mutace vyvolávají buď sníženou tvorbu strukturálně nepostiženého kolagenu, nebo tvorbu abnormálních molekul kolagenu. Gen COL1A1, kódující řetězec alpha 1 kolagenu I, je lokalizován na chromosomu 17, vyskytuje se hojně v kostech, kůži, chrupavkách a šlachách a jeho mutace způsobují poruchu, označovanou jako Osteogenesis imperfecta typ I-IV, Ehlers-Danlos syndrom, Caffey chorobu a idiopatickou osteoporózu.

Mutace v genech kolagenů způsobujících Osteogenesis imperfecta jsou předmětem celé řady výzkumných projektů. V současné době neexistuje léčba, která by mohla účinně ovlivnit tvorbu kolagenových molekul. Postiženým je poskytována pouze léčba pro omezení počtu zlomenin a zvýšení funkčnosti pojivové tkáně. Zároveň je studována terapie prostřednictvím bisfosfonátů, snižujících resorpci kostní tkáně a riziko zlomenin a zvyšujících minerální densitu kostní tkáně a pevnost svalů (Fleisch, 1998).



### 3. Klinický obraz poruchy – osteogenesis imperfecta (OI)

Osteogenesis imperfecta, označovaná též jako nemoc křehkých kostí, je geneticky vázaná choroba postihující tvorbu kolagenu, hlavního proteinu pojivové tkáně. Dosud bylo identifikováno široké spektrum klinických znaků, popisujících tuto chorobu, které se liší nejen mezi jednotlivými typy OI, ale zároveň také uvnitř těchto typů onemocnění. Pacienti se stejným typem OI mohou tudíž mít odlišnou klinickou prezentaci choroby, a to dokonce i v rámci jedné rodiny. Zároveň se znaky typické pro určitý typ OI nemusí objevovat u každého jedince s daným typem choroby.

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

Prvotní klasifikace Osteogenesis imperfecta byla založena právě na základě klinických příznaků onemocnění. Uvedl ji Sillence roku 1979, který definoval čtyři typy, OI I-IV. Teprve využitím dalších nových technik odhalujících molekulární příčiny onemocnění, jako je histomorfometrie kostí či molekulárně genetická charakterizace, byly v rámci skupiny OI typu IV objeveny nové formy Osteogenesis imperfecta. U těchto nových forem OI, popsanych jako typ V-VIII, nebyla identifikována mutace v genech kolagenu typ I. Došlo tudíž k rozšíření původní klasifikace o další typy (typ V – VIII) na dnešních osm skupin OI.

(<http://www.grc.org/programs.aspx?year=2005&program=collagen>)

#### 3.1 Formy choroby

##### 3.1.1 Osteogenesis imperfecta typ I

OI typ I je považována za nejlehčí a nejběžnější formu tohoto onemocnění. Pacienti s diagnózou OI typ I se vyznačují normálním, nebo normálu se blížícím, vzrůstem. Přítomnost zlomenin se mění během života. První zlomeniny se objevují po narození dítěte a poté během několika prvních let života, kdy se dítě učí pohybovat. Následně dochází ke snižování počtu zlomenin během puberty a dospělosti. Opětné zvýšení frekvence zlomenin nastává u žen v postmenopauzálním období a u mužů po dosažení šedesáti let života. Deformace kostí není obvyklá ani při narození, ani po zhojení zlomenin. Klouby pacientů jsou hypermobilní a svalstvo značně ochablé. Dalším častým znakem OI typ I jsou modré či šedé skléry, přičemž intenzita barvy se v průběhu života snižuje. Pacienti postižení touto formou nemoci mohou zároveň trpět onemocněním zvaným Dentinogenesis imperfecta, způsobujícím charakteristický obraz zubů a jejich předčasné vypadávání. Po dvacátém roku života dochází k postupné ztrátě sluchu (Roughley, 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)).



Obr.č.1: Modré skléry pacientů s diagnózou OI typ I;  
(Převzato z <http://www.molvis.org/molvis/v13/a39/v13a39f2.jpg>)

### 3.1.2 *Osteogenesis imperfecta typ II*

Tento typ je vážnou formou OI. Vyznačuje se extrémně nízkou densitou kostí a deformacemi skeletu. Zlomeniny jsou obvyklé již během prenatálního vývoje, a to především zlomeniny dlouhých kostí a žeber. Jedinci postižení OI typu II jsou **podprůměrného vzrůstu**. Lebka je v porovnání s tělem velká a měkká. Končetiny jsou krátké, hrudník malý a žebra málo stabilní. Při histologickém vyšetření kostí jedinců s tímto typem OI je prokázáno snížené množství kolagenu v kostech kortikálních a trabekulárních. (Roughley, 2003) Plíce jedinců jsou nedovyvinuté, což je častou příčinou úmrtí. U těhotných žen, u jejichž plodu byla diagnostikována OI typ II, dochází velmi často ke spontánním potratům. Při narození postiženého dítěte je naděje na dožití velice nízká. Úmrtí je běžné během prvních deseti dnů života (perinatální období). Obvykle umírá 60% kojenců během prvního dne života, 80% kojenců během prvního týdne života (Byers, 1988). Naděje dožití jednoho roku je mizivá.



Obr.č.2: Deformace kostí u kojence postiženého OI typ II;  
(Převzato z <http://library.med.utah.edu/WebPath/jpeg3/PERI022.jpg>)

### 3.1.3 Osteogenesis imperfecta typ III

Osteogenesis imperfecta typ III je nejtěžším typem OI. Zlomeniny jsou běžné již při narození dítěte a jsou způsobeny pouhou manipulací s novorozencem. Po rentgenovém vyšetření jsou viditelné zhojené zlomeniny, k nimž došlo v prenatálním vývoji. Všeobecně vykazují fraktury kostí u jedinců postižených OI typu III nejvyšší četnost v průběhu celého života. Tento typ choroby je charakteristický **deformacemi kostí** (Roughley, 2003) a **hypermobilitou kloubů končetin**. Někteří pacienti jsou z důvodu velice křehkých kostí a vážných deformit kostí upoutáni celý život na vozík. Částečným řešením jejich situace jsou běžné chirurgické zákroky zavádějící do kostí výstuže. Hrudní koš je často soudkovitého tvaru a omezuje dobrou funkčnost plic, což bývá častou příčinou úmrtí kojenců. Všeobecně je naděje na dožití při narození dítěte vyšší než u předchozího typu Osteogenesis imperfecta, typu II. Často je u pacientů s OI typ III diagnostikována **Dentiogenesis imperfecta**. **Skléry** jsou při narození jedince **modré** nebo **šedé**, s přibývajícím věkem ovšem zesvětlají. **Vzrůst** postižených je v porovnání s tělesnými výškami jedinců postižených odlišnými známými formami OI **nejmenší** a může se pohybovat pouze kolem jednoho metru. **Nedoslýchavost** se objevuje velice brzy, a to již po desátém roce života. Dalším obvyklým znakem O.i. typ III je **basilární imprese** (b.i.), která je výsledkem poklesu lebky na krční páteř. Mezi symptomy b.i. patří bolesti hlavy, brnění v šíji (Lehrmittův znak), snížená citlivost středního předloktí, brnění čtvrtého a pátého prstu. V nezávažnějších případech způsobuje ochrnutí končetin (Sillence, 1993). Osteogenesis imperfecta typ III vykazuje velkou heterogenitu mezi jednotlivými pacienty, z čehož vyplývá, že výše uvedené charakteristiky tohoto typu onemocnění nejsou typické pro každého postiženého jedince. (<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>)

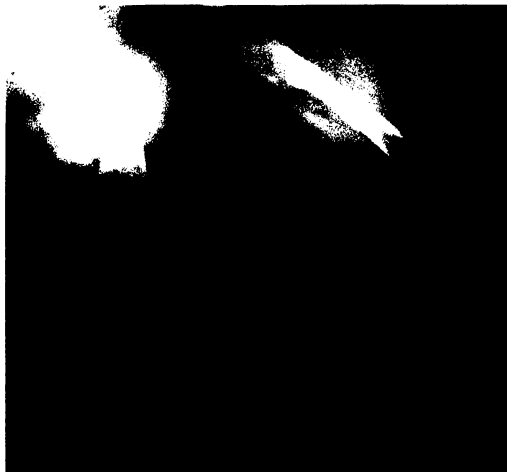


Obr.č.3: Deformace kostí u kojence s diagnózou OI typ III;

(Převzato z <http://jmg.bmj.com/content/vol37/issue5/images/large/99234.f1.jpeg>)

### 3.1.4 Osteogenesis imperfecta typ IV

Tato forma choroby vykazuje nejvyšší heterogenitu. V rámci této skupiny se objevují jedinci postižení jak lehkou, tak vážnější formou onemocnění. Tito pacienti nesplňují kritéria pro výše uvedené typy Osteogenesis imperfecta (Roughley, 2003). **Vzrůst** je obecně **podprůměrný**. Četnost zlomenin je nižší než u OI typu III. U pacientů s vážnější formou OI IV se zlomeniny objevují již při narození jedince. **Deformace kostí** je málo běžná, **mírná** a objevuje se zejména u dlouhých kostí dolních končetin. Hrudní koš má soudkový tvar. Pacienti jsou postiženi mírnější formou **Dentiogenesis imperfecta**. Barva **sklér** je **našedlá**, blíží se k bílému zbarvení, a obvykle postupem času zesvětluje. **Ztráta sluchu** nenastává u každého jedince postiženého Osteogenesis imperfecta typu IV. (Byers, 1992)



Obr.č.4: Deformace dolních končetin u kojence s diagnózou OI typ IV;  
(Převzato z <http://www.hawaii.edu/medicine/pediatrics/pemxray/v6c02a.jpg>)

### 3.1.5 Osteogenesis imperfecta typ V

OI typ V byl původně považován pro **podprůměrný vzrůst** postižených jedinců a charakteristiku zlomenin za typ I nebo III (Byers, 1992). Vyznačuje se zvýšenou křehkostí kostí a **mírnými deformacemi** (Glorieux, 2002). Pro tento typ choroby jsou charakteristické tyto rysy, odlišující jej od typu III a IV : 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 s diagnózou OI typu V mají **bílé skléry**, netrpí nedoslýchavostí ani Dentiogenesis imperfecta (Byers, 1992).



Obr.č.5: Deformace kostí horních končetin u pacienty s OI typ V;

(Převzato z <http://www.altavista.com/image/results?itag=ody&q=OI+type+V&mik=photo&mik=graphic&mip=all&mis=all&miwxh=all>)

### 3.1.6 Osteogenesis imperfecta typ VI

Klinické rysy OI typ VI se podobají znakům OI typ IV (Byers, 1992). Pacienti se vyznačují lehce **podprůměrným vzrůstem**, **mírnou deformací kostí** a frekvencí zlomenin jako u pacientů postižených OI typ IV. **Běльмо je bílé**, není přítomna ani Dentiogenesis imperfecta, ani ztráta sluchu. Hlavními odlišujícími znaky jsou vzhled lamel kostí, podobajících se rybím šupinám, a nedostatečně pevná kostní tkáň (Roughley, 2003).

### 3.1.7 Osteogenesis imperfecta typ VII

Hlavním znakem tohoto typu je **rhizomelické zkrácení femuru a humeru** (Ward, 2002). Jedinci postižení OI typu VII mají **lehké deformace kostí**, četné zlomeniny a mírně **podprůměrný vzrůst**. Stejně jako u předchozího typu, tedy typu VI, není u jedinců s OI typ VII přítomna Dentiogenesis imperfecta a nedoslýchavost a jejich **skléry** jsou klasicky **bílé**.

Nejdůležitějším znakem ovšem je způsob dědičnosti tohoto typu OI. Formy OI I-IV jsou děděny autosomálně dominantní dědičností, dědičnost Osteogenesis imperfecta typu VI není zcela jistá. OI typ VII je na rozdíl od těchto ostatních typů dědičná **autosomálně recesivně** (Byers, 1992).

### 3.1.8 Osteogenesis imperfecta typ VIII

OI typ VIII je nedávno popsaným typem tohoto onemocnění, jež je děděno, stejně jako předchozí typ VII, **autosomálně recesivně**. Klinické symptomy se podobají znakům OI typ II a III. Odlišné je ovšem zbarvení **bělma**, které je u typu VIII **bílé**. ([www.niams.nih.gov/Health\\_Info/Bone/Osteogenesis\\_Imperfecta/default.asp](http://www.niams.nih.gov/Health_Info/Bone/Osteogenesis_Imperfecta/default.asp))

## 4. Molekulární patogeneze

Kolagen typ I je přítomen v kůži, kostech, šlachách a mutace genů (COL1A1 a COL1A2) kódujících tento typ kolagenu jsou odpovědné za 90% případů Osteogenesis imperfecta. Gen COL1A1 kóduje řetězec pro-alpha 1 kolagenu typ I. V každé molekule kolagenu typ I jsou dva alfa 1 řetězce. Gen COL1A2 kóduje řetězec pro-alpha 2 kolagenu typ I, který se vyskytuje, oproti řetězci pro-alpha 1, v jediné kopii v každé molekule kolagenu typ I. Následkem mutací kolagenu typ I je buď snížená produkce prokolagenu typ I, nebo tvorba abnormálních, tedy strukturálně poškozených, molekul prokolagenu typ I (<http://ghr.nlm.nih.gov/condition=osteogenesisimperfecta>).

Genové mutace spojované s O.i.		
Typ OI	COL1A1 mutace	Charakteristika
I	běžná	často mutace měnící kodon – tvorba null alel
II	běžná	často nesmyslná či posunová mutace nejčastěji v C-koncové oblasti triple helixu řetězců kolagenu, měnící strukturu molekul kolagenu
III	běžná	často nesmyslná či posunová mutace nejčastěji ve střední části triple helixu řetězců kolagenu, měnící strukturu molekul kolagenu
IV	běžná	často nesmyslná či posunová mutace nejčastěji ve střední části triple helixu řetězců kolagenu, měnící strukturu molekul kolagenu
V	chybí	
VI	chybí	
VII	chybí	recesivní, chromozom 3p22 24.1

Obr.č.6: Mutace genu COL1A1 způsobující Osteogenesis imperfecta; (Převzato z Roughley, 2003; <http://www.cmj.hr/2001/42/4/11471191.pdf>)

#### **4.1 Molekulární podstata lehké formy OI (typ I)**

Pro OI typ I je charakteristická redukováná tvorba kolagenu typ I, vyvolaná především mutacemi v genech COL1A1. Běžným znakem pro tento typ onemocnění jsou tzv. „null alely“, vytvořené mutacemi měnícími pouze kodon, nikoliv strukturu molekul kolagenu (Willing, 1994). Jedná se především o tyto mutace: delece či inserce nukleotidů (počtu nedělitelným třemi) exonů v genech kolagenu, a dále o splice-site mutace, jejichž výsledkem je přítomnost intronů v sekundární struktuře mRNA s následným přerušением tvorby kolagenu. Všechny tyto mutace mají za následek sníženou produkci pro-alpha 1(I) řetězců v důsledku snížené tvorby COL1A1 mRNA zmutovanou alelou zhruba na jednu polovinu původního množství, a tedy snížení tvorby prokolagenu typ I normální struktury. Výsledně snížené množství kolagenu typ I je odpovědné za sníženou densitu kostí, charakteristickou pro Osteogenesis imperfecta. Ovšem zároveň bylo prokázáno, že fenotyp OI typ I mohou vyvolat i mutace méně běžné pro tento typ choroby, a to substituce aminokyselin v alpha 1(I) řetězcích (Willing, 1994), měnící strukturu prokolagenu typ I (Byers, 1993).

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

Molekulární podstatou vážnějších forem Osteogenesis imperfecta, tedy OI typu II, III a IV, jsou mutace, které mají za následek změnu struktury molekul prokolagenu typ I. Nejčastěji se jedná o mutace způsobující substituce glycinu v oblasti triple helixu pro-alpha řetězců. Dojde-li k jeho nahrazení, poškodí se formace trojšroubovice, což je pravděpodobně hlavním důvodem posttranslačních modifikací, a může dojít k situaci, že některé složené trimetry nebudou vyloučeny (Steinmann, 1984). Výsledkem je tudíž molekula kolagenu o abnormální struktuře. Počet postižených molekul se liší dle toho, jedná-li se o mutaci v genech COL1A1 nebo COL1A2. Na pozicích X a Y se nejběžněji nenalézají prolin, hydroxyprolin, tryptofan a tyroxin.

U vážných typů Osteogenesis imperfecta dále dochází k delecím, jež mají za následek zkrácení pro-alpha 1 (I) řetězců, duplikacím buď jednotlivých aminokyselin, nebo Gly-X-Y tripletů, či k „vyskočení“ exonů. Všechny tyto mutace mají negativní vliv na následnou formaci řetězců do trojšroubovice (Williams, 1983).

#### **4.3 Molekulární podstata nově vyčleněných forem OI (typ V, VI, VII, VIII)**

Mutace mající za následek Osteogenesis imperfecta typu V, VI, VII a VIII nejsou nalézány v genech kolagenu typ I.

Formy, jež jsou přenášeny autosomálně recesivní dědičností, tedy typ VII a VIII, jsou výsledkem mutací v genech CRTAP a LEPRE1. CRTAP geny kódují chrupavkový protein, zodpovědný za prolyl 3-hydroxylaci kolagenu typ I a II a jejich mutace způsobují fenotyp OI typ VII (Morello, 2006). Částečná funkčnost tohoto genu vede k mírným symptomům, ovšem úplná absence je letální. Gen LEPRE1 poskytuje instrukce pro tvorbu enzymu prolyl 3-hydroxyláza 1 (P3H1), který hydroxyluje prolin obsažený v alpha 1 řetězci molekul kolagenu typ I. Tato hydroxylace je důležitá pro normální skládání kolagenu a jeho následné uvolňování do extracelulární matrix. Mutace v genu LEPRE1 mají za následek tvorbu nefunkčního enzymu P3H1, což se následně projevuje fenotypem OI typu VIII (Cabral, 2007). Mutace obou těchto genů postihují normální skládání, shromažďování a vylučování molekul kolagenu. V důsledku toho dochází ke snížení kostní hmoty a k deformacím kostí.

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

#### **4.4 Testovací metody užívané u genetické poruchy *Osteogenesis imperfecta***

Chorobu *Osteogenesis imperfecta* je obtížné diagnostikovat pouze jedním univerzálním testem. Testů je proto prováděno několik, přičemž lékaři zároveň přihlížejí na historii rodiny, historii lékařských záznamů, rentgenové snímky či na výsledky antropometrických testů, posuzujících např. tvar lebky, tvar obličeje, zbarvení sklér, stav chrupu, sluchu, tvar hrudníku, tvar dlouhých kostí, výšku a váhu pacientů a další morfometrické znaky ([http://www.niams.nih.gov/Health\\_Info/Bone/Osteogenesis\\_Imperfecta/nurses\\_guide.asp#Diagnosis](http://www.niams.nih.gov/Health_Info/Bone/Osteogenesis_Imperfecta/nurses_guide.asp#Diagnosis)).

Prostřednictvím následujících testů lze identifikovat mutace či množství kolagenu u pacienta s podezřením na *Osteogenesis imperfecta*. Získání výsledků testů trvá několik týdnů. V některých případech může nastat, že výsledky z těchto testů jsou negativní. To ovšem nevylučuje možnost onemocnění OI, neboť přítomná mutace kolagenu typ I nemusela být detekována dostupnými laboratorními testy.

##### **4.4.1 Biochemický test kolagenu**

Jedná se o analýzu kolagenu typ I produkovaného kožními fibroblasty získanými biopsií kůže. Tyto testy ukazují strukturu a množství kolagenu typ I a vyžadují odebrání vzorku kůže pro morfologické vyšetření po lokálním umrtvení. Citlivost biochemických testů je u neletálních forem OI 87%, u letálních forem 98%.

(<http://www.grc.org/programs.aspx?year=2005&program=collagen>)



#### 4.4.2 Molekulárně genetické testování

Tento typ testů se používá pro potvrzení diagnózy OI v postnatálním období života jedince, nebo při prenatální diagnóze OI. Pro provedení těchto testů je třeba odebrat vzorky krve nebo kůže. V rámci těchto testů je prováděna:

- sekvenční analýza genů COL1A1 a COL1A2 cDNA pro identifikaci mutací v kódující sekvenci
- sekvenční analýza genů COL1A1 a COL1A2 gDNA pro identifikaci mutací mimo kódující oblasti

Prostřednictvím těchto testů mohou být objeveny pozměněné sekvence již známé, ale také nové mutace neznámého klinického významu. Pokud testy neodhalí žádnou změnu, může být důvod následující:

- mutace není přítomna v daném testovaném genu
- mutaci nelze identifikovat sekvenční analýzou (může se jednat např. o rozsáhlé delece)
- mutace je přítomna v nekódujících oblastech

(<http://www.grc.org/programs.aspx?year=2005&program=collagen>)

<b>Molekulárně genetické testování užívané pro diagnózu onemocnění O I</b>			
<b>Testovací metoda</b>	<b>Nalezené mutace</b>	<b>Procentuální objevení mutace</b>	<b>Vhodnost testu</b>
<b>cDNA sekvenční analýzy</b>	<b>missense mutace</b> (náhrada 1bp, měnící smysl kodónu při čtení) <b>malé inserce či delece exon-skipping mutace</b> v genech COL1A1 a COL1A2	O.i. Typ I - 100% O.i. Typ II - 98% O.i. Typ III - 60-70% O.i. Typ IV - 70-80%	<b>Klinické testování</b>
<b>gDNA sekvenční analýzy</b>	<b>nonsense mutace</b> (nahrazení páru bází, které předčasně zastaví translaci aminokyselin) <b>missense mutace</b> <b>splice-site mutace</b> (mění nebo ruší specifickou sekvenci označující místo splétání intronů)		

Obr.č.7: Molekulárně genetické testování užívané při O.I.;

(Převzato z <http://www.grc.org/programs.aspx?year=2005&program=collagen>)

#### 4.4.3 Prenatální testování

Provádí se u rodičů, z nichž jeden je nositelem dědičného onemocnění Osteogenesis imperfecta, a je prováděno následujícími způsoby:

- ultrazukové vyšetření – detekce letálních a vážných forem OI do dvacátého týdne těhotenství (abnormality kostí jsou viditelné ve 13.-14. týdnu prenatálního vývoje u OI typu II, při poruše OI typ III jsou počáteční deformace kostí patrné v 17.-18. týdnu vývoje plodu)
- biochemická analýza (CVS) – analýza kolagenu ze vzorků choriových klků získaných biopsií choria. Provádí se v 10.-12. týdnu prenatálního vývoje. Touto metodou nelze identifikovat OI typ I, neboť během prenatálního vývoje se množství prokolagenu typ I produkované zdravým plodem blíží množství prokolagenu typ I, jež je běžně pozorováno u jedinců s OI typ I. V průběhu II. a III. trimestru těhotenství se provádí biochemická analýza vzorků odebraných z placenty.
- Molekulárně-genetické testování – analýza DNA fetálních buněk získaných amniocentézou. Tento způsob testování je vhodný pro detekci alely způsobující poruchu. Provádí se obvykle v 15.-18. týdnu těhotenství, tedy II. trimestru, odběrem 20ml plodové vody a následným vyšetřením buněk obsažených v plodové vodě. Časná amniocentéza se provádí před 15. týdnem těhotenství jako varianta CVS. Jejím negativem je zvýšené riziko poškození plodu z důvodu menšího objemu amniové tekutiny.

([www.porodnici.cz/prenatalni-diagnostika](http://www.porodnici.cz/prenatalni-diagnostika))

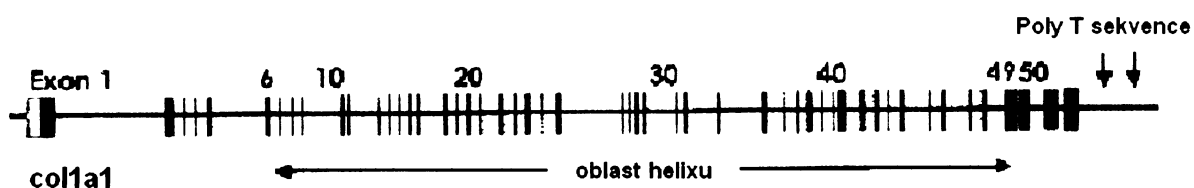
## 5. COL1A1 - struktura

Kolagen typ I je jedním z nejběžnějších typů fibrilárních kolagenů vyskytujících se v pojivové tkáni. Molekula kolagenu typ I je tvořena trojšroubovicí, která se skládá ze dvou alpha 1(I) řetězců a jednoho alpha 2(I) řetězce. Oba tyto řetězce jsou kódovány odlišnými geny, a to konkrétně geny COL1A1 a COL1A2. Gen COL1A1 dosahuje velikosti 18kb, je umístěn na chromozomu 17 v cytogenetickém pruhu 17q21.3–q22. Kóduje alpha 1 řetězec kolagenu typ I. Řetězec alpha 2 kolagenu typ I je kódován genem COL1A2, který je umístěn na dlouhých raménkách chromozomu 7 v cytogenetickém pruhu 7q21.3–q22.1 a který dosahuje velikosti 38kb včetně intronových nepřekládaných oblastí genomické DNA (Kielty, 1993).

## 5.1 Struktura genu COL1A1

Gen COL1A1 je strukturální gen, jež kóduje primární strukturu proteinu COL1A1. Z hlediska struktury tohoto genu rozlišujeme tři oblasti:

- Promotor – oblast 3', obsahující signální sekvenci nukleotidů (TATA box nebo CAT box), které vážou transkripční faktory a RNA polymerázu pro spuštění transkripce (Rossow, 1987)
- Kódující sekvence genu – oblast kódující protein COL1A1
- Terminátor – oblast 5', obsahující terminální sekvenci (poly-T sekvence) a terminační kodony (TAA, TAG nebo TGA), signalizující konec transkripce (Bates, 1994)



Obr.č.8: Struktura genu col1a1;

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

Gen COL1A1 je sestaven z celkem 51 exonů a 50 intronů. Pro všechny exony námi popisovaného genu je typické, že dosahují velikosti násobku 9bp, nejčastěji 45bp a 54bp. Ve struktuře genu se objevují násobky 54bp, tj. 2x54bp, 3x54bp, nebo kombinace 45bp a 54bp (viz Obr.9). Každý z těchto exonů vždy začíná kodonem glycinu a končí pozicí Y repetitivních úseků Gly-X-Y. Z těchto 51 exonů pouze exony 6-49 kódující oblast helixu COL1A1 proteinu zůstanou zachovány v konečném alpha 1 řetězci kolagenu typ I (Dalglish, 1997). Oproti tomu, exony 1-5, které kódují oblast N-terminálního propeptidu, a exony 50, 51, kódující oblast C-terminálního propeptidu pro-alpha1(I) řetězců, jsou během procesu tvorby konečných alpha řetězců odštěpeny speciálními enzymy, jak je uvedeno níže ([http://www.le.ac.uk/genetics/collagen/COL1A1\\_numbering.pdf](http://www.le.ac.uk/genetics/collagen/COL1A1_numbering.pdf)).

Číslo exonu	Velikost bp	Kódované aminokyseliny	α1(I) cDNA čísla bází
6	72 <sup>a</sup>	1 – 3 <sup>a</sup>	654-662
7	45	4 – 18	663-707
8	54	19 - 36	708-761
9	54	37 - 54	762-815
10	54	55 - 72	816-869
11	54	73 - 90	870-923
12	54	91 - 108	924-977
13	45	109 - 123	978-1022
14	54	124 - 141	1023-1076

15	45	142 - 156	1078-1121
16	54	157 - 174	1122-1175
17	99	175 - 207	1176-1274
18	45	28 - 222	1275-1319
19	99	223 - 255	1320-1418
20	54	256 - 273	1419-1472
21	108	274 - 309	1473-1580
22	54	310 - 327	1581-1634
23	99	328 - 360	1635-1733
24	54	361 - 378	1734-1787
25	99	379 - 411	1788-1886
26	54	412 - 429	1887-1940
27	54	430 - 447	1941-1994
28	54	448 - 465	1995-2048
29	54	466 - 483	2049-2102
30	45	484 - 49	2103-2147
31	99	499 - 532	2148-2246
32	108	533 - 567	2247-2354
33	54	568 - 585	2355-2408
34	54	586 - 603	2409-2462
35	54	604 - 621	2463-2516
36	54	622 - 639	2517-2570
37	108	640 - 675	2571-2678
38	54	676 - 693	2679-2732
39	54	694 - 711	2733-2786
40	162	712 - 765	2787-2948
41	108	766 - 801	2949-3056
42	108	802 - 837	3057-3164
43	54	838 - 855	3165-3218
44	108	856 - 891	3219-3326
45	54	892 - 909	3327-3380
46	108	910 - 945	3381-3488
47	5	946 - 963	3489-3542
48	108	964 - 999	3543-3650
49	283 <sup>b</sup>	1000 - 1004 <sup>b</sup>	3651-3695

Obr.č.9: Exonová struktura oblasti triple-helixu kolagenu typ I;  
(Převzato z Dagleish, 1997)

<sup>a</sup>Exon 6 kóduje část N-propeptidu, celý N-telopeptid a první tři aminokyseliny oblasti helixu.

<sup>b</sup>Exon 49 kóduje posledních 15 aminokyselin oblasti triple-helixu, celý C-telopeptid a část C-propeptidu.

cDNA čísla bází jsou jen pro aminokyseliny oblasti triple-helixu.

## 5.2 Primární struktura proteinu COL1A1

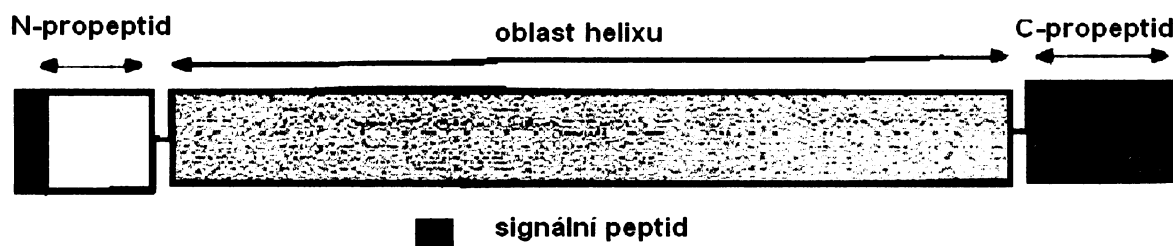
(<http://www.hypro.cz/hyRubrIn.aspx?intRubrKis=1251&intLang=0>)

Protein COL1A1 je produktem genu col1a1. Jeho primární strukturu (tzv. prepro-alpha řetězec) tvoří tři základní oblasti, jež lze dále dělit do několika podjednotek. Každé z těchto oblastí odpovídá určitý počet zbytků aminokyselin, jejichž uspořádání určuje strukturu

výsledného alfa 1 řetězce kolagenu typu I. V COL1A1 se vyskytuje celkem 1464 aminokyselinových zbytků:

Oblast COL1A1	Počet aminokyselinových zbytků
<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	

Obr.č.10: Zastoupení zbytků aminokyselin v jednotlivých doménách COL1A1 genu; (Převzato z Dalglish, 1997)

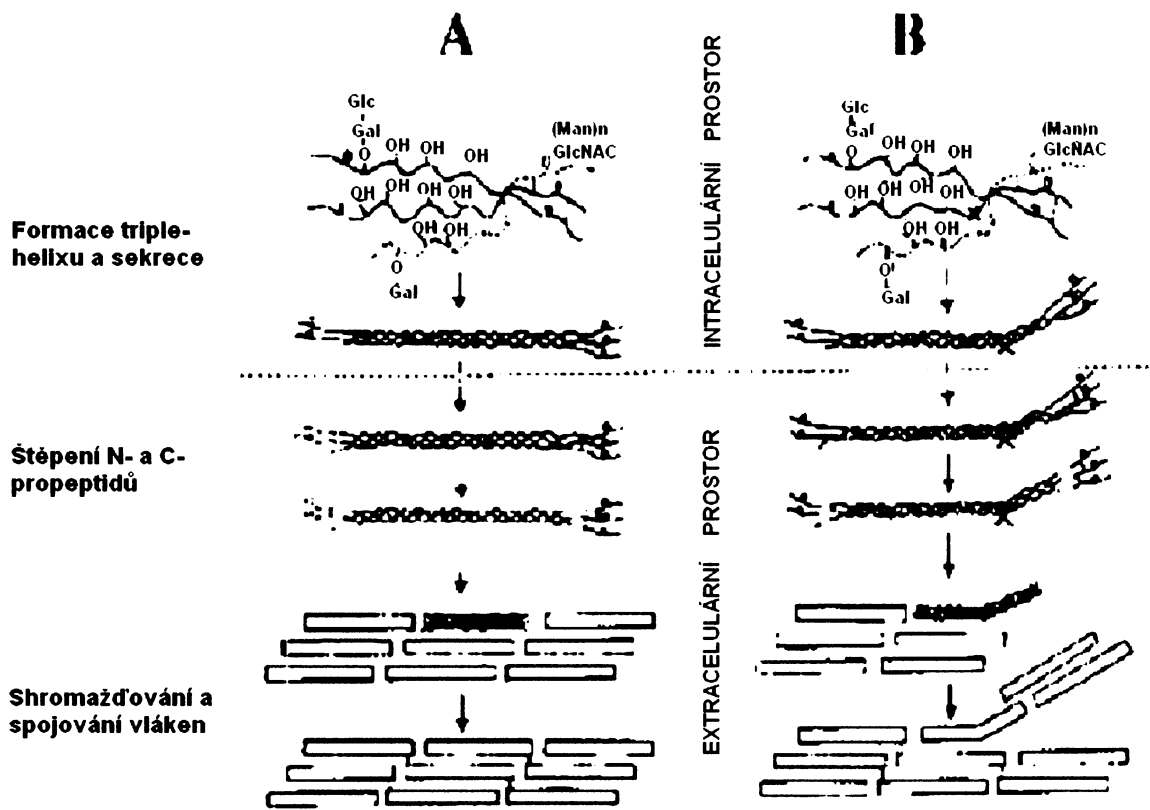


Obr.č.11: Struktura proteinu COL1A1; (Převzato z <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/COL1A1ID186.html>)

### 5.3 Formace *alpha* řetězce

Prvních 22 aminokyselinových zbytků tvoří tzv. signální peptid, který je přítomen pouze v tzv. prepro-*alpha* řetězcích, syntetizovaných buňkami zvanými fibroblasty. Funkcí signálního peptidu je zavedení prepro-*alpha* řetězce do endoplazmatického retikula, v němž dochází k enzymatickému odštěpení signálního peptidu enzymem zvaným signální peptidáza (Dalglish, 1997). Tímto procesem vznikají pro-*alpha* řetězce, jež jsou zakončeny N-terminálními a C-terminálními propeptidy. Hlavní funkcí terminálních peptidů 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>). Aby byl proces propojení pro-*alpha* řetězců úspěšný, je důležitá přítomnost glycinu 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 představovány aminokyselinami prolin a hydroxyprolin (van der

Rest and Garrone, 1991). V extracelulární oblasti dochází k odštěpení terminálních peptidů, a to konkrétně enzymy prokollagen N-peptidázou (v oblasti vymezené aminokyselinovými zbytky 161 - 162) (Dombrowski, 1988) a prokollagen C-peptidázou (v oblasti vymezené aminokyselinovými zbytky 1218-1219) (Li, 1996). Výsledným produktem je alpha řetězec z jedné strany ukončený N-telopeptidem a z druhé strany C-telopeptidem, přičemž struktura telopeptidů nemá charakter šroubovice.



Obr.č.12: Tvorba molekul kolagenu typ I;  
(převzato z Gajko-Galicka, 2002)

A. Schematická ukázka intracelulárních a extracelulárních kroků vyžadovaných v syntéze, zpracování a skládání molekul kolagenu typ I do vláken.

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

### 5.4 Trojrozměrná struktura proteinu COL1A1

Finální struktura molekul kolagenu typ I má charakter trojšroubovice, jež je tvořena dvěma alpha 1(I) řetězci a jedním řetězcem alpha 2(I). Tento útvar, tzv. tropokolagen, dosahuje velikosti 290 nm a průměru 1.4 nm a je tvořen 21 druhy aminokyselin. Těsné přiblížení alpha řetězců umožňuje glycin, který má jednoduchý, nevětvený postranní řetězec,

a který se nalézá na každé třetí pozici alpha řetězce (<http://www.hypro.cz/hyRubrln.aspx?intRubrKis=1251&intLang=0>).

Dalšími aminokyselinovými zbytky, které zvyšují stabilitu helixu, jsou:

- Prolin – během tvorby kolagenu z prokolagenu podléhá prolin hydroxylaci prolyl-4-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, což má za následek tvorbu protáhlých helixů a následně triplehelixů (<http://www.hypro.cz/hyRubrln.aspx?intRubrKis=1251&intLang=0>). Dalším stabilizačním vlivem těchto dvou zbytků aminokyselin je jejich působení na denaturační teplotu molekul kolagenu, neboť se zvyšujícím se obsahem prolinu a hydroxyprolinu se denaturační teplota zvyšuje (Burjanadze & Veis, 1997).
- Lysin – tento aminokyselinový zbytek je modifikován lysyl hydroxylázou za vzniku hydroxylysinu. Hydroxylysin může být dále modifikován dalšími specifickými enzymy (např. galaktosyl transferázou), které k tomuto zbytku připojují sacharidové řetězce galaktosy a glukosylgaktosy (konkrétně na pozicích 87 a 681 (<http://www.hypro.cz/hyRubrln.aspx?intRubrKis=1251&intLang=0>)) (Kellokumpu, 1994). Lysin, a tedy zároveň také hydroxylysin, jsou obsaženy zejména v koncových oblastech (pro)alpha řetězců, kde vytvářejí pevné, intra- a extracelulární příčné vazby, zvyšující stabilitu molekul kolagenu (<http://www.hypro.cz/hyRubrln.aspx?intRubrKis=1251&intLang=0>).

Pro strukturu alpha řetězců je dále charakteristické střídání polárních (hydrofilních) a nepolárních (hydrofóbních) oblastí, tedy aminokyselin s polárními a nepolárními postranními řetězci. Při formaci alpha řetězců do vyšší struktury, tedy tropokolagenu, se nepolární oblasti alpha řetězců shlukují uvnitř molekuly, kde mezi sebou vytvářejí iontové vazby a pomáhají tak udržovat strukturu tropokolagenu. Oproti tomu, polární oblasti se nacházejí na vnější straně molekuly kolagenu, kde na sebe mohou vázat různé organické látky (Alberts a kol., 1998), tzv. ligandy (COMP, fibronektin, integriny, sacharidy) (Marini, 2007).

## 6. Typy mutací nalezených v COL1A1

### 6.1 Základní dělení mutací

Obecně můžeme mutace vedoucí v OI rozdělit do dvou základních skupin. Tyto dvě skupiny se liší svým dopadem na tvorbu molekul kolagenu typ I:

1. **nulové mutace** – Tyto mutace redukují množství kolagenu typ I. Většina nulových mutací vede k translaci C-terminálně zkráceného alpha řetězce, který již neobsahuje C-terminální nukleární místo pro formaci triple helixu; jiné snižují stabilitu mRNA nebo mohou postihnout transkripci či tvorbu mRNA – takové mutace mají za následek snížení tvorby alpha řetězců, což označujeme jako řetězový efekt mutace (Dalglish, 1997; <http://www.athendiagnosics.com/servlet/DownloadServlet?id=253>).
2. **dominantně negativní mutace** – Tyto mutace postihují strukturu a stabilitu oblasti helixu alpha řetězců molekul kolagenu typ I. Přibližně 85% má za následek záměnu glycinu jinou aminokyselinou, což vede k poškození formace triple helixu. Zbýlých 15% tvoří splice site mutace mRNA. Tyto mutace se projevují třemi odlišným molekulárními mechanismy:
  - molekula prokolagenu obsahuje mutované i normální alpha řetězce, přičemž mutované řetězce znemožňují tvorbu triple helixu kolagenu - triple helix je skládán směrem od C- k N-terminálu všech alpha řetězců. Bodovou mutací v alpha řetězcích dochází k modifikaci lisylových a hydroxylisylových zbytků v oblasti N-terminálu, což je příčinou přerušení skládání řetězců do trojšroubovice od mutovaného místa a poškození funkce molekuly kolagenu typ I (Raughunath, 1994).
  - molekula prokolagenu typ I obsahuje mutované i normální alpha řetězce, přičemž mutované řetězce narušují štěpení N-terminálních propeptidů N- proteinázou (Vogel, 1988).
  - přítomnost mutovaných řetězců v molekule prokolagenu nenarušuje tvorbu trojšroubovice, a tudíž nemění strukturu výsledné molekuly; výsledkem je snížená inkorporace mutovaných molekul kolagenu do fibril. (Byers, 1991; Kuivaniemi, 1991; Prokop, 1994 )

Všeobecně platí, že mutace vedoucí k substituci zbytku glycinu vedou k vážnějšímu fenotypu než mutace snižující množství proteinového produktu. Jedná se o tzv. poziční efekt mutace. Dále je zřejmé zvyšování závažnosti onemocnění OI s lokalizací mutace směrem k C-terminální oblasti, kdy je zjevné snižování stability molekul kolagenu typ I (Tsipouras, 1993). Existují ovšem výjimky, a to v případě, že nedochází k začlenění mutovaných řetězců do molekul prokolagenu typ I. Pak mutace v C-terminálních oblastech alpha 1(I) řetězců vedou k lehkému fenotypu OI (typ I) (Byers, 1991; Pace, 2001). Naopak mutace umístěné v N-koncových oblastech mají vždy za následek lehký fenotyp OI I (Starman, 1989; Marini, 2007).



## 6.2 Diversita mutací v COL1A1

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

**Missense mutace** způsobují změnu čtení kodonu, kódujícího aminokyselinu glycin, na kodon jiné aminokyseliny. Výsledkem je substituce zbytku glycinu v oblasti helixu pro-alpha řetězce jinou aminokyselinou. Glycin se vyskytuje na každé třetí pozici repetitivní sekvence Gly-X-Y a je důležitou komponentou pro spojení jednotlivých polypeptidických řetězců (tedy pro-alpha řetězců typ 1 a 2) do charakteristické trojšroubovice molekul kolagenu typu I. Při jeho substituci dochází ke změně struktury triple helixu – změní se čtecí rámec, a následně tvorbě strukturálně postižených molekul kolagenu typ I. Závažnost mutací vedoucích k 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 and Prokop, 1991; Kuivaniemi, 1991; Prokop, 1994; Kuivaniemi, 1997) V následující tabulce jsou uvedeny substituce glycinu pro jednotlivé typy poruchy poklesu kostní density označované jako Osteogenesis imperfecta, jež mají v rámci těchto jednotlivých typů onemocnění nejzávažnější dopad na výsledný fenotyp.

změna kodonu glycinu	pozice mutace: báze/kodon	nově kódovaná aminokyselina	klinický obraz mutace
GGA→AGA	888 /79	arginin	OI I
GGT→TGT	589/19	cystein	OI I
GGT→TGT	1201/223	cystein	OI I
GGC→AGC	3541/1003	serin	OI II
GGG→AGG	994/154	arginin	OI III
GGC→TGC	2110/256	cystei	OI III
GGC→AGC	2299/589	serin	OI III
GGC→AGC	2596/688	serin	OI III
GGC→AGC	3118/862	serin	OI III
GGC→AGC	1777/415	serin	OI III/IV
GGT→TGT	1579/349	cystein	OI IV
GGC→AGC	1588/352	serin	OI IV

Obr. č. 13: Substituce glycinu vedoucí v rámci jednotlivých typů OI k nejzávažnějším genotypům; (Převzato z <http://www.le.ac.uk/ge/collagen/col1a1.html>)

Mezi mutace mající za následek lehký fenotyp OI, OI typ I, řadíme **nonsense** mutace a dále **frameshift** a **splice-site** mutace, které vedou k předčasnému ukončení kodonu = vytvoření tzv. STOP kodonu, který má charakteristickou sekvencí nukleotidů, a to konkrétně UAA, UAG nebo UGA. s následnou tvorbou tzv. „null“ alel. :

- **Nonsense mutace** – tento typ mutací způsobuje změnu jednoho nukleotidu s následnou změnou kodonu na výsledný STOP kodon, což má za následek tvorbu zkrácených forem alpha řetězců, a tudíž i výsledného proteinu (Redford-Badwal, 1996).
- **Frameshift mutace** – frameshift mutace jsou vyvolány **insercí/deleci** jednoho či více nukleotidů (počtu nedělitelným třemi), jež mají za následek posun čtecího rámce při transkripci pre-mRNA, a tedy zároveň při následné translaci mRNA do polypeptidického řetězce (Willing, 1994). Tyto mutace mohou mít ovšem za následek, pokud nevytvářejí předčasný terminační kodon, vážné formy OI (typ II, III, a IV) (Byers, 1993).
- **Splice-site** mutace – tento typ genetické mutace je způsoben **insercí/deleci** či **substitucí** jednoho či více nukleotidů v oblasti sestřihových míst pre-mRNA. Splice-site mutace mohou vést k zadržení intronů v sekundární mRNA, vynechání části či celého exonu ve výsledné mRNA, či k vytvoření zcela nových nestřihových míst v pre-mRNA (Nakai & Sakamoto, 1994). Pokud nemají splice-site mutace za následek vznik STOP kodonů, jejich výsledkem je tvorba strukturálně postižených molekul kolagenu typ I, což se projevuje fenotypem vážných forem OI (typ II, III, IV) (Byers, 1993).

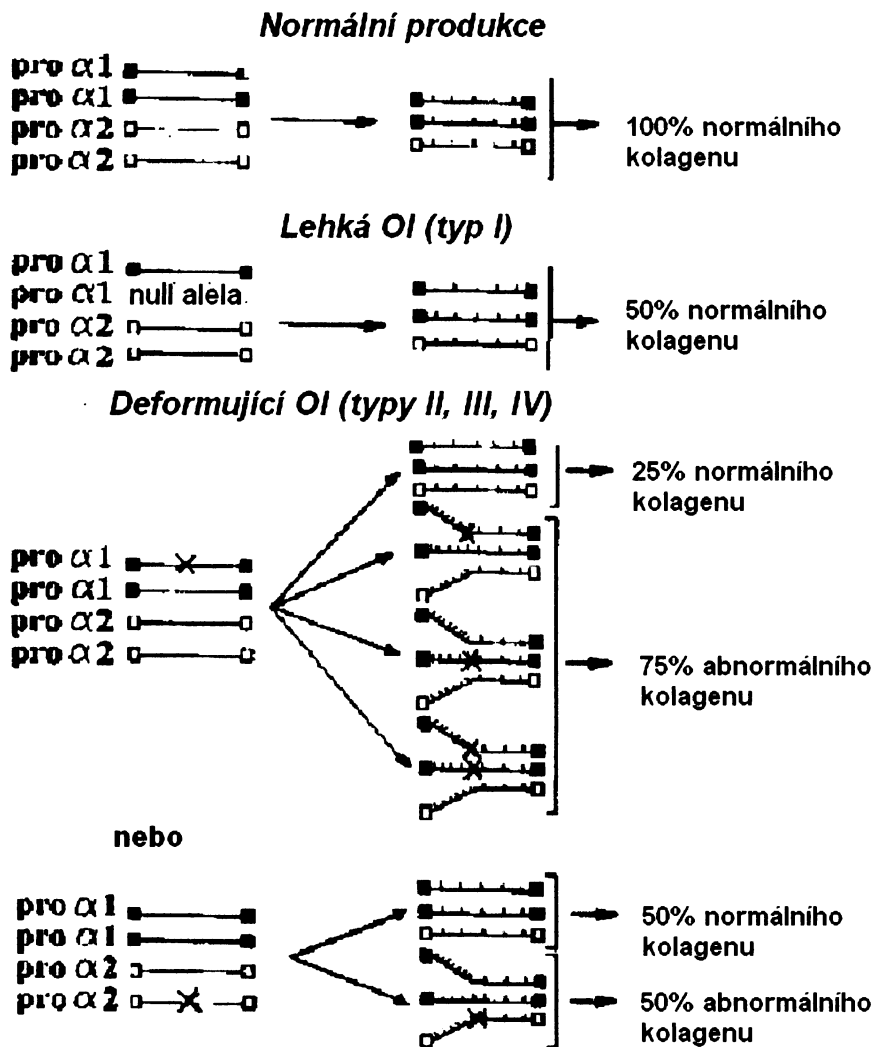
Méně běžnými, vzácnými typy mutací v rámci COL1A1 genu jsou:

- mutace způsobující přeskupení několika exonů a mající za následek letální fenotyp OI (**multi-exon rearrangement mutace**) (Stankiewicz and Lupski 2002),
- mutace, které vedou k zhoršené formaci triple helixu, posttranslační modifikaci alpha řetězců a následně snížené extracelulární sekreci těchto alpha řetězců (**in-frame delece** a **inserce, duplikace**). Fenotypový projev těchto mutací závisí na charakteru mutace, tedy zda se jedná o nulové nebo dominantně negativní mutace (Mundlos, 1996; Cole, 1994; Pace, 2001).

## 7. 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 ,

kteře mají za následek tvorbu abnormálních molekul, jsou více závažné než v genech COL1A2, neboť postihují 75% syntetizovaných molekul kolagenu typ I (Obr.14) (Gajko-Galicka, 2002). V této kapitole popisujeme, jak se mohou mutace různých oblastí genu projevit v kvalitě kolagenu typ I.



Symbol X označuje mutaci v prokolagenovém řetězci, malé vertikální čáry označují posttranslační modifikace, jejichž četnost stoupá směrem od N-konce k bodové mutaci.

Obr.č.14 Molekulární mechanismus OI;  
 (Převzato z Gajko-Galicka, 2002)

### 7.1 Oblasti ovlivňující kvalitu molekul kolagenu typ I

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 Osteogenesis imperfecta.

### 7.1.1 Oblast promotoru genu COL1A1

Mutace v signální sekvenci promotorové oblasti potlačují aktivaci transkripce a mají proto za následek snížení množství mRNA, což se projevuje následným snížením počtu alpha 1(I) řetězců a sníženou tvorbou molekul kolagenu typ I. Z toho tedy vyplývá, že mutace regulačních oblastí transkripce genu *col1a1* mohou mít za výsledek fenotyp OI typ I. Ve většině případů ovšem vedou mutace promotoru ve vážnější formy OI (typ II, III a IV).

Poruchu transkripce mohou mít za následek dále mutace v místech vazeb tzv. aktivačních proteinů. Tyto proteiny nazýváme *enhancery* (podporují transkripci) nebo *silencery* (utlumují transkripci). Existuje několik typů proteinových faktorů, jež se váží v těchto oblastech a regulují expresi genu COL1A1. Patří mezi ně například:

- CBF - interaguje s CCAAT boxem v oblasti -100 - -96bp, váže se na promotor genu COL1A1 a aktivuje transkripci (Maity et al.1988)
- SP1 – interaguje v oblasti -129 - -107bp, váže se na 2 místech v 274bp rozsáhlé sekvenci intronu1, čímž vytváří DNA proteinový komplex inhibující aktivitu promotoru COL1A1 (Chen et al. 1998)
- YY1=Yin Yang1 – rozlišujeme dva typy tohoto pozitivního regulačního proteinu:
  - 1) YY1A – interaguje s oblastí -40 - -37bp, váže se na TATA box promotoru; mutace YY1A snižují aktivitu exprese genu COL1A1
  - 2) YY1B – interaguje s oblastí -32 - -29bp, váže se na TATA box promotoru; mutace YY1B zastavují expresi genu COL1A1(<http://www.jbc.org/cgi/content/full/276/42/38665#References>)
- c-Krox – interaguje s oblastí -195 - -168bp bohatou na G, potlačuje expresi genu COL1A1 (Widom et al. 1997)

### 7.1.2 Mutace v oblastech CpG dinukleotidů

CpG oblasti DNA regulačních oblastí genu COL1A1 mohou podléhat metylaci, což má za následek sníženou regulaci transkripce, neboť dochází k potlačení vazby aktivačních proteinů CpG míst (např. CBF, c-Krox, SP1) s transkripčními faktory. To může mít za následek inaktivaci exprese genu COL1A1. Následkem je snížená tvorba mRNA, následovaná sníženou tvorbou alpha 1(I) řetězců, což vede ke tvorbě sníženého množství molekul kolagenu typ I. Zvýšený stupeň metylace CpG je patrný především u starších jedinců.

Mutace postihující tyto dinukleotidy kodonů glycinu v oblastech kódujících helix (tedy exony 6-49) alpha 1(I) řetězců mají v 1/3 případů za následek vážné fenotypy Osteogenesis

imperfecta, typ II a III (Marini, 2007). Z 80% jsou tyto mutace rekurentní, tzn. periodické, a nejčastěji se jedná o substituci glycinu serinem na pozici 352 (OI typ II/IV – neletální typ) (Korkko, 1997). Mutace CpG dinukleotidů vyvolává metylace s následnou deaminací 5-metylcytosinu vedoucí k transici jednoho z těchto dvou nukleotidů, G nebo C. V genu COL1A1 může podléhat tomuto výše popsanému mutačnímu mechanismu 26 z 388 kodonů glycinu (Trummer, 2001).

### 7.1.3 Mutace postihující kodony glycinu

Mutace měnící kodon glycinu za kodon jiné aminokyseliny mají ve většině případů za následek vážný klinický obraz choroby Osteogenesis imperfecta. Substituce glycinu mění strukturu alpha řetězců a znemožňuje tak vytvoření glycinového můstku mezi dvěma alpha řetězci, čímž je snížena stabilita, a tedy zároveň kvalita molekul kolagenu typ I. Závažnost onemocnění je závislá na:

(Marini, 2007)

- ❖ Typu mutovaného řetězce (=řetězcový efekt):
  - **alpha 1(I) řetězec** – vážné formy OI (typ II, III)
    - 36% letální fenotyp
  - **alpha 2(I) řetězec** – převážně mírný fenotyp OI (typ IV)
    - 20% letální fenotyp
- ❖ Pozici mutace (=poziční efekt):
  - **N-terminální oblast alpha řetězce** – neletální OI (typ I, IV)
  - **C-terminální oblast alpha 1(I) řetězec** – substituce v oblastech 691-832bp a 910-964bp (MLBR=Major Ligand Binding Regions = místa vazby ligandů) vedou v letální fenotyp OI (typ II, III)
  - **alpha 2 (I) řetězec** – letální mutace v místech (celkem 8) vazby proteoglykanů matrixu na fibrily kolagenu – mutace těchto oblastí negativně ovlivňují fibrilogenesi kolagenu, spojování buněk kolagenu a u starších pacientů a pacientů s diabetes vedou ke glykaci kolagenu.
- ❖ Charakteru postranního řetězce nově kódovaného aminokyselinového zbytku:
  - Substituce glycinu aminokyselinovým zbytkem s nabitým či rozvětveným postranním řetězcem vede v letální genotyp OI (typ II a III).
    - Př.: valin – rozvětvený postranní řetězec – 1) substituce v alpha 1(I) řetězci letální v 73% případů
    - 2) substituce v alpha 2 (I) řetězci ze 17% letální

#### 7.1.4 Mutace v oblastech sestřihových míst pre-mRNA

Další důležitou oblastí, která ovlivňuje kvalitu konečné molekuly kolagenu typ I, jsou místa sestřihová (tzv. splice-site mutace). Mutace v těchto místech se mohou projevovat třemi různými způsoby:

- Aktivace utajených sestřihových míst
- Přeskočení exonu čtecím rámcem = exon skipping
- Zahrnutí jednoho a více intronů do sekundární mRNA

Obecně platí, že splice-donor-site mutace vedou především k efektu exon skipping, což má za následek tvorbu zkráceného proteinu. Dále pak mohou vést k užití „tajných“ sestřihových míst následného intronu či sousedního exonu, nebo k začlenění krátkých intronů do sekundární mRNA (Talerico and Berget, 1990).

Splice-akceptor mutace vedou nejčastěji k užití „utajených“ akceptorových míst následného či předešlého intronu (Cooper, 1995; Robberson, 1990). V některých případech může ovšem tento typ splice-site mutací vést též k exon skipping a vzácněji také k začlenění předešlého intronu do mRNA (Schwarze, 1997).

Výsledná stabilita molekuly kolagenu závisí na několika aspektech:

- Zda vedou splice-site mutace k vytvoření předčasného terminačního kodonu = STOP kodonu. Takovéto mutace vedou k tvorbě „null“ alel, jež mají za následek sníženou tvorbu mRNA a následně alpha 1(I) řetězců. Z toho plyne, že nemají vliv na kvalitu, ale kvantitu molekul kolagenu typ I.
- Zda mutovaná mRNA kóduje *in-frame polypeptid*, vzniklý prodloužením exonu o několik nukleotidů intronu. Tyto in-frame nukleotidy pak netvoří Gly-X-Y repetitivní sekvenci charakteristickou pro oblast helixu kolagenu.
- Zda je terminační kodon doprovázen intronem, tedy sekvencí nekódující protein.

Poslední dva zmíněné případy vedou k tvorbě strukturně postižených molekul kolagenu typ I, neboť posouvají čtecí rámec při transkripci mRNA, což má za následek tvorbu prodloužených aminokyselinových zbytků proteinu.

(Maquat, 1996)

## 8. Korelace genotyp-fenotyp u osob s diagnózou OI

Stanovení vztahu mezi genotypem a fenotypem u pacientů s onemocněním Osteogenesis imperfecta je velice složitý proces. Do dnešní doby neexistuje jednoduchý vztah, který by uváděl souvislost mezi pozicí a typem mutace v oblasti triple helixu a výsledným fenotypem. Kromě platných vztahů, jako je zvyšující se fenotypová závažnost mutací směřujících od N-konce k C-konci, mutací vedoucích k substitucím aminokyselinami s větvenými postranními řetězci či závažnější klinický obraz choroby OI v důsledku mutací v COL1A1 versus COL1A2, existuje mnoho odchylek, jejichž vysvětlení je následující:

- Oblast triple helixu řetězců kolagenu není strukturálně jednotvárná, její stabilita a pravděpodobnost mutací je různá pro různé oblasti triple helixu. Z těchto důvodů byl vytvořen regionální model fenotypové vážnosti Osteogenesis imperfecta, vyžadující identifikaci velkého množství mutací pro přesné definování odlišných oblastí triple helixu (Roughley, 2003).
- Intracelulární důsledky mutací nejsou stálé, mohou vykazovat rozdílnou míru stability mutovaných proteinů vzhledem ke katabolizmu. Toto může ovlivnit podíl mutovaného kolagenu a zároveň ovlivnit tvorbu dalších produktů genu (Roughley, 2003).

Genové mutace se vyskytují v pozadí faktorů ovlivňujících pevnost kostí, které mohou být způsobeny genetickými a nutričními změnami, nebo změnami životního prostředí v rámci rozdílných jedinců. To je pravděpodobným důvodem rozlišného fenotypového projevu běžných mutací.

### 8.1 Korelace genotyp-fenotyp u pacientů s OI typ I

Fenotyp Osteogenesis imperfecta typ I je výsledkem mutací v rámci genu COL1A1, jež mají za následek předčasné ukončení kodonů a sníženou stabilitu sekundární mRNA. Tyto mutace vedou k produkci tzv. „null alel“. Jejich následkem je snížená tvorba pro-alpha 1(I) řetězců a z toho vyplývající snížená tvorba molekul prokolagenu typ I. U postižených jedinců nelze nahradit deficit pro-alpha 1(I) řetězců řetězci pro-alpha 2(I), z čehož plyne výsledné přibližně poloviční množství molekul prokolagenu typ I oproti normálnímu stavu (Willing, 1994).

## **8.2 Korelace genotyp-fenotyp u pacientů s OI typ II, III, IV**

OI typ II, III a IV jsou následkem mutací měnících strukturu pro-alpha 1(I) nebo pro-alpha 2(I) řetězců. Většina z těchto mutací je substituce glycinu v oblasti trojšroubovice jednoho z řetězců jinou aminokyselinou. Substituce argininem, valinem, k.glutamovou, k.aspartovou či tryptofanem v rámci pro-alpha 1(I) řetězců mají, ve většině případů, za následek letální fenotyp, vyskytují-li se blíže ke karboxylovému konci trojšroubovice. Fenotyp vyvolaný substitucemi glycinu serinem, alaninem či cysteinem je více variabilní a jeví se spíše jako odraz stability oblasti triple helixu pro alpha 1(I) řetězců (Byers, 1991).

Mutace, jejichž výsledkem je „přeskočení“ exonů ve čtecím rámci z pro-alpha řetězců, s výjimkou exonu 14 pro-alpha 1(I) řetězce a exonu 25 pro-alpha 2(I), způsobují letální fenotyp OI (Pace, 2001).

Dále byly objeveny mutace měnící sekvence aminokyselin C-konců pro-alpha řetězců. Jejich výsledkem je ztráta schopnosti řetězců spojovat se, či abnormální spojování řetězců. Fenotyp těchto mutací je variabilní. Při započtení těmito mutacemi změněných řetězců do molekul prokolagenu typ I je fenotyp vážnější (Byers 1991).

Fenotypy, jež jsou výsledkem mutací v oblastech proti proudu transkripce, vykazují velkou variabilitu a mohou způsobovat značnou hypermobilitu kloubů.

U jedinců s OI typu II, III a IV byl dále objeven mosaicismus dominantních mutací, jehož výsledkem byla tvorba mutovaných i nepostížených molekul kolagenu. Fenotypový projev onemocnění Osteogenesis imperfecta u jedinců s mozaikou může vykazovat jak charakteristiky lehkých forem OI, tak charakteristiky neidentifikovatelné pro OI. Pacienti s mosaicismem mutací produkujících neletální formy Osteogenesis imperfecta obvykle nevykazují fenotyp OI. A to dokonce i v těch případech, když se tyto mutace vyskytují ve většině somatických buněk jedince. Oproti tomu, mosaicismus mutací vedoucích v letální formy OI může vytvářet fenotyp mírných forem OI, pokud je mutace přítomna ve většině somatických buněk (Byers, 1991).

## **8.3 Korelace genotyp-fenotyp u pacientů s diagnózou OI**

(Hartikka, 2004)

U pacientů postižených onemocněním OI lze pozorovat několik zákonitostí pro výsledný fenotyp dle typu mutovaného genu:

- **COL1A1 mutace** – výsledkem je nejčastěji fenotyp OI typ I a III
  - modré skléry
  - jedinci mají normální či mírně podprůměrný vzrůst



- více běžná nedoslýchavost

Další pravidelnosti fenotypového projevu lze pozorovat v rámci některých typů mutací dle umístění mutace:

- **splice-site mutace:**

- 1) exon skipping - obecně platí, že mají za následek letální fenotyp, pokud je daný exon 3' k exonu 13
- 2) utajená splétací místa – vedou-li ke vzniku předčasného terminačního kodonu, pak mají vždy za následek lehký fenotyp OI, OI typ I
- 3) zahrnutí intronu do mRNA – pokud daný intron obsahuje terminační kodon, vedou v lehký genotyp OI (typ I)

(Byers, 2005)

- **missense mutace:**

- 1) V oblasti alpha 1(I) řetězce převažují substituce glycinu, a to nejčastěji na prvních pozicích kodonu glycinu. Substituce prvních 200 aminokyselinových zbytků mají za následek neletální fenotyp OI (typ I, IV). V rámci alpha řetězce lze však identifikovat dva regiony (691-823bp a 910-964bp), tzv. MLBR=Major Ligand Binding Regions, jejichž mutace mají vždy za následek letální fenotyp OI (typ II, III). Důvodem letality je přerušení vazeb těchto míst s nekolagenními proteiny, např. COMP (=Cartilage matrix protein) (Marini, 2005).
- 2) Substituce glycinu v prvních 85-90 aminokyselinových zbytcích N-terminální oblasti (tzv. N-anchor) mají za následek vzácný fenotyp OI/EDS. Mutace v této oblasti mají za následek poruchu štěpení N-propeptidu N-peptidázou. Alpha řetězce se zachovaným N-propeptidem dávají vznik tzv. pN-kolagenu. Přítomnost tohoto kolagenu ve fibrilách se projevuje hyperextenzibilitou kůže a laxitou kloubů (Cabral, 2005).

V současnosti bylo pozorováno přibližně 60 nejběžněji se vyskytujících mutací v COL1A1, substituujících glycin v oblasti alpha 1(I) helixu kolagenu typ I jinou aminokyselinou, které vedou ke klinickým symptomům Osteogenesis imperfecta. ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?cmd=entry&id=120150#120150\\_Reference128#120150\\_Reference128](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?cmd=entry&id=120150#120150_Reference128#120150_Reference128))

Zde uvádím klinický obraz některých z nejčastěji detekovaných mutací:

- N-terminální oblast helixu:

- 1) Substituce měnící zbytek glycinu na pozici 85 na argininový zbytek vedla v lehký fenotyp OI. Pacienti dosahují normálního věku, mají soudkový hrudník, lehce

modré bělimo. Běžným projevem je aortická regurgace (Deak, 1991).

- 2) U pacientů s lehkou OI, typ I, kteří byli postiženi onemocněním zvaným Dentinogenesis imperfecta, byla objevena mutace vedoucí v substituci glycinu cysteinem na pozici 19. Tito pacienti vykazovali vážnější projevy OI typ I (Lund, 1998).
- 3) Substituce zaměňující kodon glycinu za kodon cysteinu (gly43cys) se fenotypově projevuje jako osteopenie se znaky OI typ I. Jedinci s tímto typem mutace jsou menšího vzrůstu, vykazují hypermobilitu kloubů, mají lehkou skoliózu, modré skléry a nejsou u nich pozorovány zlomeniny (Shapiro, 1992).
- 4) U novorozence s perinatálně letální OI typ II byla zjištěna substituce glycinu na pozici 391 argininem. Tato mutace se fenotypově projevovala širokými, spojitě obroubenými žebry. Novorozenec zemřel krátce po narození (Cole, 1990).
- 5) Substituce glycinu cysteinem na pozici 415 má za následek OI typ II/IV. Jedinci s touto mutací se vyznačují výskytem prvních zlomenin již během prvních týdnů života, modrým bělmem, které postupně během několika let zesvětlá, nedoslýchavostí rozvíjející se během 20-tého roku života a žlutohnědým zbarvením zubů (Nicholls, 1991).

- C-terminální oblast helixu:

- 1) Mutace mající za následek substituci glycinu na pozici 559 cysteinem je přítomna u pacientů s diagnózou OI typ I s Dentinogenesis imperfecta. Tato mutace se dále projevuje hyperextensibilitou kloubů a zvýšenou frekvencí zlomenin způsobených lehkým úrazem (Pallos, 2001).
- 2) Jedinci postižení lehkou formou OI, OI typ I, způsobenou substitucí glycinu serinem na pozici 901 vykazují vysokou frekvenci fraktur femuru. Bělimo pacientů je bílé (Mottes, 1992).
- 3) U pacienta, jehož potomek byl postižen letální OI typ II, byl objeven mozaicismus pro mutaci vedou k substituci glycinu na pozici 550 argininem. Pacient vykazoval tyto klinické rysy OI: malý vzrůst, trojúhelníkový obličej, lehce modré bělimo, šedé zuby, soudkový hrudní koš (Wallis, 1990).
- 4) Substituce glycinu argininem na pozici 667 a 976 má za následek letální fenotyp OI, typ II. Jedinci s mutací lokalizovanou na pozici 667 mají široká, nespojitě obroubená žebra, zatímco jedinci s mutací umístěnou na pozici mají žebra štíhlá, vykazující vysokou četností zlomenin (Cole, 1990).

## 9. Závěr

Osteogenesis imperfecta je dědičnou chorobou postihující kostní hmotu, jejíž klinické příznaky lze pozorovat již během těhotenství. V současné době je pro léčbu tohoto onemocnění využíváno bisfosfonátů, které jsou běžně užívaným lékem u pacientů postižených osteoporózou (Fleisch, 1998). Jejich efektem je snížení resorpce kostí, zvýšení density kostí, redukce četnosti zlomenin, zvýšení pevnosti svalů. Nejběžněji používaným bisfosfonátem je Parmidronate. Tento druh léčby je vhodný jak pro všechny typy OI, tak pro všechny věkové kategorie pacientů, a v současné době nebyl doposud zaznamenán jakýkoliv negativní efekt pro organismus pacientů (Roughley, 2003; <http://www.grc.org/programs.aspx?year=2005&program=collagen>).

Pacienti s deformujícím typem OI (typ II, III a v menší míře IV) běžně podstupují chirurgické zákroky, při nichž jsou jim do zdeformovaných kostí vkládány výztuhy. Tento typ léčby může vést k snížení rizika zlomenin a zlepšení pohyblivosti pacientů (<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/001573.htm#Treatment>).

Dále je pacientům často doporučováno vykonávat lehkou fyzickou aktivitu pod dohledem odborníků. Různá jednoduchá cvičení, jako například chůze ve vodě, plavání, podporují nejen mobilitu pacienta, ale zároveň vedou k posílení svalstva a kostní density a udržování stálé váhy pacientů (<http://www.grc.org/programs.aspx?year=2005&program=collagen>; <http://www.oif.org/site/PageServer?pagename=OlandOsteo>).

Další důležitou součástí léčby OI je dodržování zdravého životního stylu. To zahrnuje nejen výše uvedené tělesné cvičení, ale také konzumaci vyvážené stravy, vyvarování se alkoholu a tabáku a jiným omamným látkám.

([http://www.niams.nih.gov/Health\\_Info/bone/Osteogenesis\\_Imperfecta/osteogenesis\\_imperfecta\\_ff.asp#f](http://www.niams.nih.gov/Health_Info/bone/Osteogenesis_Imperfecta/osteogenesis_imperfecta_ff.asp#f))

Stálým problémem pro genetiky zabývající se Osteogenesis imperfecta je stanovení vztahu mezi typem a pozicí mutace (genotypem) a výsledným klinickým projevem mutace (fenotypem) (Roughley, 2003). Důvodem je fakt, že shodné mutace pozorované jak v rámci příbuzensky nesouvisejících pacientů, tak pacientů v rámci jedné rodiny, se ve výsledném klinickém obrazu jedinců s OI mohou projevovat zcela odlišným fenotypem ([http://www.niams.nih.gov/Health\\_Info/Bone/Osteogenesis/default.asp](http://www.niams.nih.gov/Health_Info/Bone/Osteogenesis/default.asp)). Doposud bylo z celkového mutačního spektra identifikováno pouhých cca 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. Prospěšné by dále mohly být molekulárně-genetické analýzy provedené u potracených embryí, které by byly především zaměřené na identifikaci mutací v letálních regionech genu COL1A1 (tedy v oblastech 691-823 a 910-964) (Marini, 2007)

Dále by mohlo být prospěšné pozorování vlivu epigenetických faktorů na fenotyp různých pacientů se stejným typem mutace (Byers, 1991).

## **10 . Seznam použité literatury**

Alberts, B. a kol. (1998): Základy buněčné biologie. Úvod do molekulární biologie buňky. Ústí n.L.: Espero Publishing. s.136-138

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

Burjanadze, T. V. and Veis, A. (1997): A thermodynamic analysis of the contribution of hydroxyproline to the structural stability of the collagen triple helix. *Connect. Tissue Res*, 36, s.347-365

Byers, P.H., Tsiopoulos, P., Bonadio, J.F., Starman, B.J., Schwarz, R.C. (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, s.237-248

Byers, P.H., Wallis, G.A. and Willing, M.C. (1991): Osteogenesis imperfecta: translation of mutation to phenotype. *J. Med. Genet.*, 28, s.433-442

Byers, P.H. and Steiner, R.D. (1992): Osteogenesis imperfecta. *Annu Rev Med.* 43, s.269-282

Byers, P. H. (1993): Osteogenesis imperfecta. In: Royce, P. M., Steinmann, B. : *Connective Tissue and Its Heritable Disorders: Molecular, Genetic, and Medical Aspects*, s.317-350

Byers, P.H. and Cole, W.G. (2002): Osteogenesis imperfecta. In: Royce P.M. and Steinmann B. (eds). *Connective Tissue and Its Heritable Disorders: Molecular, Genetic, and Medical Aspects*. s.385-430

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

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

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

Cooper, D.N., Krawczak, M., Antonarakis, S.E. (1995): The nature and mechanisms of human gene mutation. In: Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S., Valle D. (eds) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 7th edition. s.259–292

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

Dalgleish, R. (1998): The human collagen mutation database 1998. *Nucleic. Acids. Res.*, 26, s.253–255

Dombrowski, K. E. and Prockop, D. J. (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, s.16545-16552

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

Fleisch, H. (1998): Bisphosphonates: mechanism of action. *Endocrine Rev.*, 19, s.80-100

Glorieux, F.H., Rauch, F., Plotkin, H., Ward, L., Travers, R., Roughley, P.J., Lalic, L., Glorieux, D.F., Fassier, F., Bishop, N.J. (2000): Type V osteogenesis imperfecta: a new form of brittle bone disease. *J. Bone. Miner. Res.*, 15, s.1650-1658

Glorieux, F.H., Ward, L.M., Rauch, F., Lalic, L., Roughley, P.J., Travers, R. (2002): Osteogenesis imperfecta type VI: a form of brittle bone disease with a mineralization defect. *J. Bone. Miner. Res.*, 17, s.30-38

Kellokumpu, S., Sormunen, R., Heikkinen, J. and Myllyla, 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, s.30524-30529

Kiely, C.M., Hopkinson, I., Grant, M.E. (1993): Collagen: the collagen family: structure, assembly, and organization in the extracellular matrix. In: Royce P.M., Steinmann B. eds.: Connective tissue and its heritable disorders: Molecular, genetic and medical aspects. s.103–147

Korkko, J. a kol. (1997): Two new recurrent nucleotide mutations in the COL1A1 gene in four patients with osteogenesis imperfecta: about one-fifth are recurrent. Hum. Mutat. 9, s.148-156

Kuivaniemi, H., Tromp, G. and Prokop, D.J. (1991): Mutations in collagen genes: causes of rare and some common diseases in humans. FASEB J., 5, s.2052-2060

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

Li, S. W., Sieron, A. L., Fertala, A., Hojima, Y., Arnold, W. V., and Prokop, D. J. (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, s.5127-5130

Maity, S.N., Golumbek, P.T., Karsenty, G., de Crombrughe, B. (1988): Selective activation of transcription by a novel CCAAT binding factor. Science, 241, s.582–585

Maquat, L.E. (1996): Defects in RNA splicing and the consequence of shortened translational reading frames. Am.J.Hum. Genet., 59, s.279–286

Marini, J.C. a kol. (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. Human Mutation, 28(3), s.209-221

Morello a kol. (2006): CRTAP is required for prolyl-3-hydroxylation and mutations cause recessive osteogenesis imperfecta. Cell, 127(2), s.291-304

Mundlos, S., Chan, D., Weng, Y.M., Silence, D.O., Cole, W.G., Bateman, J.F. (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, s.21068–74

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

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

Pace, J.M., Atkinson, M., Wallis, G., Willing, M., Byers, P.H. (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. *Human Mutation*, 18, s.319-326

Prokop, D.J., Kuivaniemi, H. and Tromp, G. (1994): Molecular basis of osteogenesis imperfecta and related disorders of bone. *Clin. Plast. Surg.*, 21, s.407-413

Raughunath, M., Bruckner, P., Steinmann, B. (1994): Delayed triple helix formation of mutant collagen from patients with osteogenesis imperfecta. *J. Mol. Biol.*, 236, s.940–949

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

Robberson, B.L., Cote, G.J., Berget, S.M. (1990): Exon definition may facilitate splice site selection in RNAs with multiple exons. *Mol. Cell Biol.*, 10, s.84–94

Rossouw, C.M.S., Vergeer, W.P., du Plooy, S.J., Bernard, M.P., Ramirez, F., de Wet, W.J. (1987): DNA sequences in the first intron of the human pro- $\alpha$  1(I) collagen gene enhance transcription. *J. Biol. Chem.*, 262, s.15151–15157

Roughley, P.J., Rauch, F., and Glorieux, F.H. (2003): OSTEOGENESIS IMPERFECTA – CLINICAL AND MOLECULAR DIVERSITY. *European Cells and Materials*, 5, s.41-47

Schwarze, U., Goldstein, J.A., Byers, P.H. (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, s.1276–1286

Silence, D.O., Wilson, M., Morley, K., Onikul, E., Kozlowski, K., Eil, J. (1993): Basilar impression complicating osteogenesis imperfecta: natural history and correlation with Oltype. In: *Proceedings of the Fifth International Conference on Osteogenesis Imperfecta*. s.139-141

Stankiewicz, P. and Lupski, J.R. (2002a): Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. *Trends Genet.*, 18, s.74-82

Starman, B.J., Eyre, D., Charbonneau H., Harrylock, M., Weis, M.A., Weiss, L., Graham, J.M., Byers, P.H. (1989): The position of substitution for glycine by cysteine in the triple helical domain of the proalpha1(I) chains of type I collagen determines the clinical phenotype. *J. Clin. Invest.*, 84, s.1206–1214

Steinmann, B., Rao, V. H., Vogel, A., Bruckner, P., Gitzelmann, R., Byers, P. H. (1984): Cysteine in the triple-helical domain of one allelic product of the alpha-1(I) gene of type I collagen produces a lethal form of osteogenesis imperfecta. *J. Biol. Chem.*, 250, s.11129-11139

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

Trumber, T., Brenner, R., Just, W., Vogel, W., Kennerknecht, I. (2001): Recurrent mutations in the COL1A2 gene in patients with osteogenesis imperfecta. *Clin. Genet.* 59, s.338–343

Tsipouras, P. (1993): Osteogenesis imperfecta. In: Beighton, P. (ed.): *McKusick's Heritable Disorders of Connective Tissue*. s.281-314

van der Rest, M. and Garrone, R. (1991): Collagen family of proteins. *FASEB J.*, 5, s.2814-2823

Vogel, B.E., Doelz, R., Kadler, K.E., Hojima, Y., Engel, J., Prokop, D.J. (1988): A substitution of cysteine for glycine 748 of the alpha1 chain produces a kink at this site in the procollagen molecule and an altered N-proteinase cleavage site over 225 nm away. *J Biol Chem.*, 263, s.19249–19255

Ward, L.M., Rauch, F., Travers, R., Chabot, G., Szout, E.M., Lalic, L., Roughley, P.J., Glorieux, F.H. (2002): Osteogenesis imperfecta type VII: an autosomal recessive form of brittle bone disease. *Bone*, 31, s.12-18

Widom, R.L., Culic, I., Lee, J.Y., Korn, J.H.(1997): Cloning and characterization of hcKrox, a transcriptional regulator of extracellular matrix gene expression. *Gene*, 198, s.407–420



Williams, C. J.; Prockop, D. J. (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, s.5915-5921

Willing, M.C. a kol. (1994): Osteogenesis imperfekta type I: molecular heterogeneity for COL1A1 null alleles of type I collagen. Am.J. Hum. Genet., 55, s.638-647

## **11 Internetové zdroje**

### **11.1 Zahraniční internetové zdroje**

<http://www.grc.org/programs.aspx?year=2005&program=collagen> [6.1.2008]

[http://www.niams.nih.gov/Health\\_Info/Bone/Osteogenesis\\_Imperfecta/default.asp](http://www.niams.nih.gov/Health_Info/Bone/Osteogenesis_Imperfecta/default.asp) [6.1.2008]

<http://www.molvis.org/molvis/v13/a39/v13a39f2.jpg> [15.4.2008]

<http://library.med.utah.edu/WebPath/jpeg3/PERI022.jpg> [15.4.2008]

<http://jmg.bmj.com/content/vol37/issue5/images/large/99234.f1.jpeg> [15.4.2008]

<http://www.hawaii.edu/medicine/pediatrics/pemxray/v6c02a.jpg> [15.4.2008]

<http://www.altavista.com/image/results?itag=ody&q=OI+type+V&mik=photo&mik=graphic&mi p= all&mis=all&miwxh=all> [15.4.2008]

<http://www.genetests.org/servlet/access?db=geneclinics&site=gt&id=8888890&key=ESfTfPU K9UbL8&gry=&fcn=y&fw=uVOB&filename=/profiles/oi/index.html> [5.1.2008]

<http://www.cmj.hr/2001/42/4/11471191.pdf> [7.1.2008]

<http://ghr.nlm.nih.gov/condition=osteogenesisimperfecta> [13.1.2008]

[http://www.niams.nih.gov/Health\\_Info/Bone/Osteogenesis\\_Imperfecta/nurses\\_guide.asp#Diagnosis](http://www.niams.nih.gov/Health_Info/Bone/Osteogenesis_Imperfecta/nurses_guide.asp#Diagnosis) [13.1.2008]

[http://www.le.ac.uk/genetics/collagen/COL1A1\\_numbering.pdf](http://www.le.ac.uk/genetics/collagen/COL1A1_numbering.pdf) [14.1.2008]

<http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/COL1A1ID186.html> [15.1.2008]

<http://www.athenadiagnostics.com/servlet/DownloadServlet?id=253> [2.4.2008]

<http://www.le.ac.uk/ge/collagen/col1a1.html> [13.1.2008]

<http://www.jbc.org/cgi/content/full/276/42/38665#References> [13.1.2008]

<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/001573.htm#Treatment> [14.1.2008]

<http://www.oif.org/site/PageServer?pagename=OlandOsteo> [15.1.2008]

[http://www.niams.nih.gov/Health\\_Info/Bone/Osteogenesis/default.as](http://www.niams.nih.gov/Health_Info/Bone/Osteogenesis/default.as) [13.1.2008]

[http://www.niams.nih.gov/Health\\_Info/bone/Osteogenesis\\_Imperfecta/osteogenesis\\_imperfecta\\_ff.asp#f](http://www.niams.nih.gov/Health_Info/bone/Osteogenesis_Imperfecta/osteogenesis_imperfecta_ff.asp#f) [13.1.2008]

### **11.2 České internetové zdroje**

<http://www.hypro.cz/hyRubrIn.aspx?intRubrKis=1251&intLang=0> [2.4.2008]

<http://www.porodnici.cz/prenatalni-diagnostika> [11.2.2008]