

Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik

Vorlesung: Identifikation neuer Gene als Krankheitsursache



Dr. rer. nat. Stephan Rust

Allgemeine Pädiatrie
Klinische Kinder- und
Jugendmedizin
Universitätsklinikum Münster
Albert-Schweitzer-Campus 1
48149 Münster
Tel. 0251 83-55192
Fax: 0251 83-56985
Stephan.Rust@ukmuenster.de
www.klchi.uni-muenster.de

QR Code / Link dieser Vorlesung:
www.klchi.uni-muenster.de/fohlen

Sommersemester 2017



- 1 -

Neue Gene - Warum?

Das menschliche Genom ist doch komplett bekannt?



- Fast – aber seine Funktion noch lange nicht.
- Identifikation neuer Gene als Krankheitsursachen

- 2 -

Volkskrankheiten:

Differenzierung von Ursachen und damit bessere Vorhersage und gezieltere Therapie
WER soll überhaupt therapiert werden und WIE

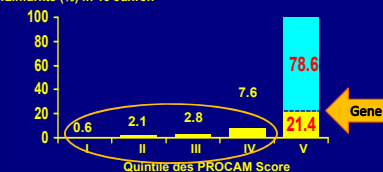
seltene Krankheiten:

pränatale Diagnose, und evtl. auch Ideen für Therapie (klassisches Beispiel PKU)

- 3 -

Der PROCAM Algorithmus

Herzinfarkte (%) in 10 Jahren



Unabhängige Parameter: Alter, systolischer Blutdruck, LDL-Cholesterin, HDL-Cholesterin, Triglyzeride, Diabotes, Rauchen, familiäre Belastung
325 tödliche und nicht-tödliche Herzinfarkte bei 4818 Männern im Alter von 35-65 Jahren

- 4 -

HDL / LDL -Cholesterin

Der HDL-Cholesterinspiegel ist teils

- **genetisch** bedingt (Geschlecht, Zwillingsstudien),
- durch Verhalten (Rauchen ↓, Sport ↑) beeinflusst

Mittelwerte Deutschland

Frauen: 55 mg/dl
Männer: 45 mg/dl

Niedriges HDL

→ höheres Infarktisiko

LDL im Überschuss wird von Makrophagen aufgenommen, ... => Arteriosklerose
HDL kann Cholesterin zur Leber zurückführen.

- 5 -



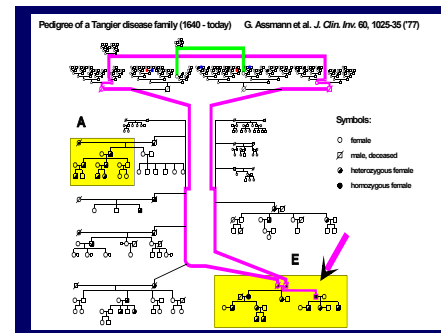
vergrößerte Tonsillen
Tangier Krankheit

- 6 -

Tangier Krankheit

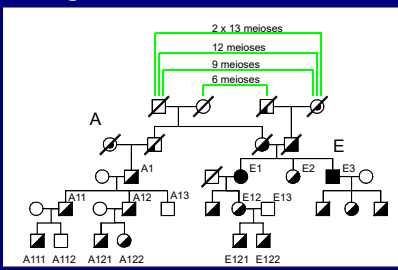
- Tonsillen
- Schaumzellen auch bei Heterozygoten in Mukosa des Intestinums und Dickdarms
- Hepatosplenomegalie
- Periphere Neuropathie
- Thrombozytopenie
- Erhöhte Wahrscheinlichkeit für **koronare Herzkrankheit**
- **HDL-Defizienz**

- 7 -



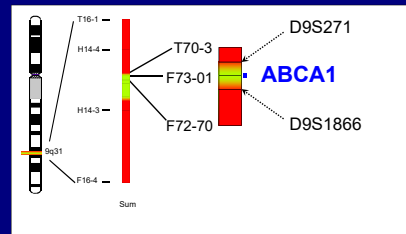
- 8 -

Tangier-Krankheit: Stammbaum



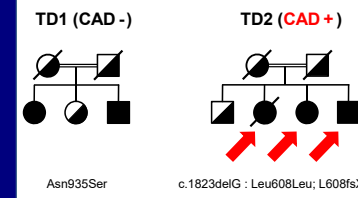
- 9 -

Identifikation des Tangiergens ABCA1



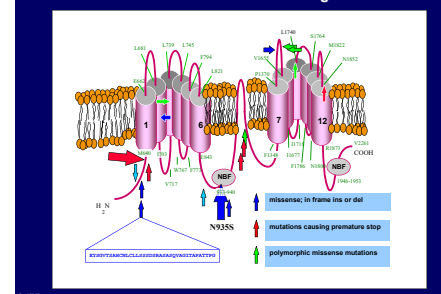
- 10 -

Verschiedene ABCA1 Defekte unterschiedlicher Phänotyp?



- 11 -

Structure of ABCA1 - Mutations in Tangier Disease



Effekt der Mutationen im ABCA1:

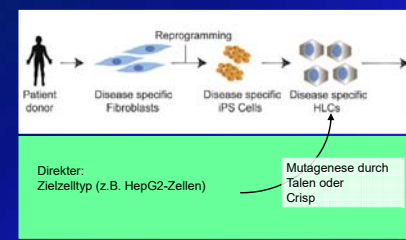
..fs*635: vorzeitiger Abbruch, RNA wird weitgehend abgebaut (-> nonsense mediated decay), keinerlei Funktion mehr, HDL-Defizienz, Oxysterole im Blut, Arteriosklerose, Herzinfarkt

Asn935Ser: ABCA1 - NBF1 ist defekt
HDL-Defizienz
ABER: Oxysterol-Transport noch möglich
KEINE Arteriosklerose

=> **das Wissen über die konkrete Mutation ist beim ABCA1 wichtiger als der Effekt auf das HDL-Cholesterin**

Hepatocyte like cells

Patientenspezifische Zellkulturmodelle
- Beweis der funktionellen Relevanz von Mutanten



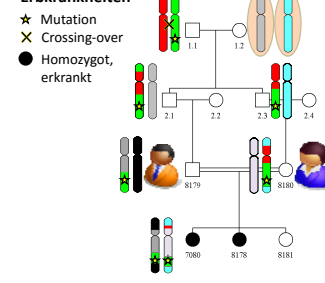
Direkter: Zielzelltyp (z.B. HepG2-Zellen)

Mutagenese durch TALEN oder Crisp

Technik:
Vererbung in Familien und in großen Case-Control Studien mit **SNPs** (single nucleotide polymorphisms)

- 15 -

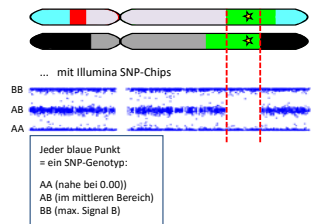
Identifikation der ursächlichen Gene bei rezessiven Erbkrankheiten



- 16 -

Identifikation der ursächlichen Gene bei rezessiven Erbkrankheiten

1. Grobe Lokalisation



- 17 -

SNPs – auch geeignet für große Case-Control Studien „GWAS“ (genome wide association study)

- auch geeignet, wenn kein meßbarer Phänotyp außer Endpunktereignis; geeignet besonders für häufige Variante mit schwachem Effekt

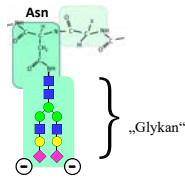
- 18 -

Schwerpunkt Glykoproteine, N-Glykosylierung:

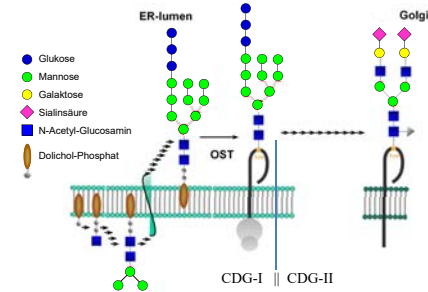
Serum Transferrin: 679 Aminosäuren, 2 Glykosylierungsstellen:
N-Glykosylierung am Asparagin (Asn) in ... - Asn - X - Ser - ... oder ... - Asn - X - Thr - ... X: nicht Pro

im Transferrin:

... Asn Tyr Asn Lys Ser Asp Asn ...
... Gly Ser Asn Val Thr Asp Cys ...



- 19 -



- 20 -

Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Die Ladung eines Proteins in Lösung wird durch den pH bestimmt

- im sauren Bereich: R-COOH, R-NH₃⁺

- im basischen Bereich: R-COO⁻, R-NH₂

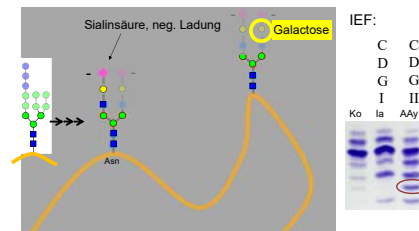
Aminosäuren mit potentiell geladene Seitenketten:

Asparaginsäure, Glutaminsäure,
Lysin, Arginin, Histidin
Cystein, Tyrosin (geben bei basischen pH Proton ab)

Außerdem: Sialinsäuren am Ende der Glykane

- 21 -

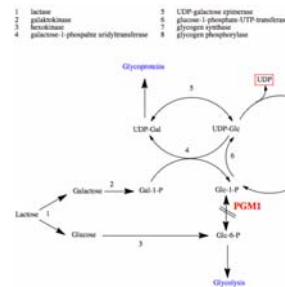
Transferrin-Glykosylierung



=> Isoelektrische Fokussierung des Transferrins wird genutzt zur Diagnose von Glykosylierungsstörungen

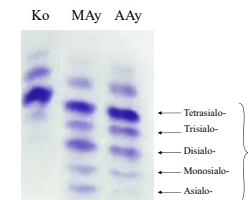
- 22 -

Beispiel: Entdeckung der PGM1-CDG



- 23 -

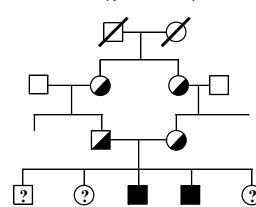
(PGM1-CDG:) In der Isoelektrischen Fokussierung (IEF) von Transferrin zeigte sich eine Mischform CDG-I / II



- 24 -

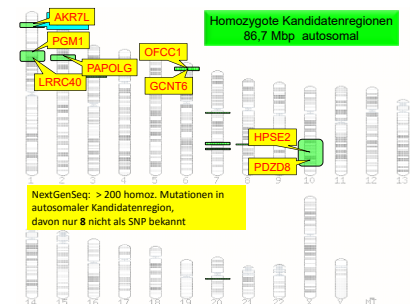
Stammbaum einer Familie mit CDGx

(später PGM1-CDG)



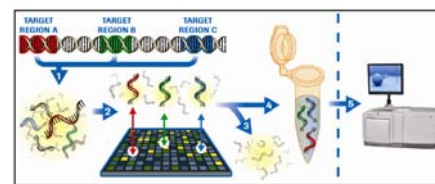
1. Homozygotiemapping
2. Next Generation Sequenzierung

- 25 -



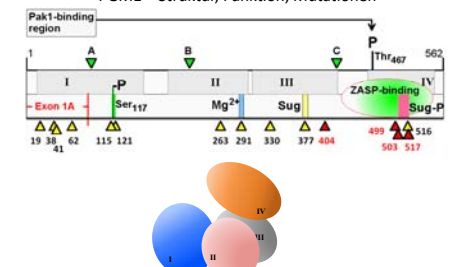
- 26 -

Anreicherung und Sequenzierung von interessanter Region oder Kompletzsequenzierung von Patientengenom



- 27 -

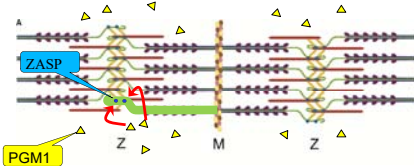
PGM1 – Struktur, Funktion, Mutationen



- 28 -

Dilatative Kardiomyopathie - ZASP

Z band alternately spliced PDZ-containing protein

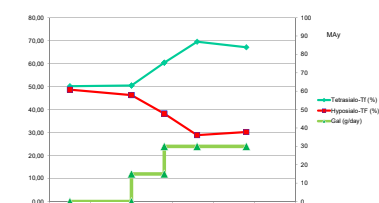


- ZASP Defekt → keine Bindung von PGM1 → DCM

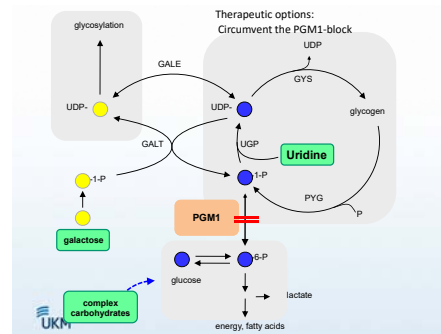
Atmura T, Cardiovasc Res (2009) 83, pp 80-8

- 29 -

Galactose treatment of PGM1-deficiency tends to correct CDG:



- 30 -



Aufspüren des ursächlichen Gens wenn keine Konsanguinität vorliegt

Exom-Sequenzierung: 350 000 Mutationen

Allelfreq <= 2% (5300)

Relevante Mutationen: 451 in 85 Genen

Brain-storming >

geneSymbol	#Mut
ADAMTS19	2
AGAP1	1
ATPA1	1
BCAL1	2
CC2P	2
CTSD2	2
SKAM2	2
FAM25C	2
FACT2	2
PAT1	2
GSX1	1
GSX1L	1
HIF1B	1
KCNH1	2
KCNH2	1
KH2DL3	2
LRP2	2
LRMO1	1
MSLN	2
NCAL1	1
NO1	1
PRK21	2
PRKDC5	2
PRKOL2	2
PRKSD2	2
RBP2K3	2
SCYRN1	2
SCYRN2	2
TEF1	2
TEF14	8
TNFI	2
UGHR	2
WDR74	2
ZNF138	2
ZNF423	2

- 31 -