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 83-55182
Fax: 0251 83-56085
Stephan.Rust@ukmuenster.de
www.klichi.uni-muenster.de

QR Code / Link dieser Vorlesung:
www.klichi.uni-muenster.de/folien

Wintersemester 2018/19

Neue Gene - Warum?

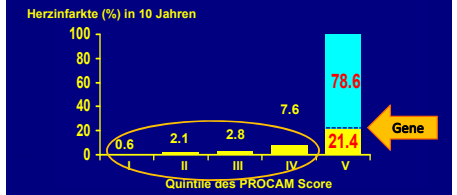
Das menschliche Genom ist doch komplett bekannt?

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

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)

Der PROCAM Algorithmus



Unabhängige Parameter: Alter, systolischer Blutdruck, LDL-Cholesterin, HDL-Cholesterin, Triglyzeride, Diabetes, Rauchen, familiäre Belastung

325 tödliche und nicht-tödliche Herzinfarkte bei 4818 Männern im Alter von 35-65 Jahren

HDL / LDL -Cholesterin

Der HDL-Cholesterinspiegel ist teils

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

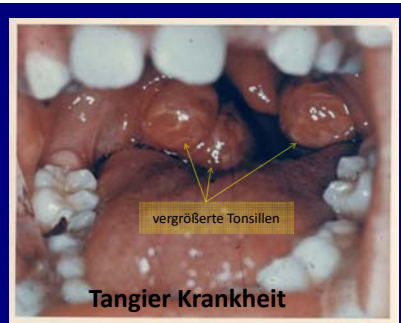
Mittelwerte Deutschland

Frauen: 55 mg/dl

Männer: 45 mg/dl

Niedriges HDL → höheres Infarktrisiko

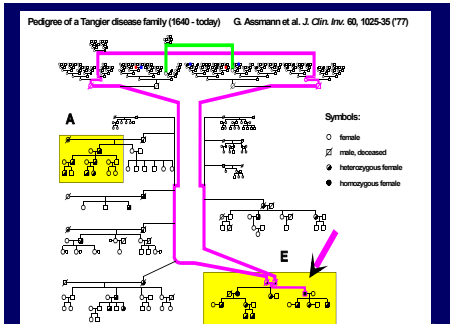
LDL im Überschuss wird von Makrophagen aufgenommen,
... => Arteriosklerose
HDL kann Cholesterin zur Leber zurückführen.



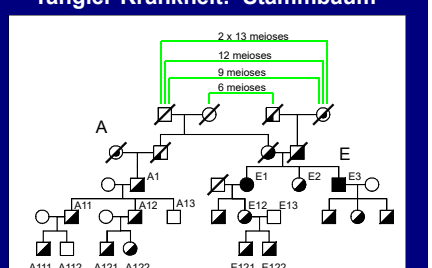
Tangier Krankheit

Tangier Krankheit

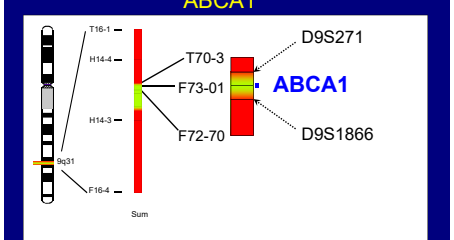
- Tonsillen
- Schaumzellen auch bei Heterozygoten in Mukosa des Intestinums und Dickdarms
- Hepatosplenomegalie
- Periphere Neuropathie
- Thrombozytopenie
- Erhöhte Wahrscheinlichkeit für **koronare Herzkrankheit**
- **HDL-Defizienz**



Tangier-Krankheit: Stammbaum

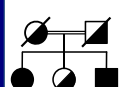


Identifikation des Tangiergens ABCA1



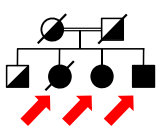
Verschiedene ABCA1 Defekte unterschiedlicher Phänotyp?

TD1 (CAD -)



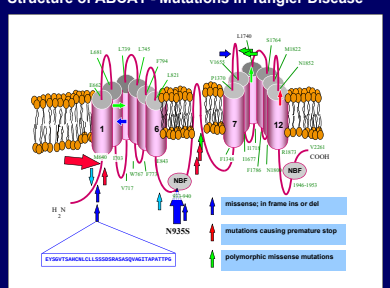
Asn935Ser

TD2 (CAD +)



c.1823delG : Leu608Leu; L608fsX635

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

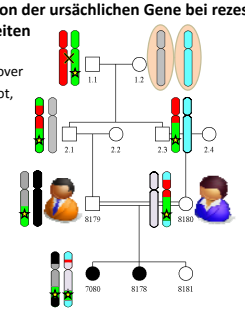
Direkter:
Zielzelltyp (z.B. HepG2-Zellen)

Mutagenese durch Talen oder Crisp

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

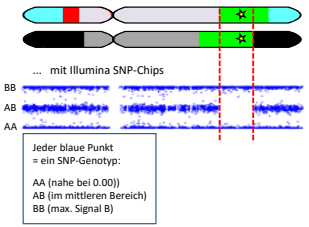
Identifikation der ursächlichen Gene bei rezessiven Erbkrankheiten

- ☆ Mutation
- ✕ Crossing-over
- ● Homozygot, erkrankt



Identifikation der ursächlichen Gene bei rezessiven Erbkrankheiten

1. Grobe Lokalisation



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

Schwerpunkt Glykoproteine, N-Glykosylierung:

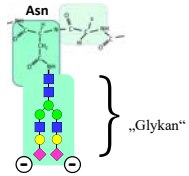
Serum Transferrin: 679 Aminosäuren, 2 Glykosylierungsstellen:

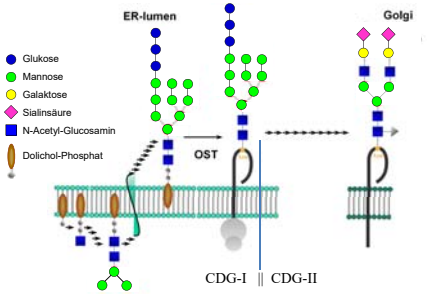
N-Glykosylierung am ... - Asn – X – Ser - ... Asparagin (Asn) in oder ... - Asn – X – Thr - ... X : nicht Pro

im Transferrin:

... Asn Tyr **Asn** Lys **Ser** Asp Asn ...

... Gly Ser **Asn** Val **Thr** Asp Cys ...





Isolektrische Fokussierung (IEF)

Die Ladung eines Proteins in Lösung wird durch den pH bestimmt

- im sauren Bereich: R-COO**H**, R-$NH_3^{\oplus}$
- im basischen Bereich: R-$COO^{\ominus}$, R-NH_2

Aminosäuren mit potentiell geladene Seitenketten:

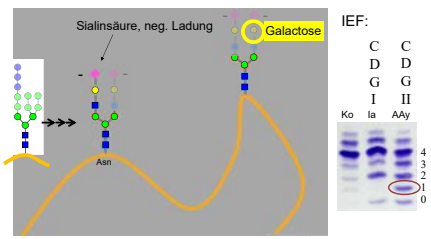
Asparaginsäure, Glutaminsäure,

Lysin, Arginin, Histidin

Cystein, Tyrosin (geben bei basischen pH Proton ab)

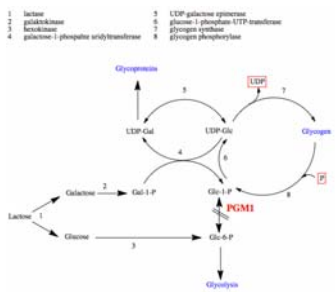
Außerdem: Sialinsäuren am Ende der Glykane

Transferrin-Glykosylierung

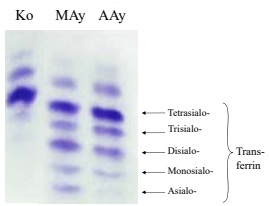


=> Isoelektrische Fokussierung des Transferrins wird genutzt zur Diagnose von Glykosylierungsstörungen

Beispiel: Entdeckung der PGM1-CDG

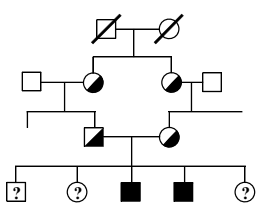


(PGM1-CDG:) In der Isoelektrischen Fokussierung (IEF) von Transferrin zeigte sich eine Mischform CDG-I / II

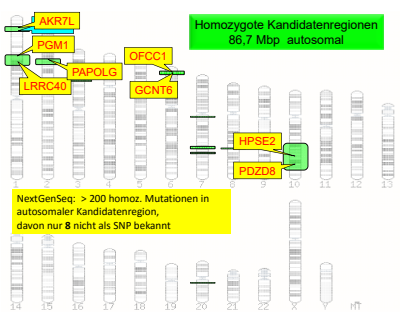


Stammbaum einer Familie mit CDGx

(später PGM1-CDG)



1. Homozygotiemapping
2. Next Generation Sequenzierung



Anreicherung und Sequenzierung von interessanter Region oder Komplettsequenzierung von Patientengenom

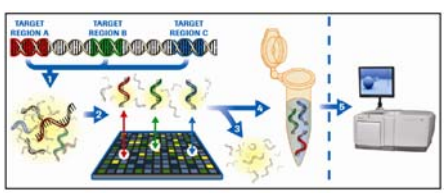
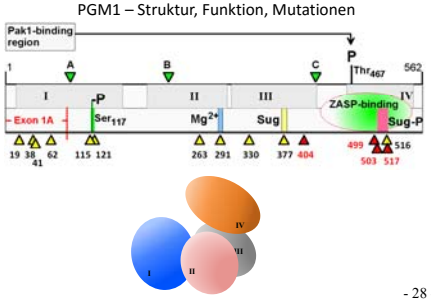


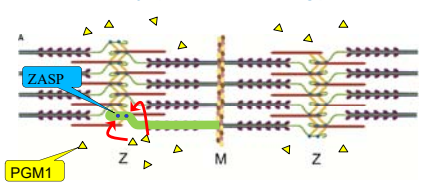
Figure 1: The NimbleGen Sequence Capture Protocol

PGM1 – Struktur, Funktion, Mutationen



Dilatative Kardiomyopathie - ZASP

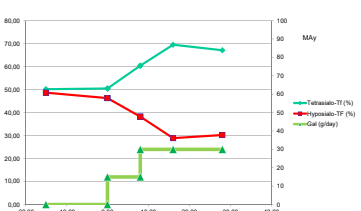
Z band alternately spliced PDZ-containing protein

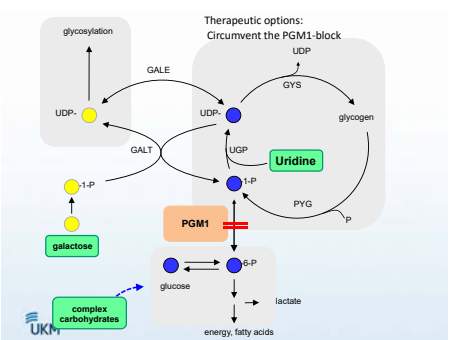
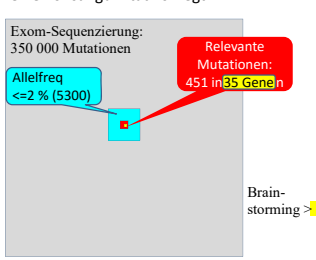
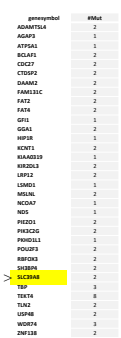


- ZASP Defekt → keine Bindung von PGM1 → DCM

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

Galactose treatment of PGM1-deficiency tends to correct CDG:





Aufspüren des ursächlichen Gens wenn keine Konsanguinität vorliegt