

Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik

Vorlesung: Identifikation neuer Gene als Krankheitsursachen



Dr. rer. nat. Stephan Rust

Allgem. Pädiatrie, Klin. Kinder- u. Jug.-med.,
Stoffwechsellabor Prof. Marquardt

48149 Münster

Tel.: 0251 83-55182

rusts@uni-muenster.de

stephan.rust@ukmuenster.de

Wintersemester 2022/23

uvula bifida



„Identifikation neuer Gene als Krankheitsursachen“

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

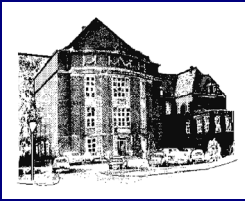
soll überhaupt therapiert werden und

WIE

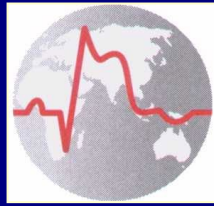
Stoffwechsel verstehen, alle Gene im Pathway
kennen, um Angriffspunkte für Therapie zu
definieren.

seltene Krankheiten

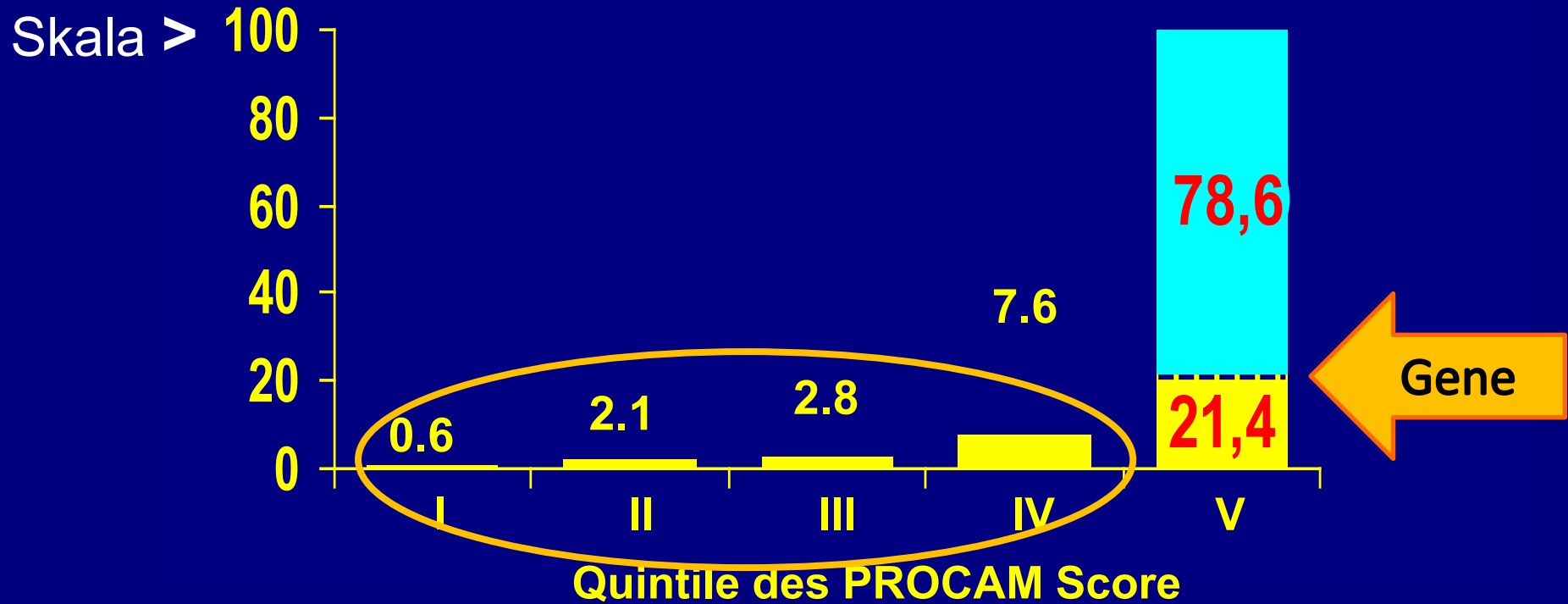
pränatale Diagnose, und evtl. auch Ideen für Therapie
(klassisches Beispiel PKU)



Der PROCAM Algorithmus



Herzinfarkte (%) in 10 Jahren



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

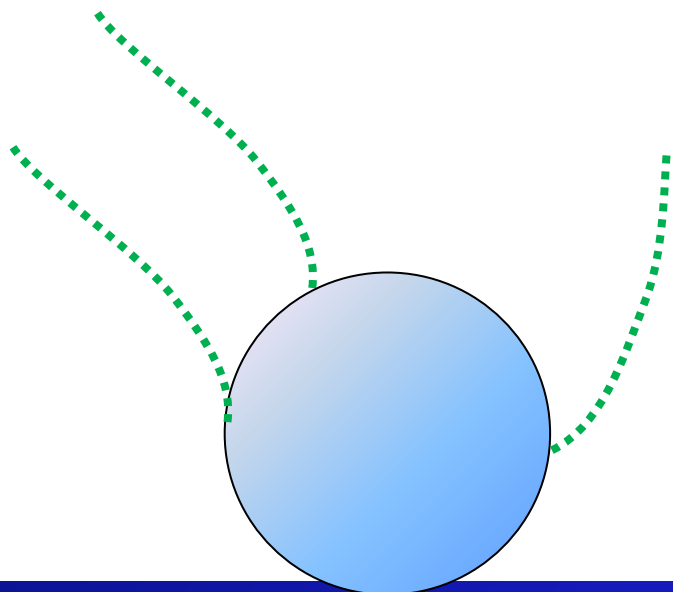
325 tödliche und nicht-tödliche Herzinfarkte bei 4818 Männern im Alter von 35-65 Jahren

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

Prinzip bei Illumina: Synthese

T

C



2 Allele, „A“ und „B“

B-Allel-Anteil

100 %

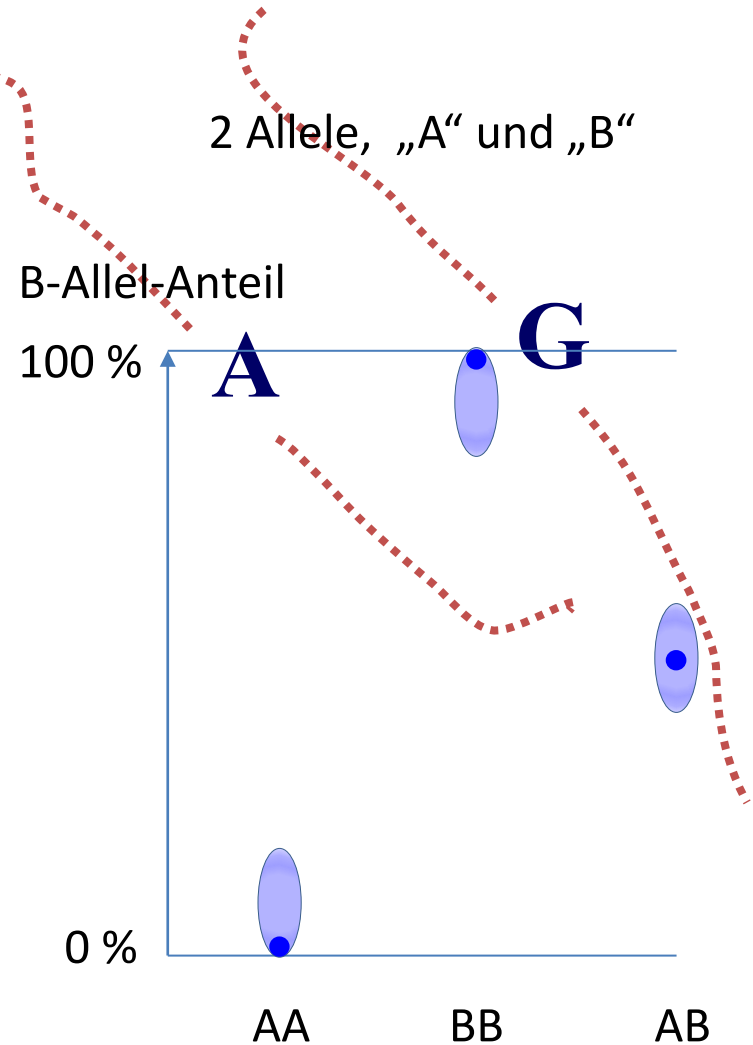
A **G**

0 %

AA

BB

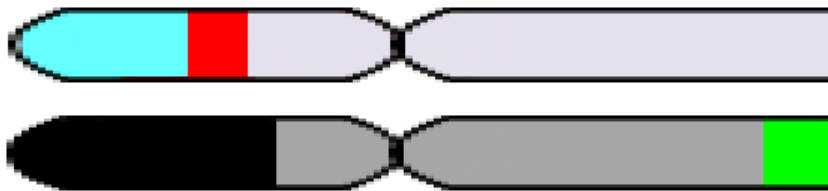
AB



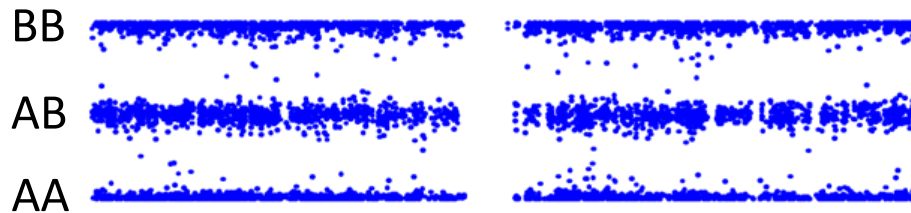
Identifikation der ursächlichen Gene bei rezessiven Erbkrankheiten •

Erbkrankheiten

1. Grobe Lokalisation

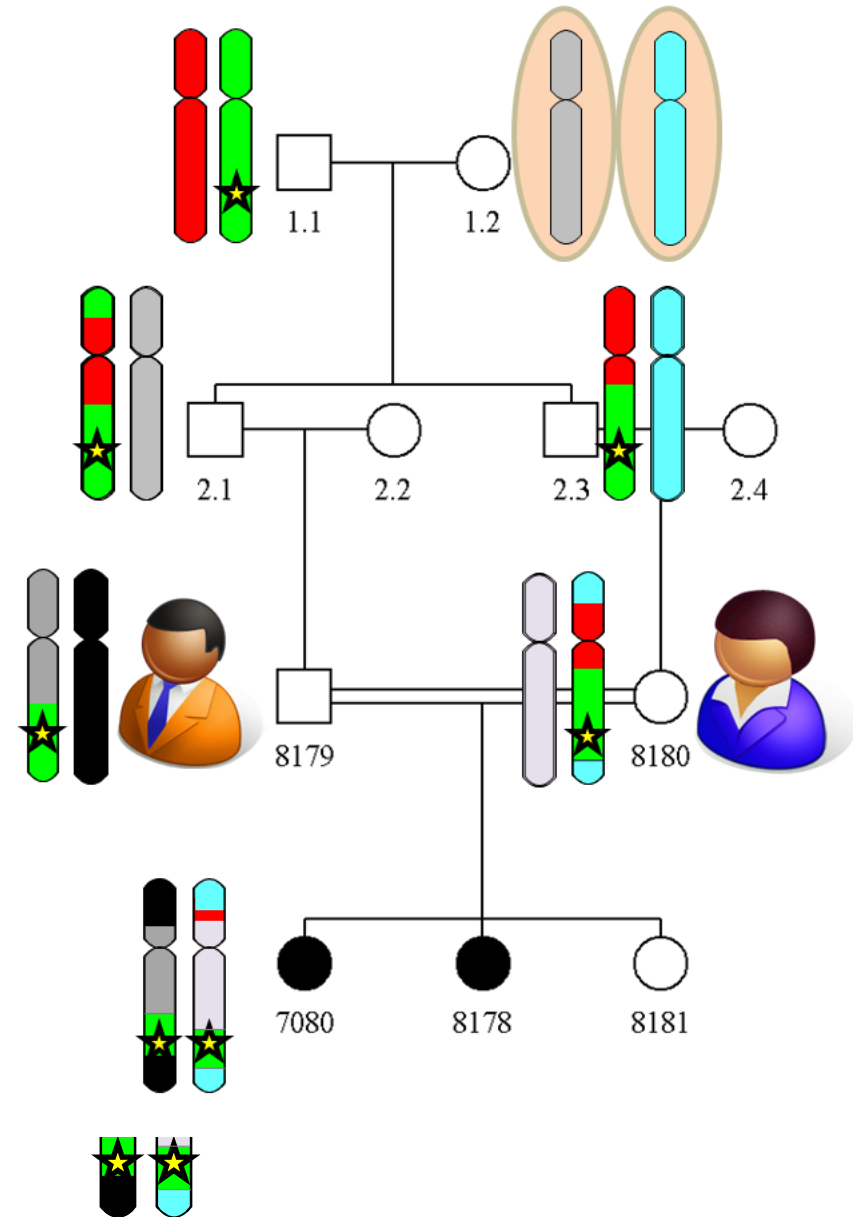


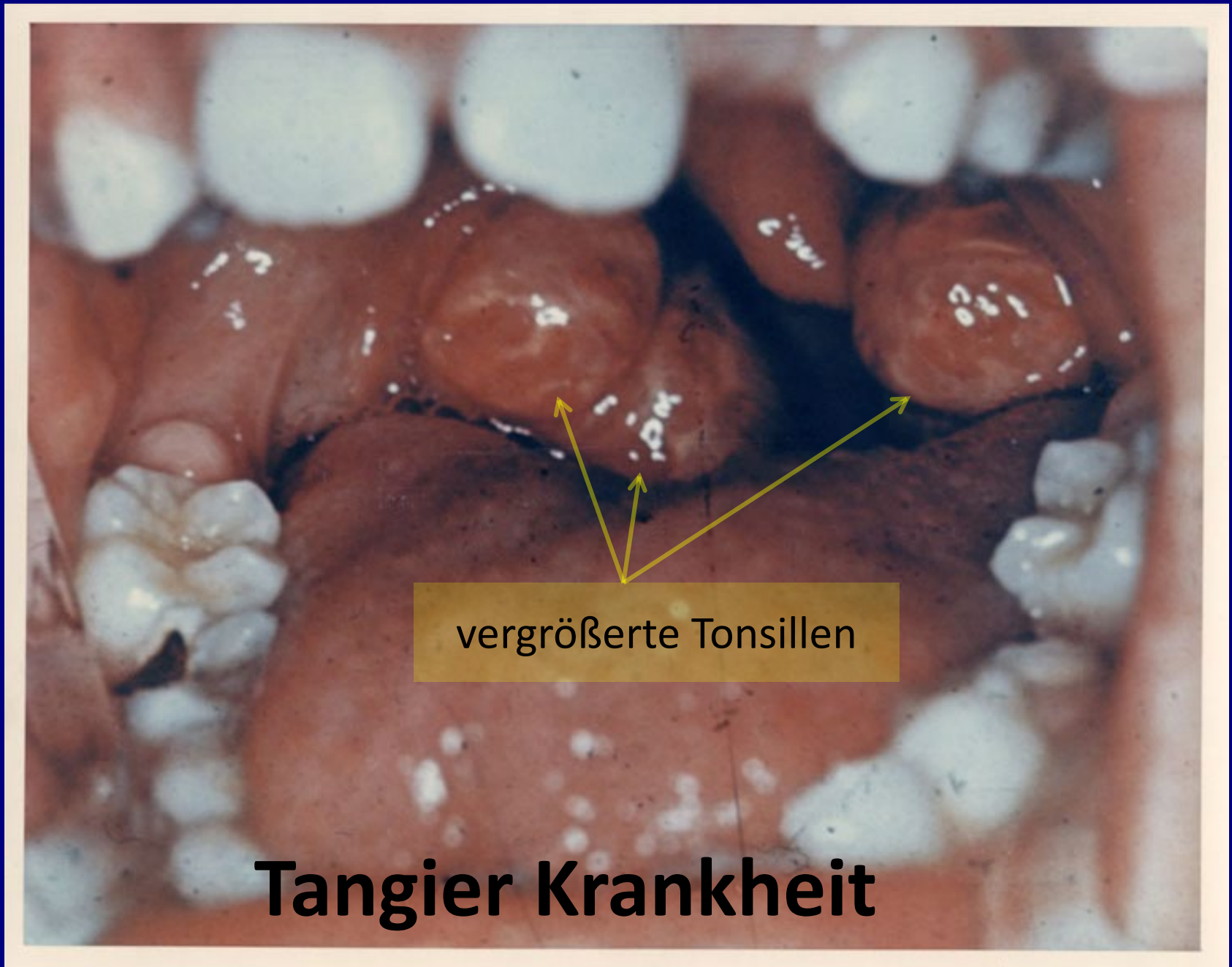
... mit Illumina SNP-Chips



Jeder blaue Punkt
= ein SNP-Genotyp:

AA (nahe bei 0.00))
AB (im mittleren Bereich)
BB (max. Signal B)





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**

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

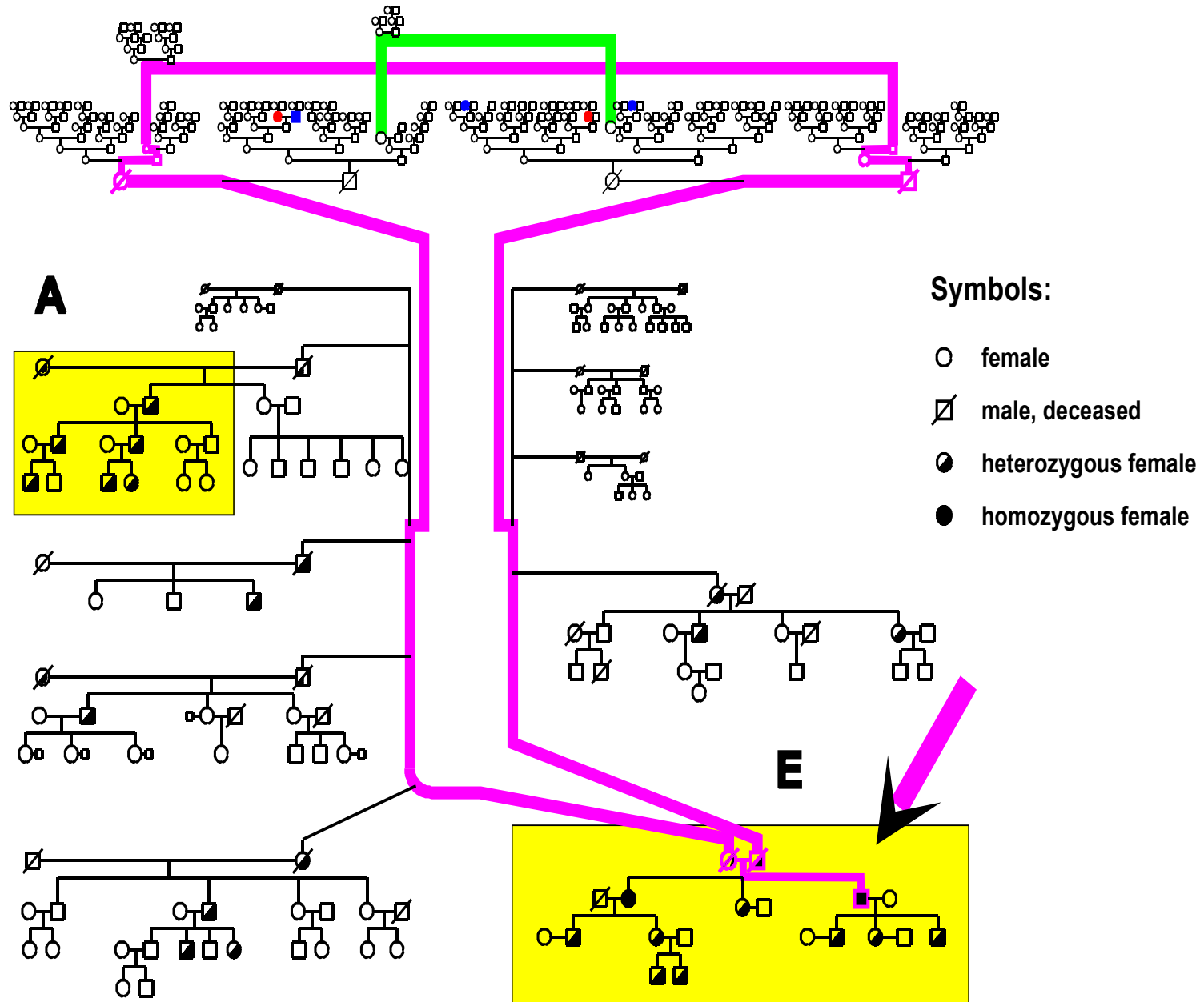


höheres Infarktrisiko

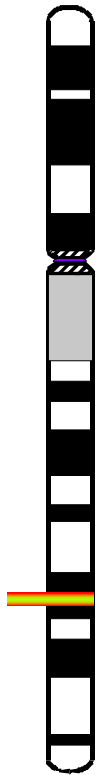
LDL im Überschuss wird von Makrophagen aufgenommen,
... => Arteriosklerose

HDL kann Cholesterin zur Leber zurückführen.

Pedigree of a Tangier disease family (1640 - today) G. Assmann et al. *J. Clin. Inv.* 60, 1025-35 ('77)



Identifikation des Tangiergens

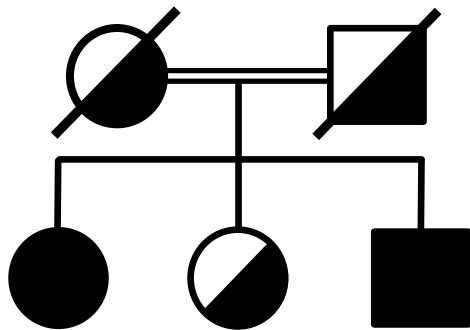


9q31

■ **ABCA1**

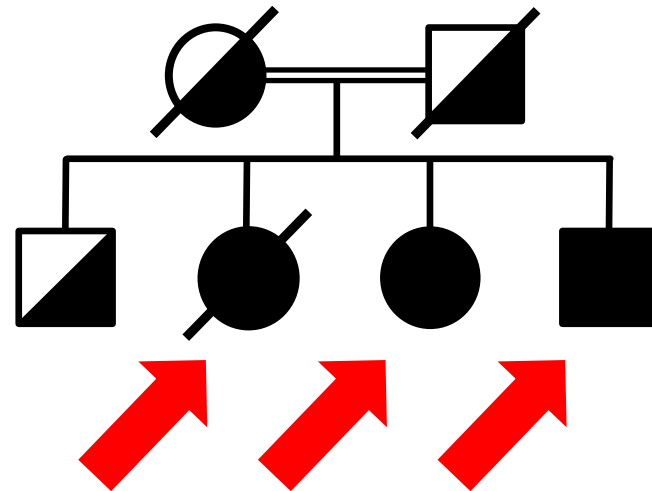
Unterschiedliche ABCA1 Defekte unterschiedlicher Effekt

TD1 (CAD -)



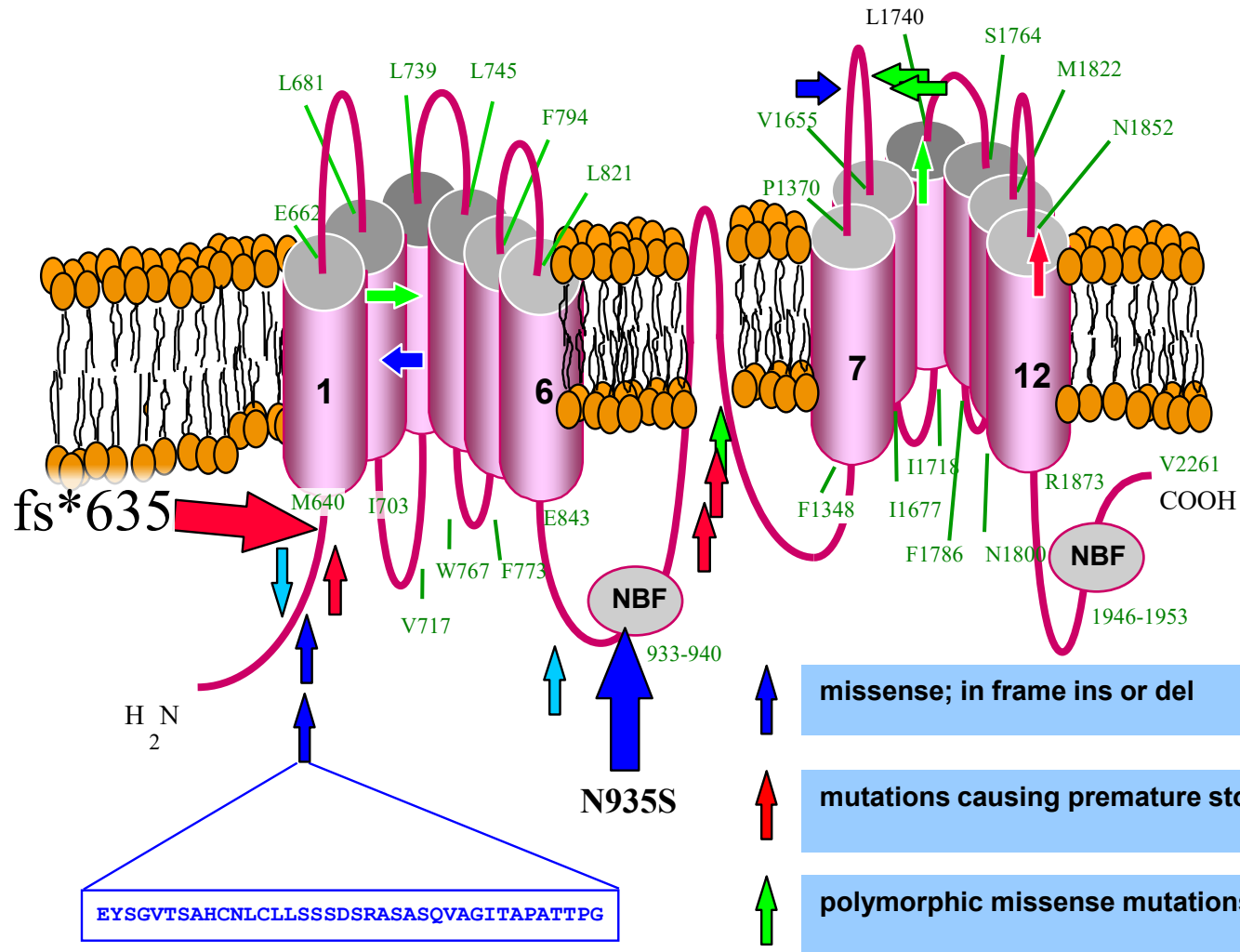
Asn935Ser

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**

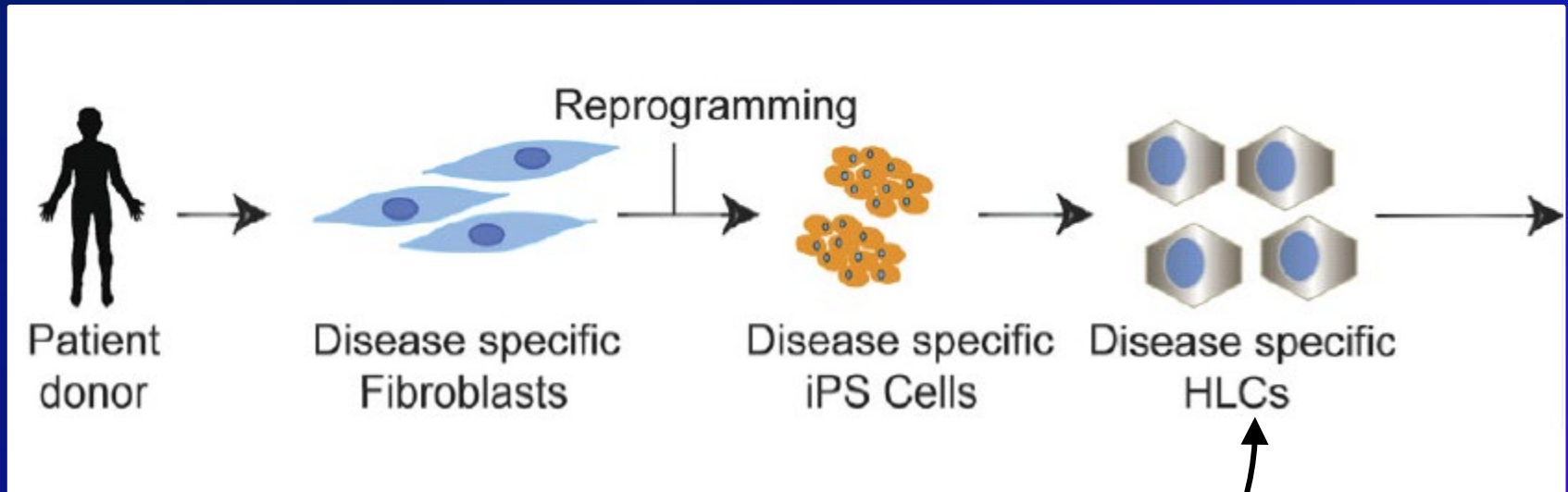
Asn935Ser: ABCA1 - NBF1 ist defekt
HDL-Defizienz
ABER: Oxysterol-Transport noch möglich
KEINE Arteriosklerose

=> **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 und nach Korrektur als Therapiemethode



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

Mutagenese durch
Talen oder
CRISPR/Cas9

SNPs – auch geeignet für große
Case-Control Studien

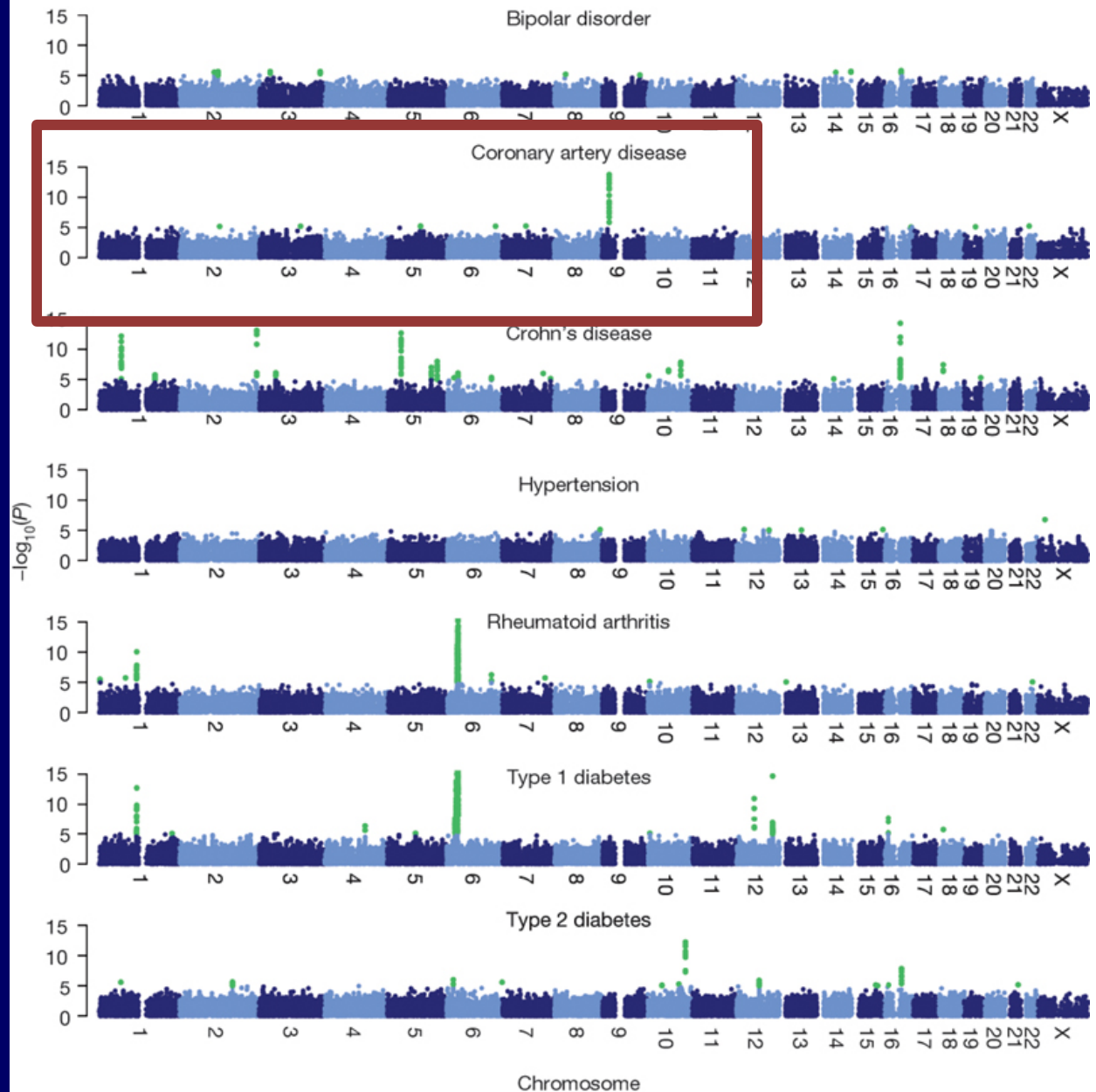
„GWAS“

(genome wide association study)

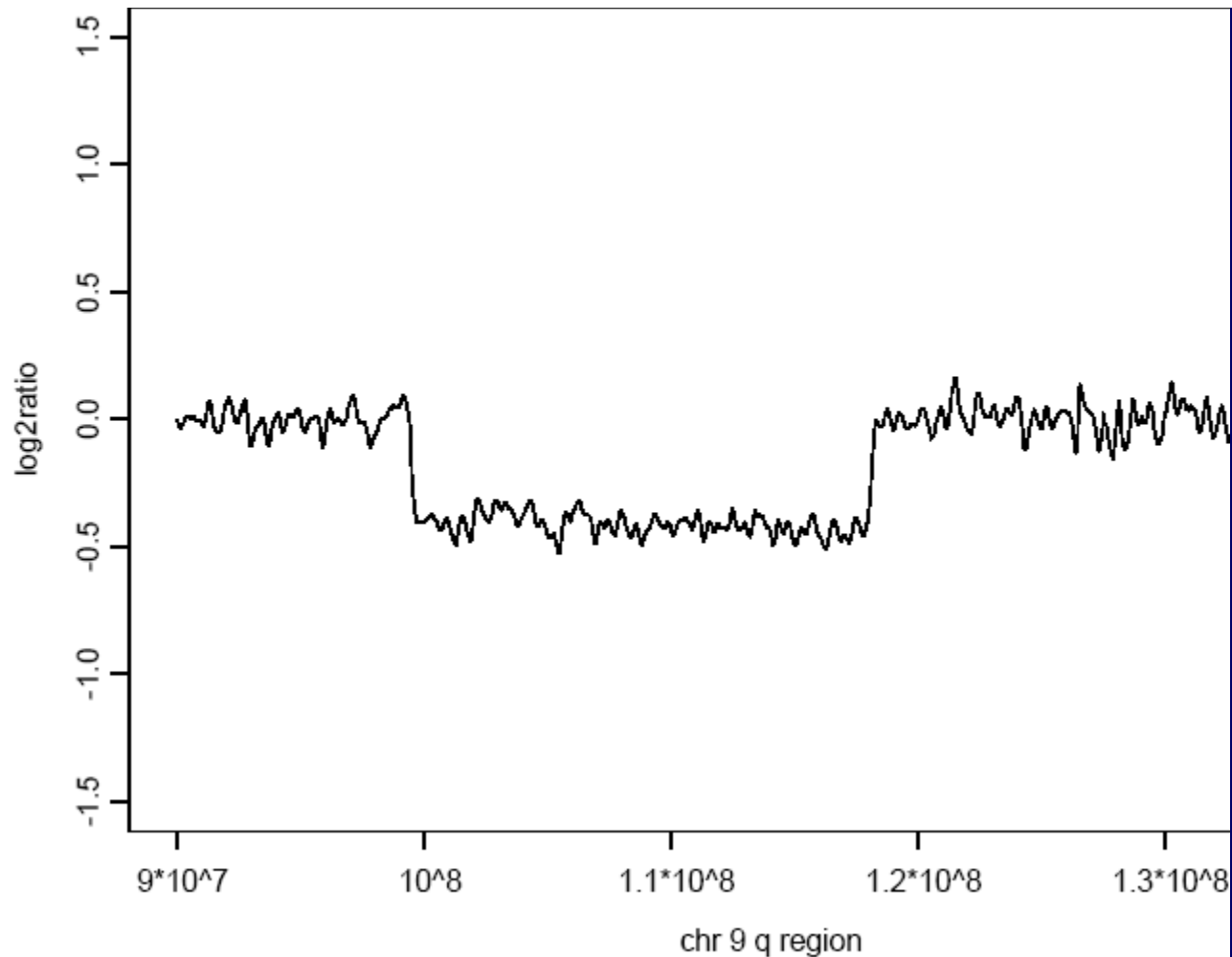
- auch geeignet, wenn kein meßbarer
Phänotyp außer Endpunktereignis;
geeignet besonders für häufige
Variante mit schwachem Effekt

Ergebnisse
Mai-Juni
2007:

Wellcome Trust
case control
consortium:
14 000 cases,
3000 controls



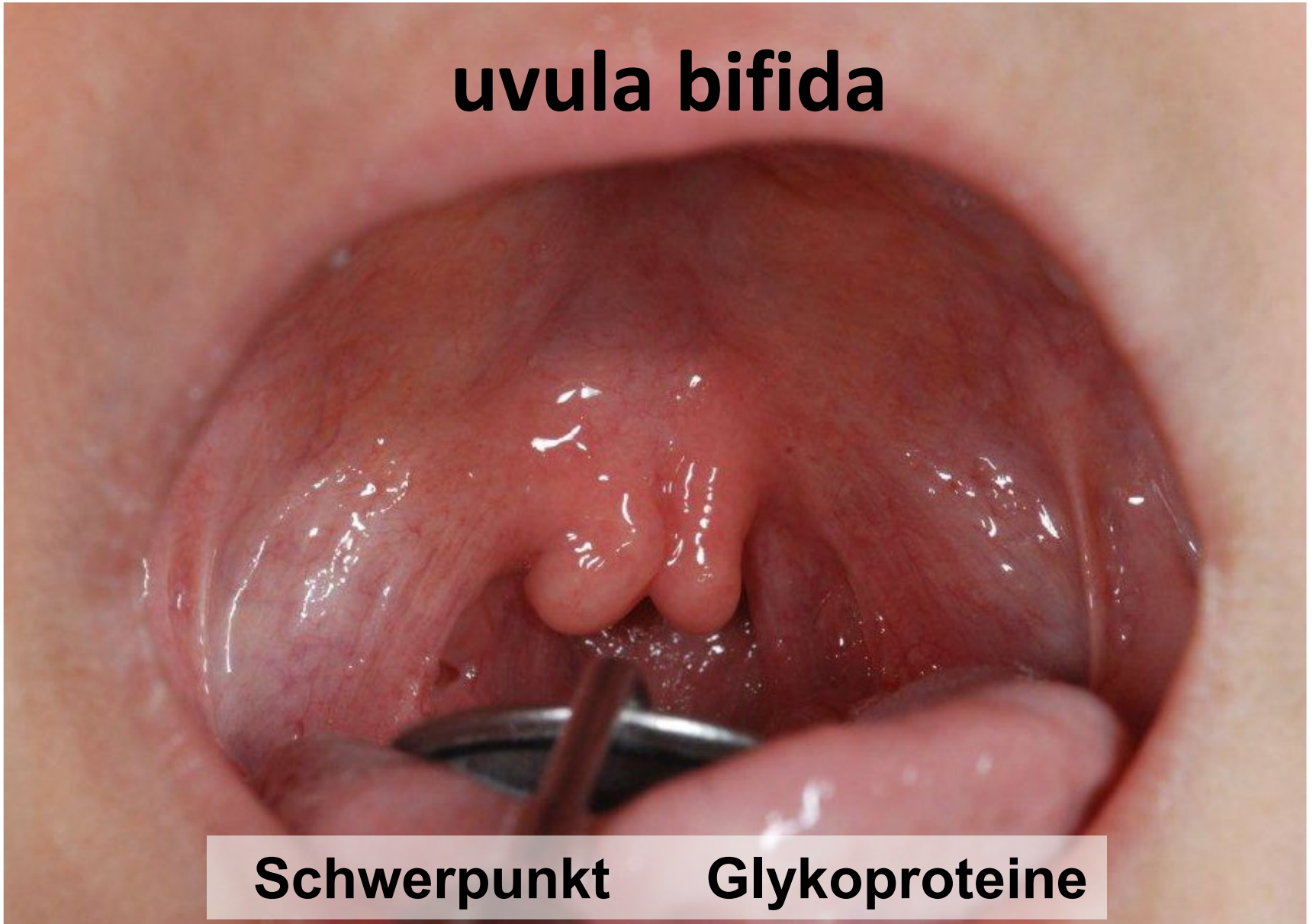
9q-Deletion in der Chip-Analyse:



Conrad DF et al. Nat Genet. 2006 Jan;38(1):75-81

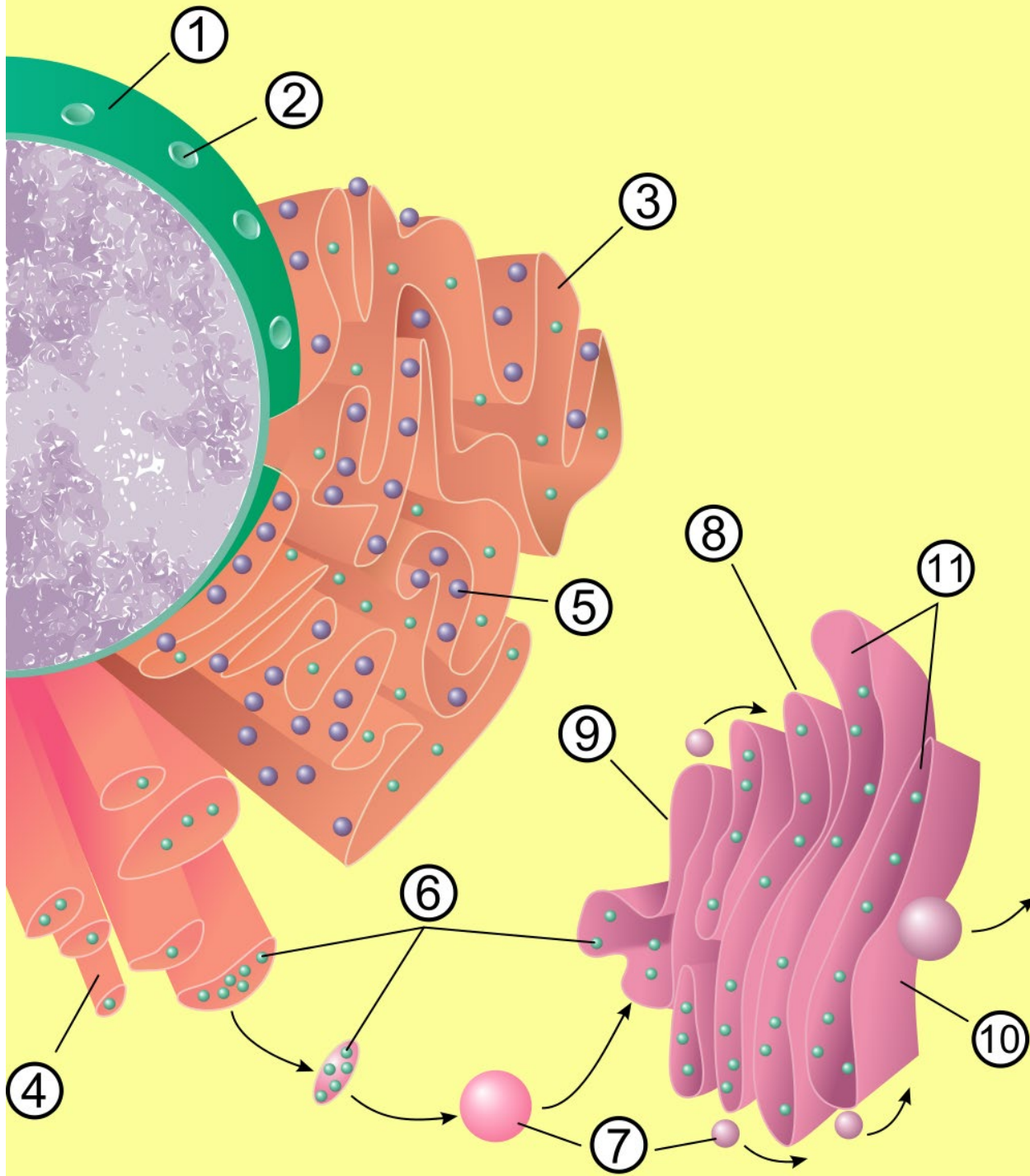
... we estimate that typical individuals are hemizygous for roughly 30-50 deletions larger than 5 kb, totaling around 550-750 kb of euchromatic sequence across their genomes. The detected deletions span a total of 267 known and predicted genes.

uvula bifida

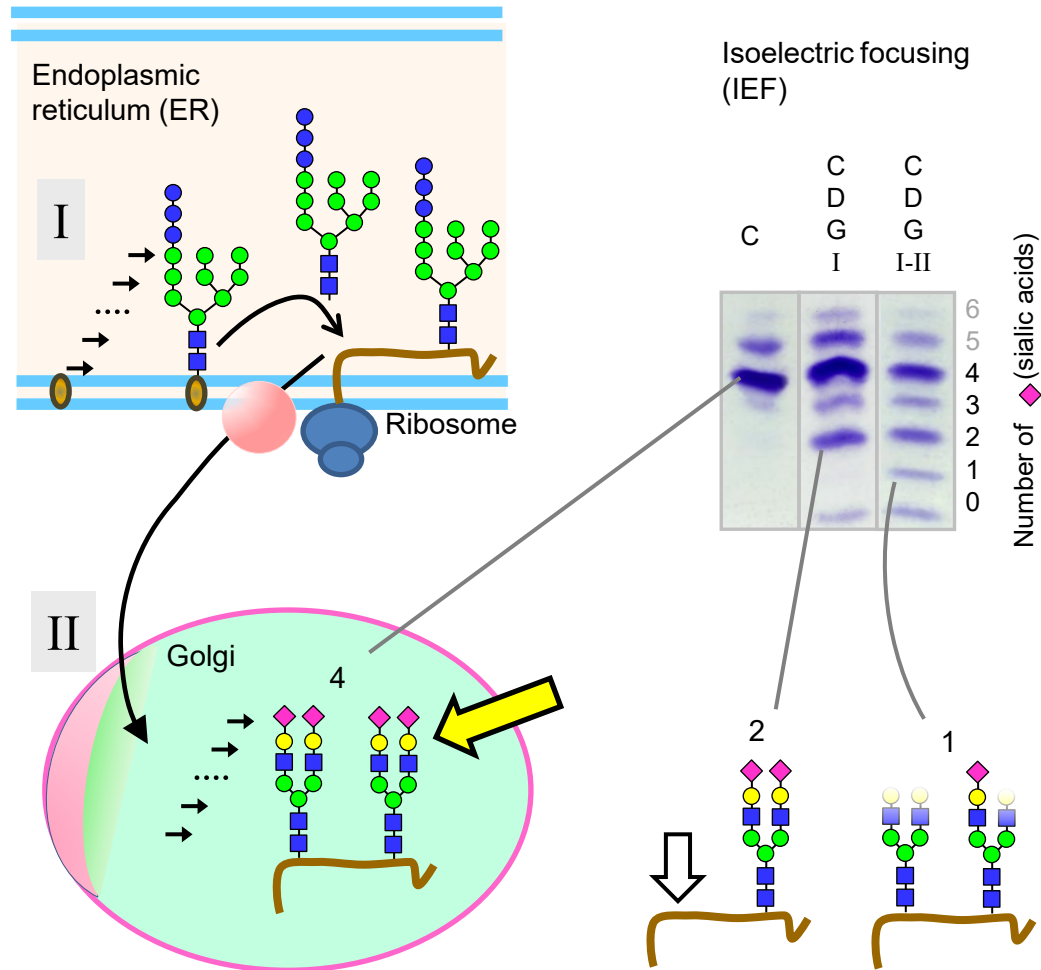


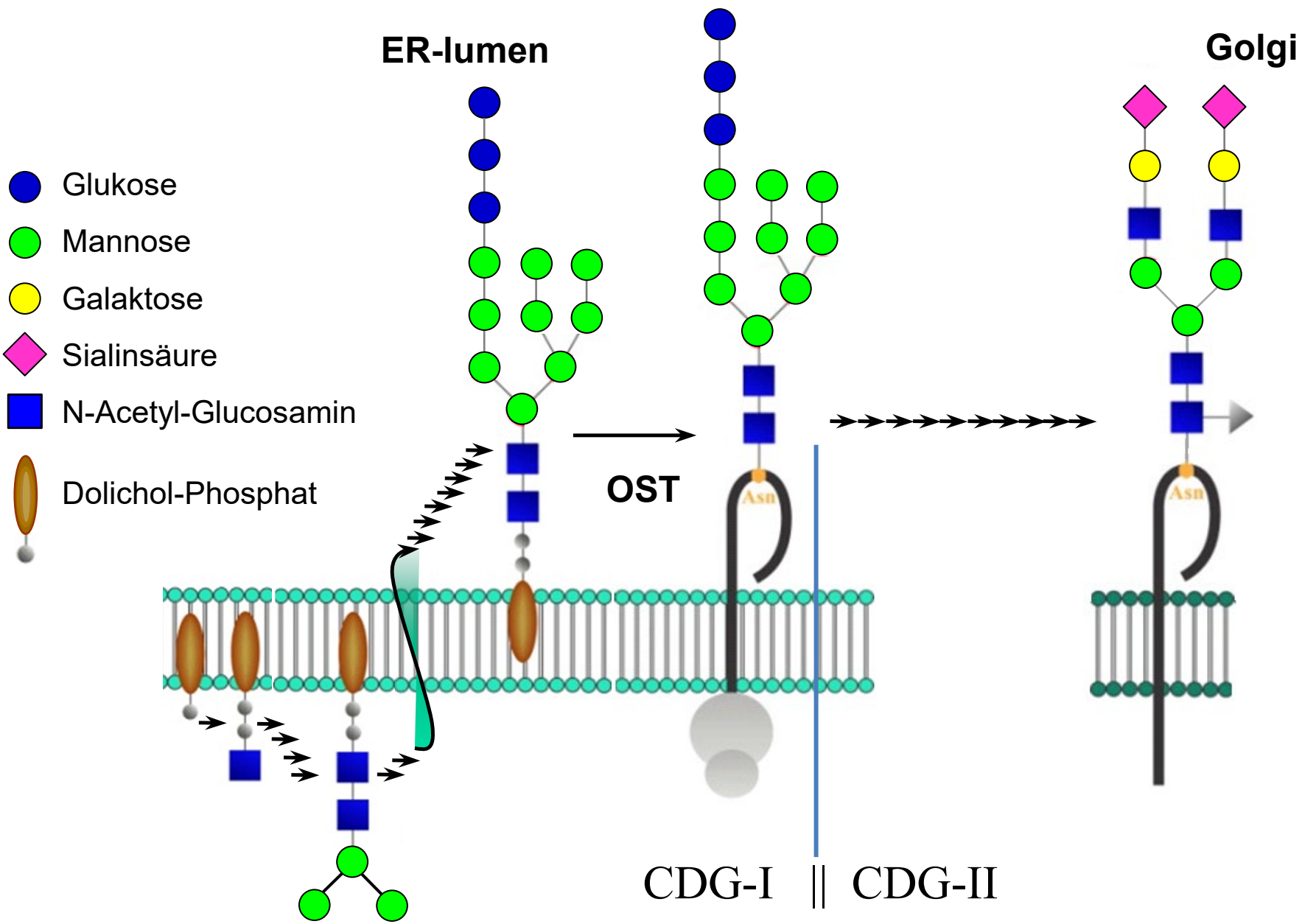
Schwerpunkt

Glykoproteine



- 1 Kernmembran
- 2 Kernpore
- 3 Rauhes ER
- 4 Glattes ER
- 5 Ribosom
- 6 Proteine in Vesikel
- 7 Transportvesikel
- 8 Golgi
- 9 Cis-Golgi
- 10 Trans-Golgi
- 11 Zisternen





Glykoproteine, N-Glykosylierung:

Serum Transferrin: 679 Aminosäuren, 2 Glykosylierungsstellen:

N-Glycosylierung am Asn in

... - Asn - X - Ser - ...
Pro

oder

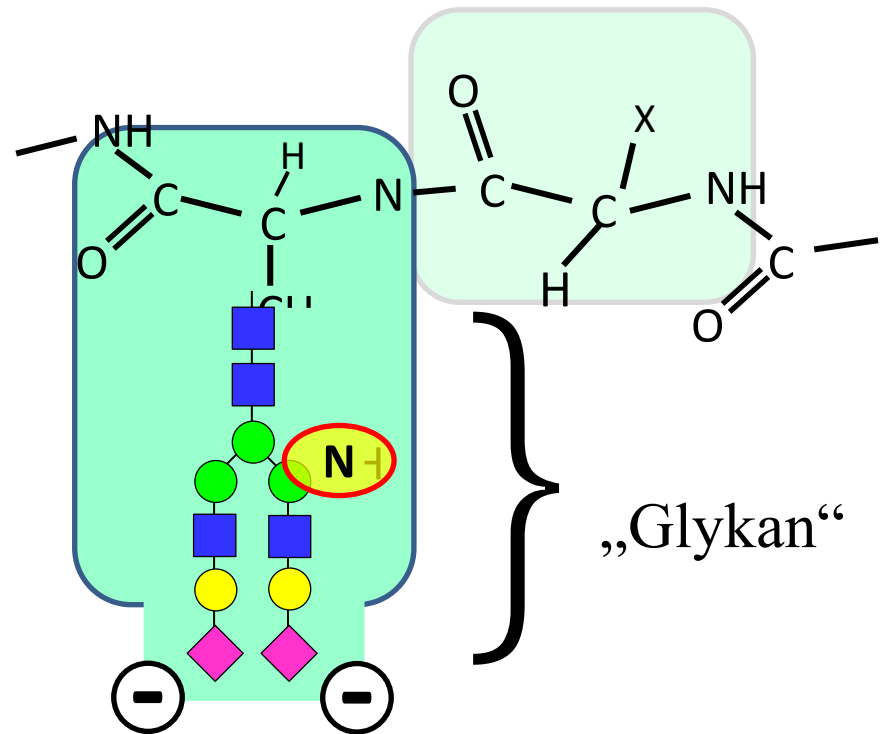
... - Asn - X - Thr - ...

X : nicht

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-COOH , R-NH_3^+
- im basischen Bereich: R-COO^- , R-NH_2

Aminosäuren mit potentiell geladene Seitenketten:

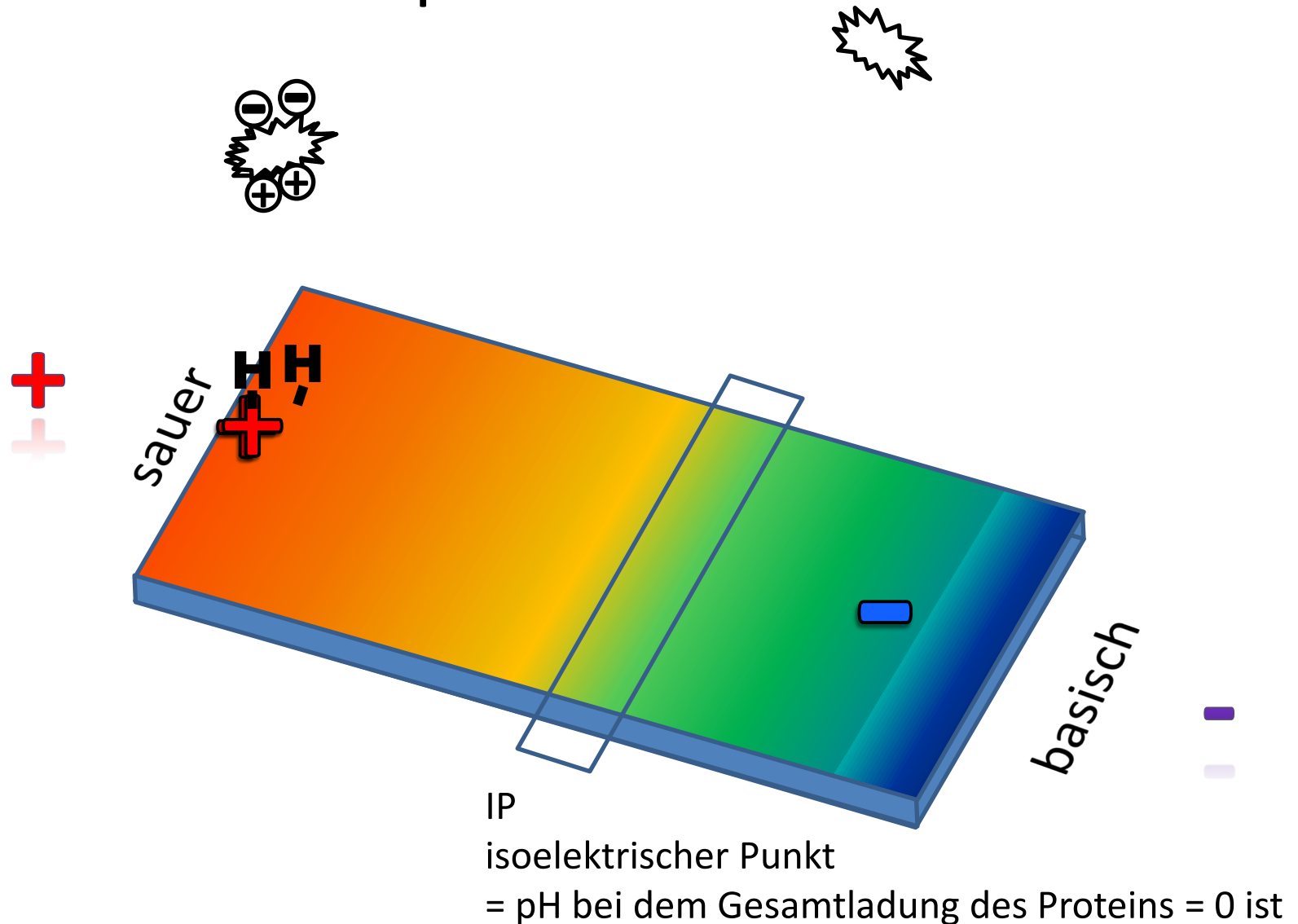
Asparaginsäure, Glutaminsäure,

Lysin, Arginin, Histidin

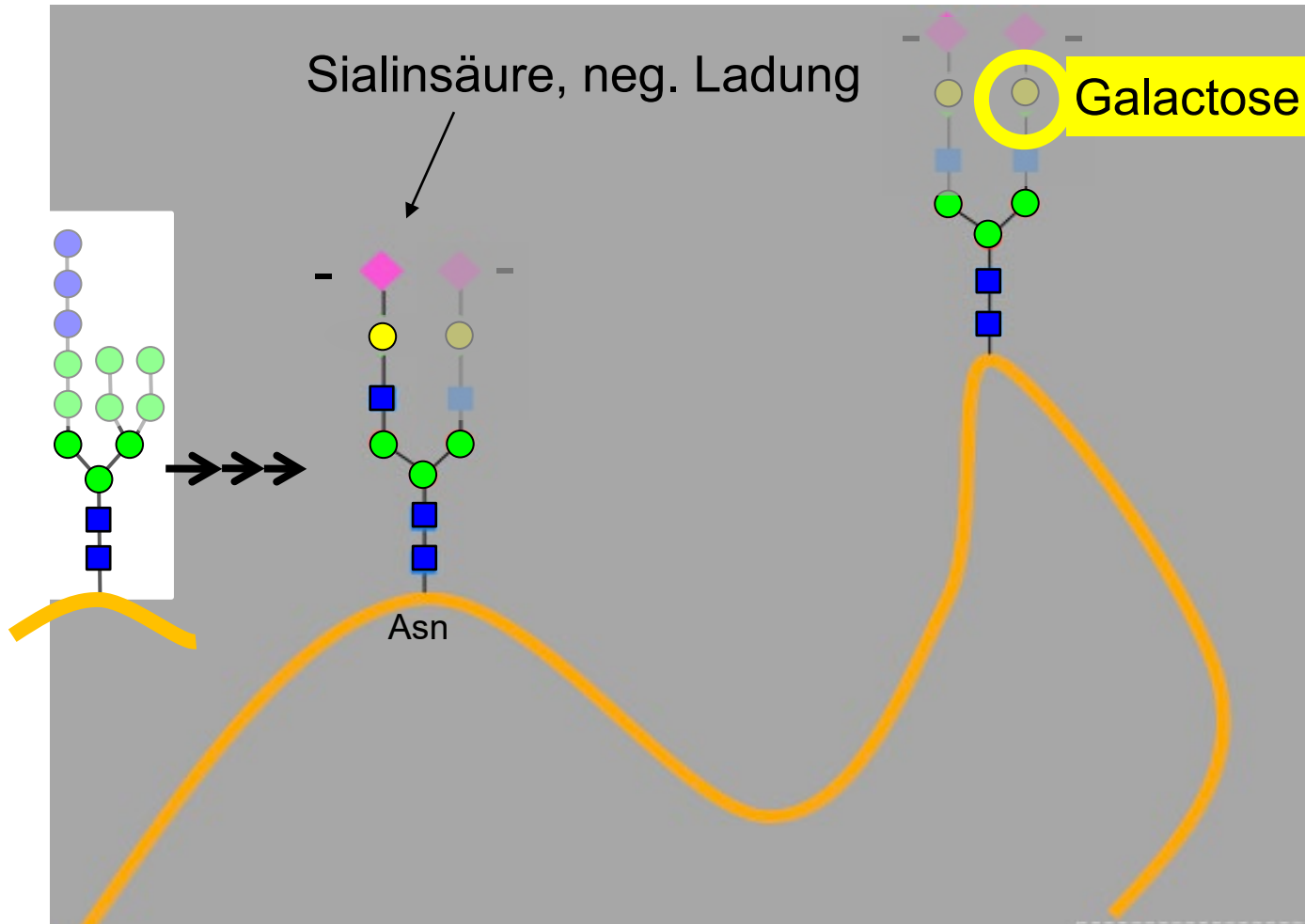
Cystein, Tyrosin (geben bei basischen pH Proton ab)

Außerdem: Sialinsäuren am Ende der Glykane

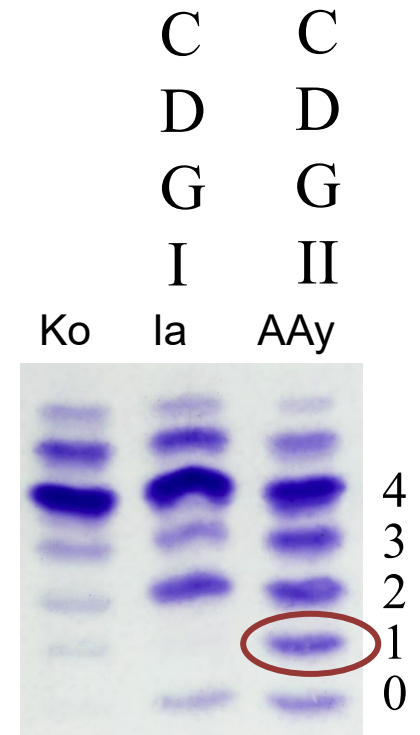
Prinzip isoelektrische Fokussierung in pH-Gradient



Transferrin-Glykosylierung

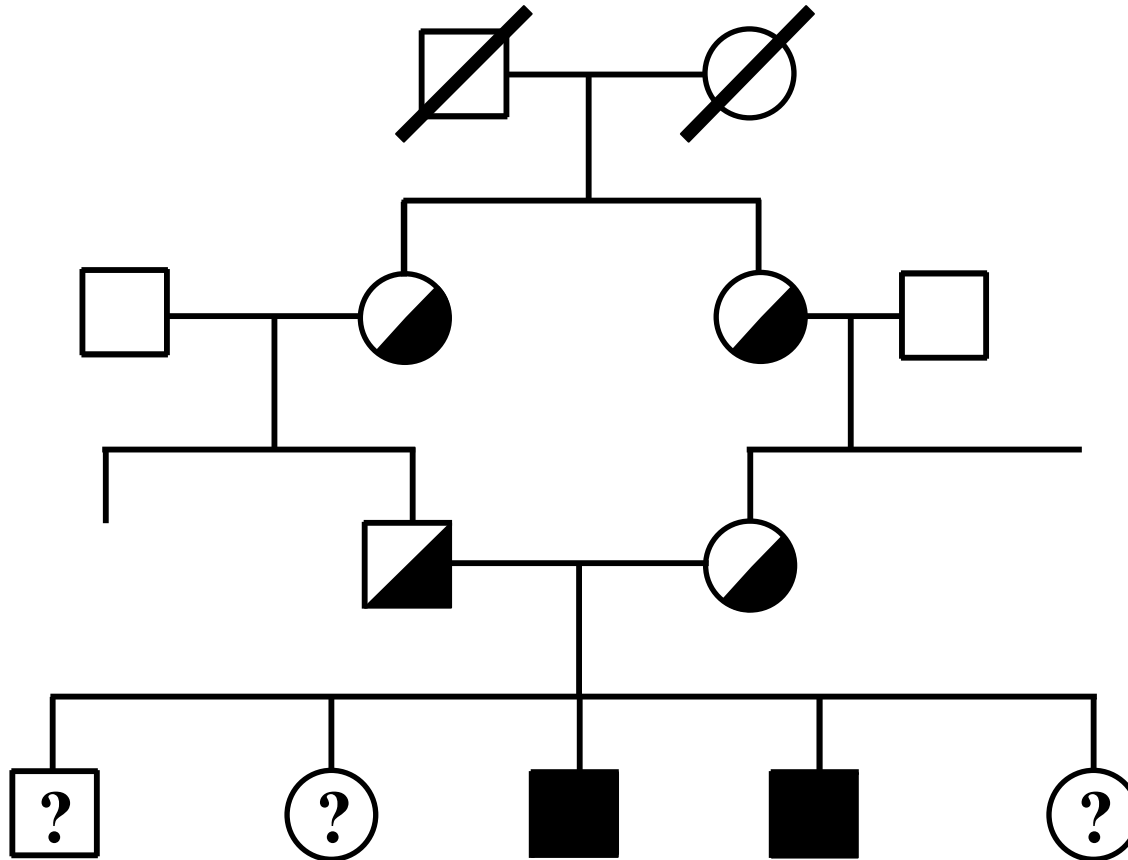


IEF:



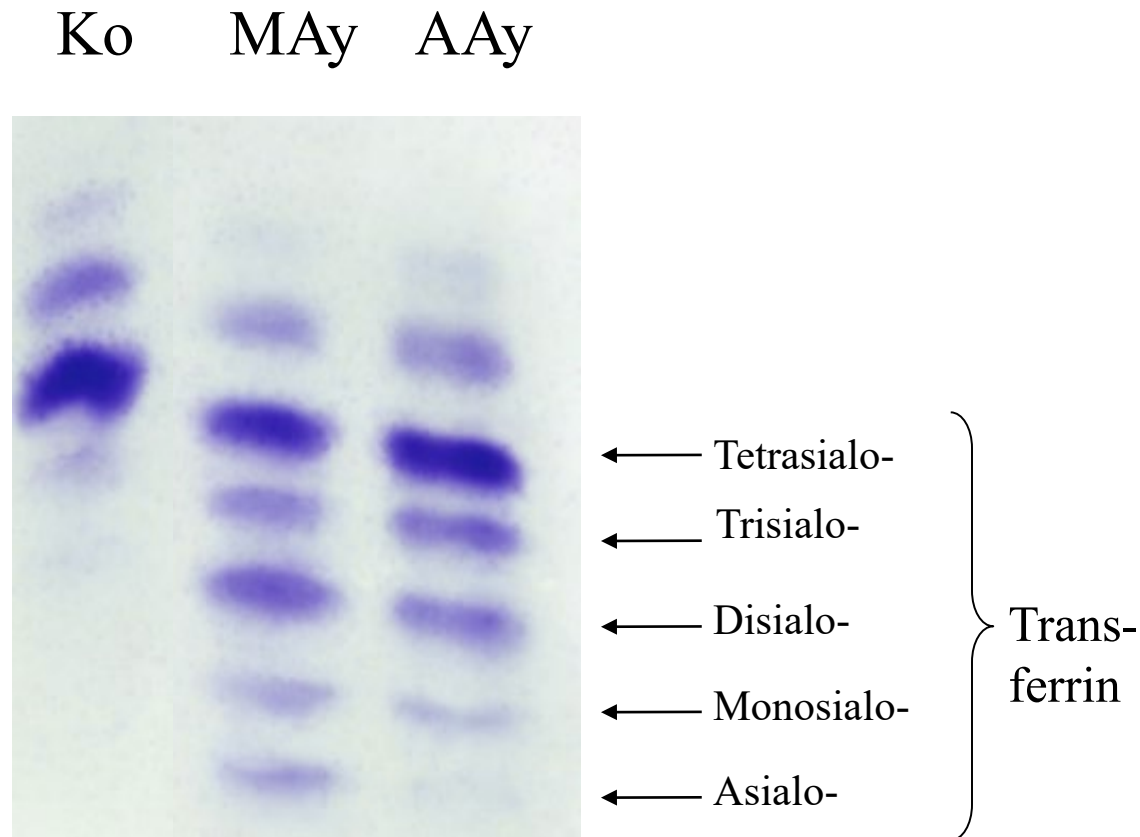
=> Isoelektrische Fokussierung des Transferrins
wird genutzt zur Diagnose von Glykosylierungsstörungen

Stammbaum einer Familie mit CDGx

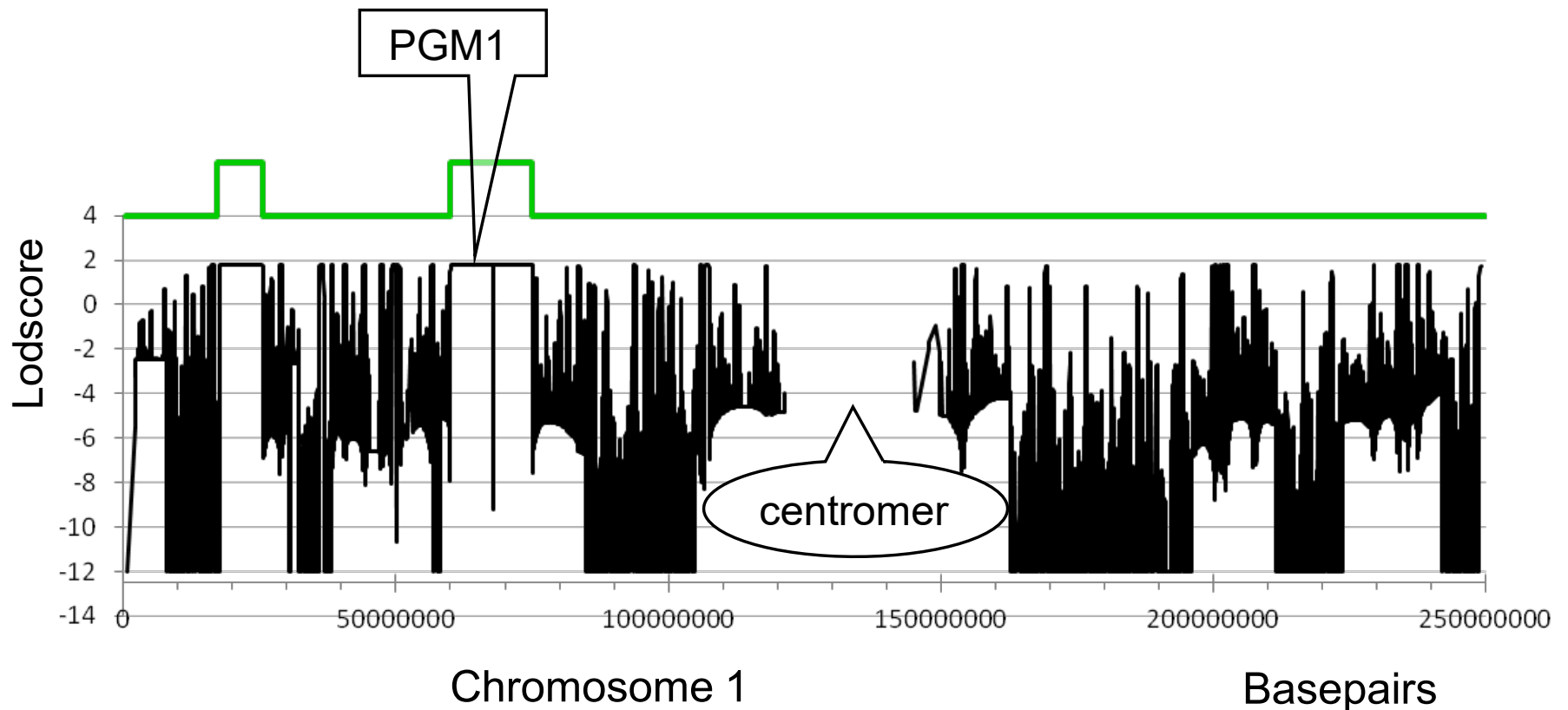


1. Homozygotiemapping
2. Next Generation Sequenzierung

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



Zusätzlich zu blaue-Punkt-Bildern:
Linkage analysis mit „Merlin“, hier Chromosom 1



In total: 87.37 MB in 12 regions of the genome

Anreicherung und Sequenzierung von interessanter Region oder Komplettssequenzierung von Patientengenom

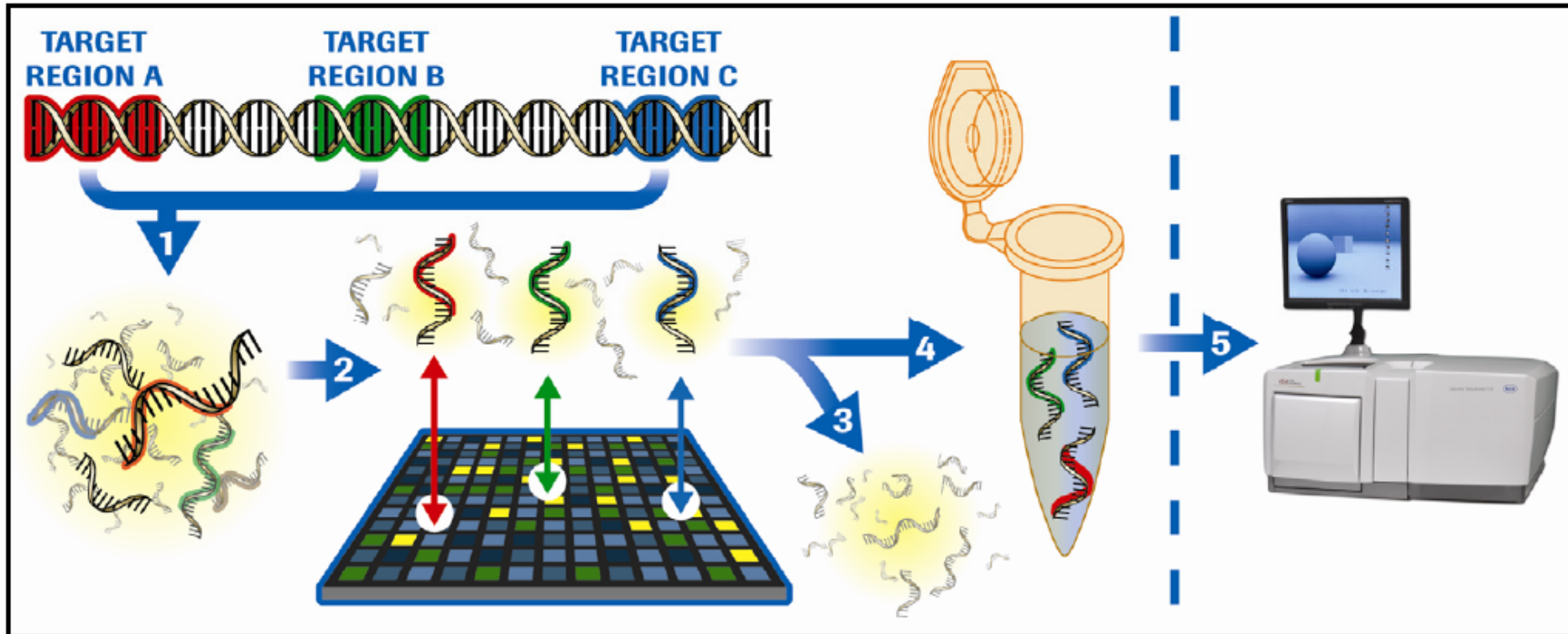
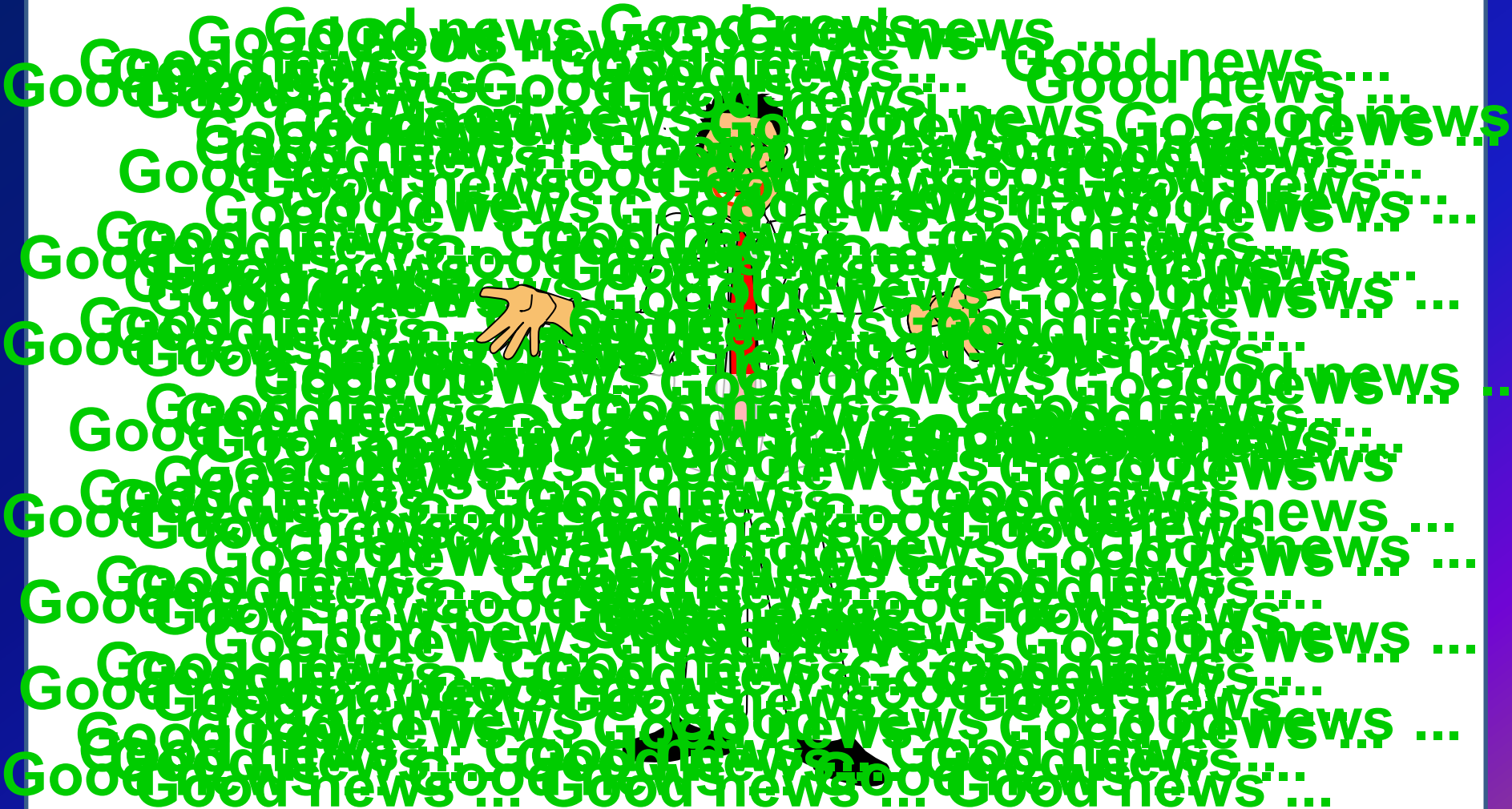


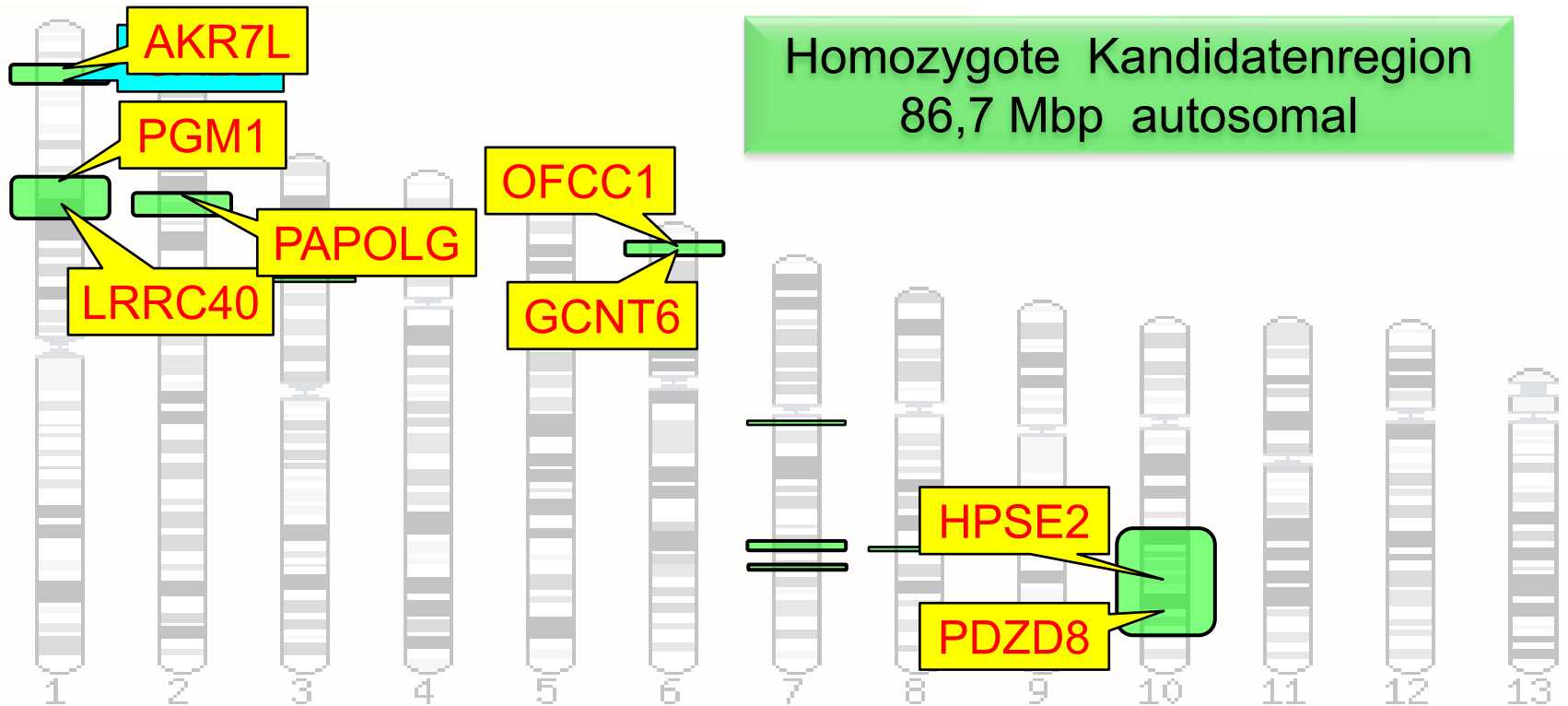
Figure 1: The NimbleGen Sequence Capture Protocol

Agilent SureSelect

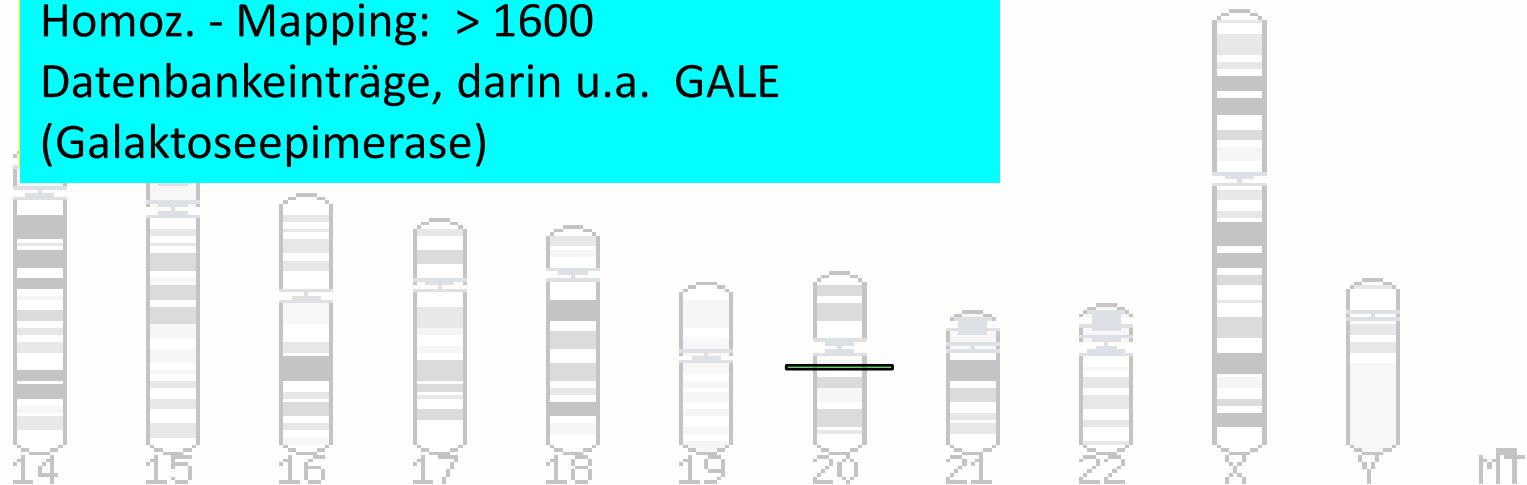
Was können wir erwarten vom
„whole EXOME sequencing“ ?



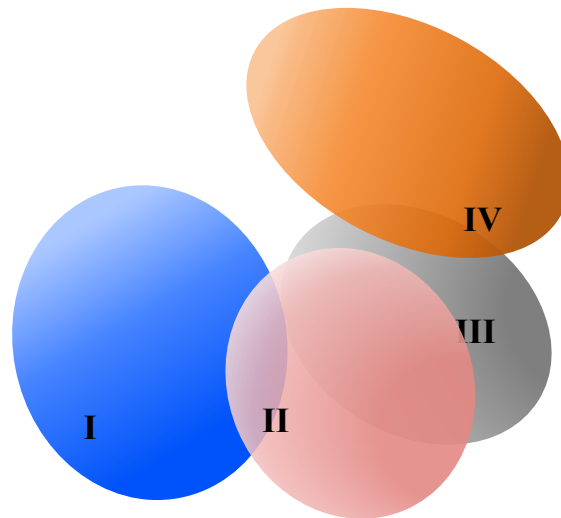
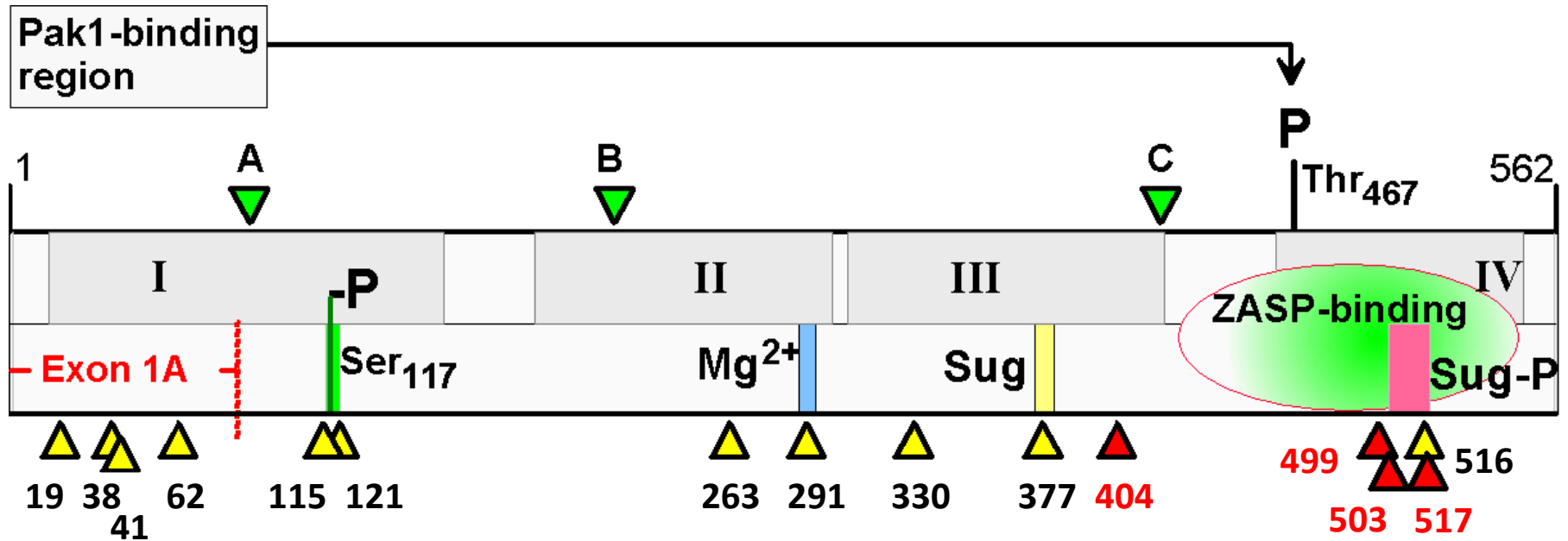
Homozygote Kandidatenregion
86,7 Mbp autosomal



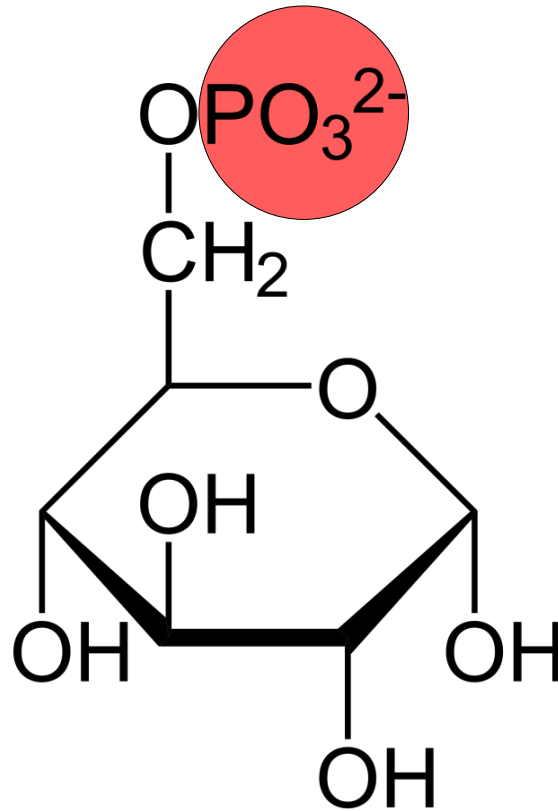
Homoz. - Mapping: > 1600
Datenbankeinträge, darin u.a. GALE
(Galaktoseepimerase)



PGM1 – Struktur, Funktion, Mutationen

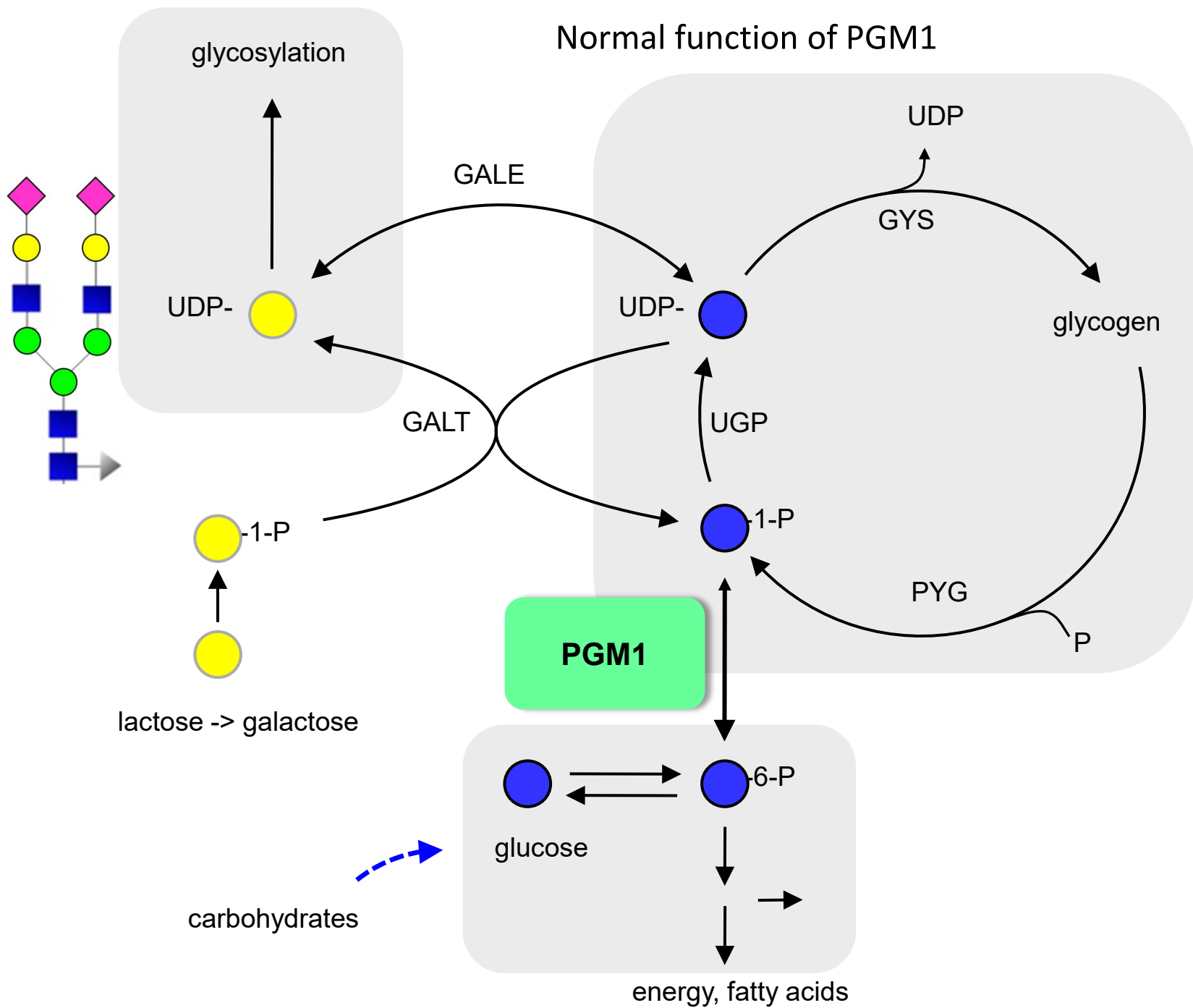


Phosphoglucomutase 1

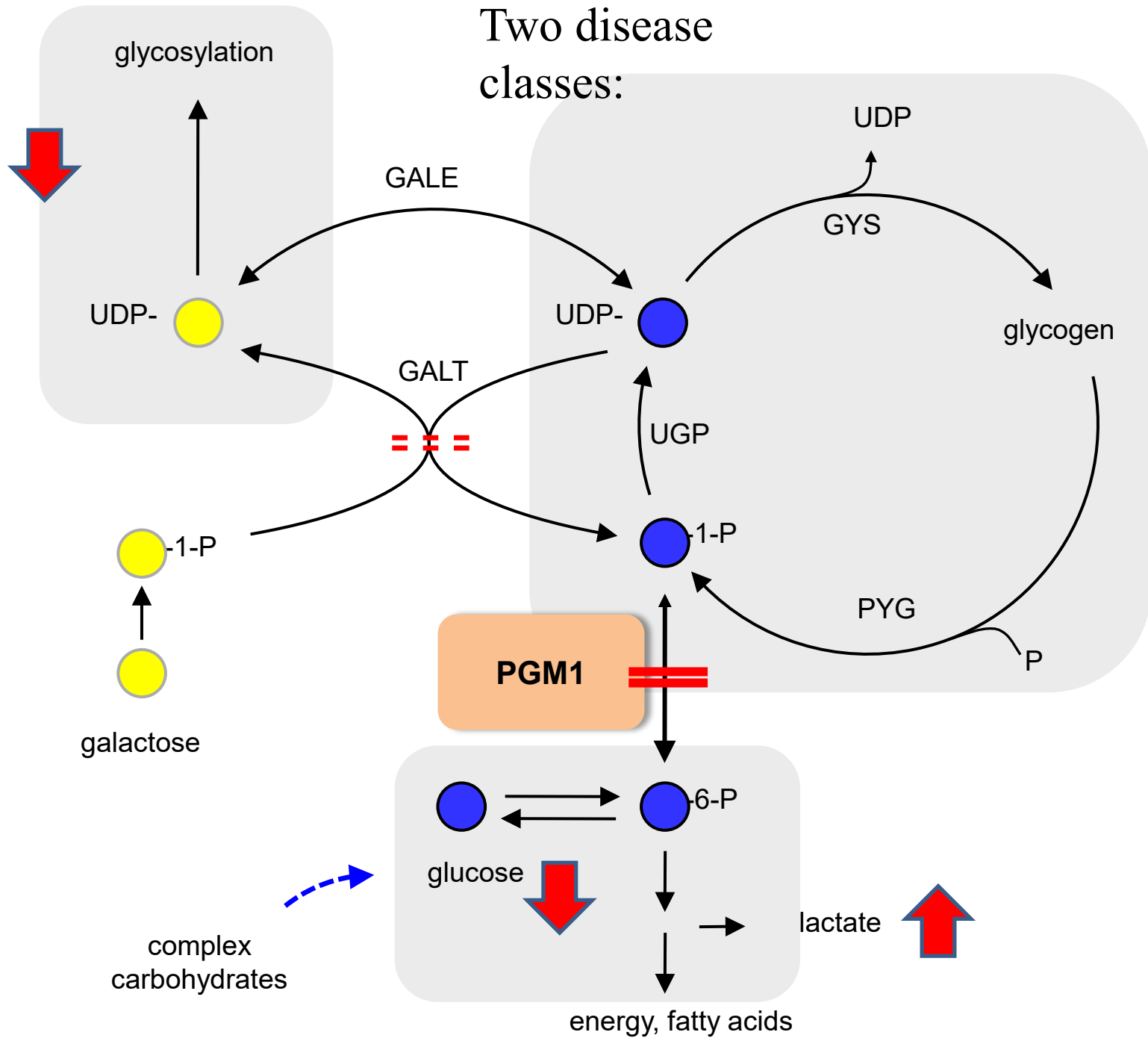


Gluc-6P BP

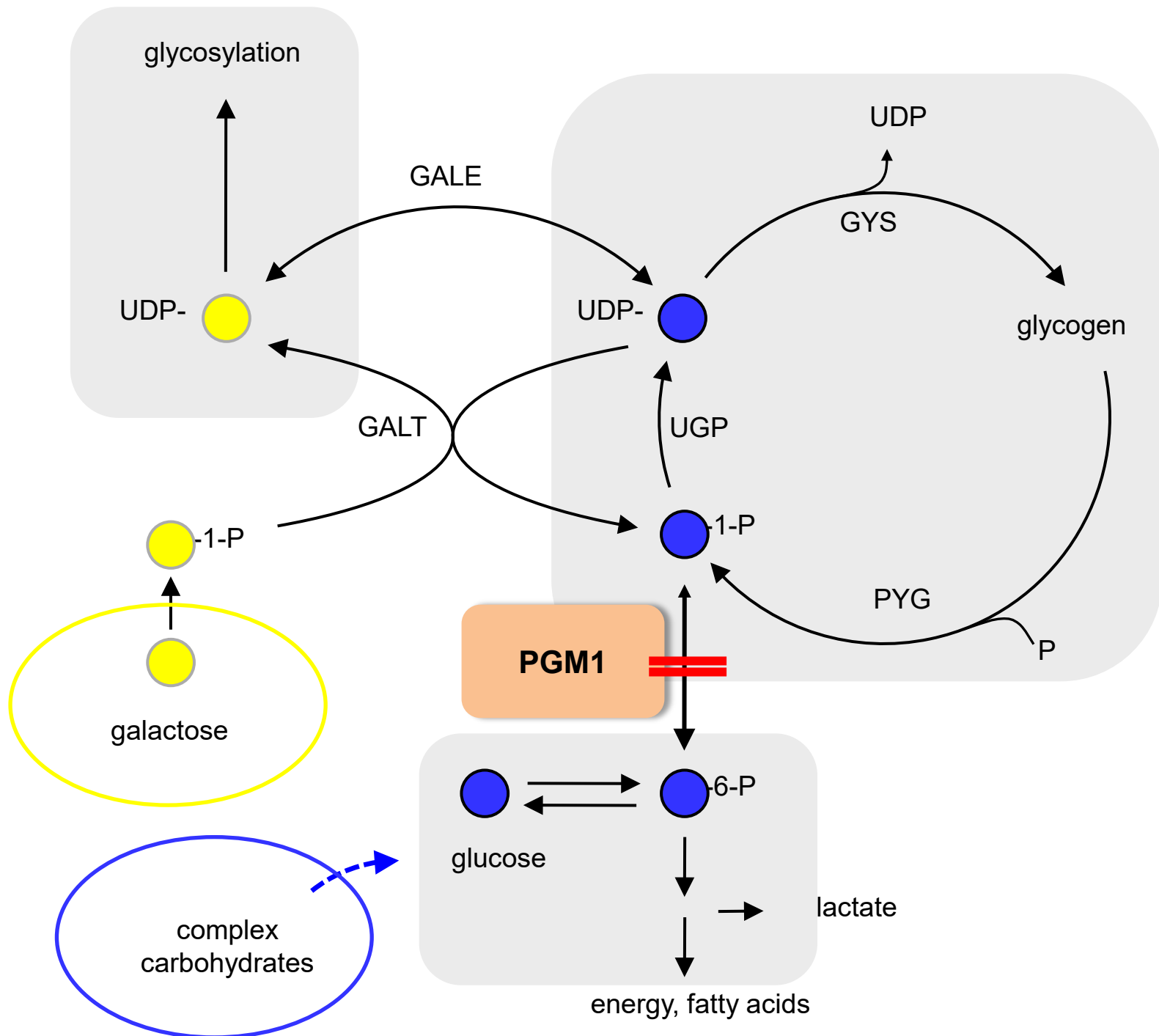
Normal function of PGM1



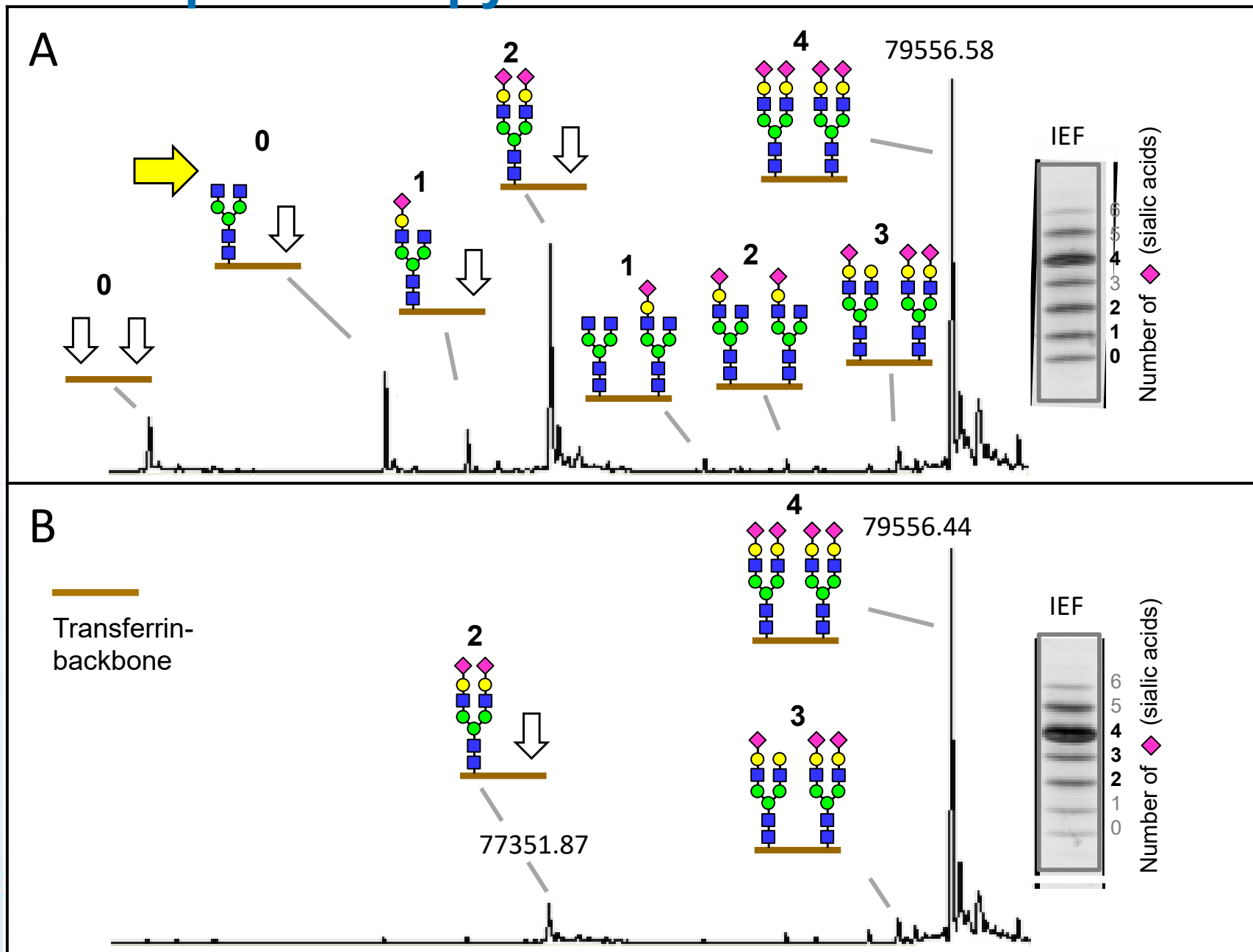
Two disease classes:



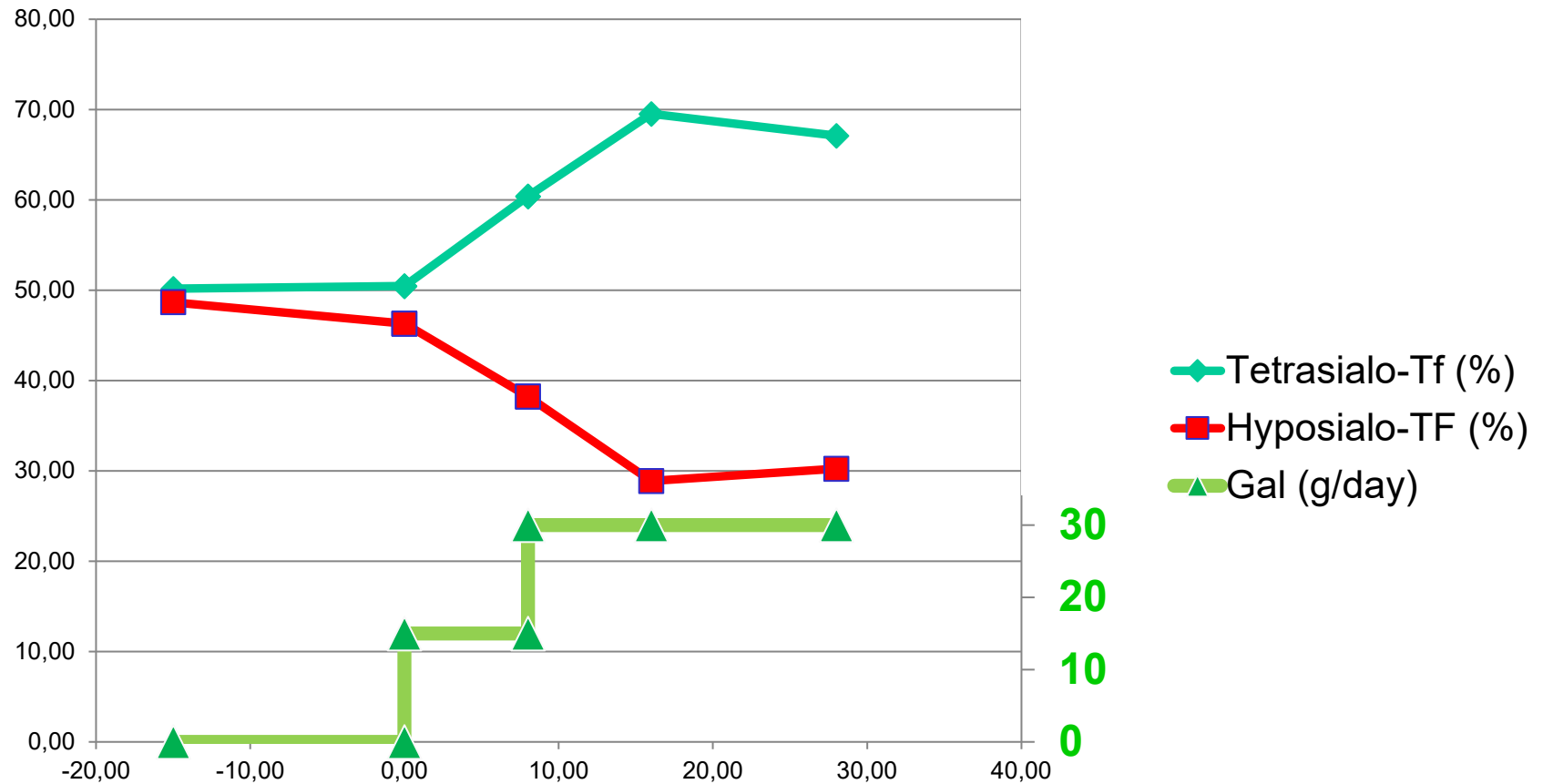
Nahrungsergänzung auf beiden Seiten
der PGM1-Reaktion



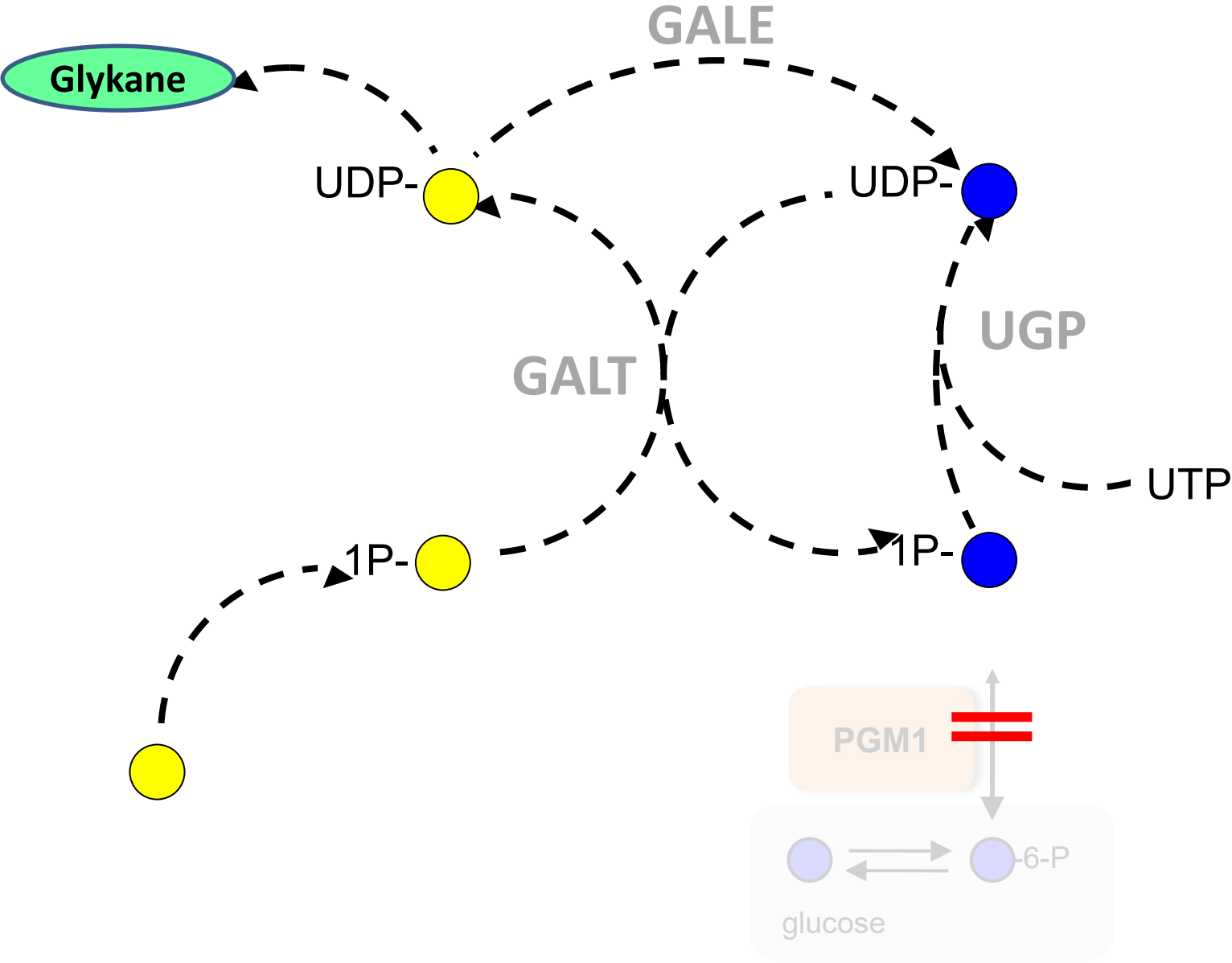
Mass Spectrometry



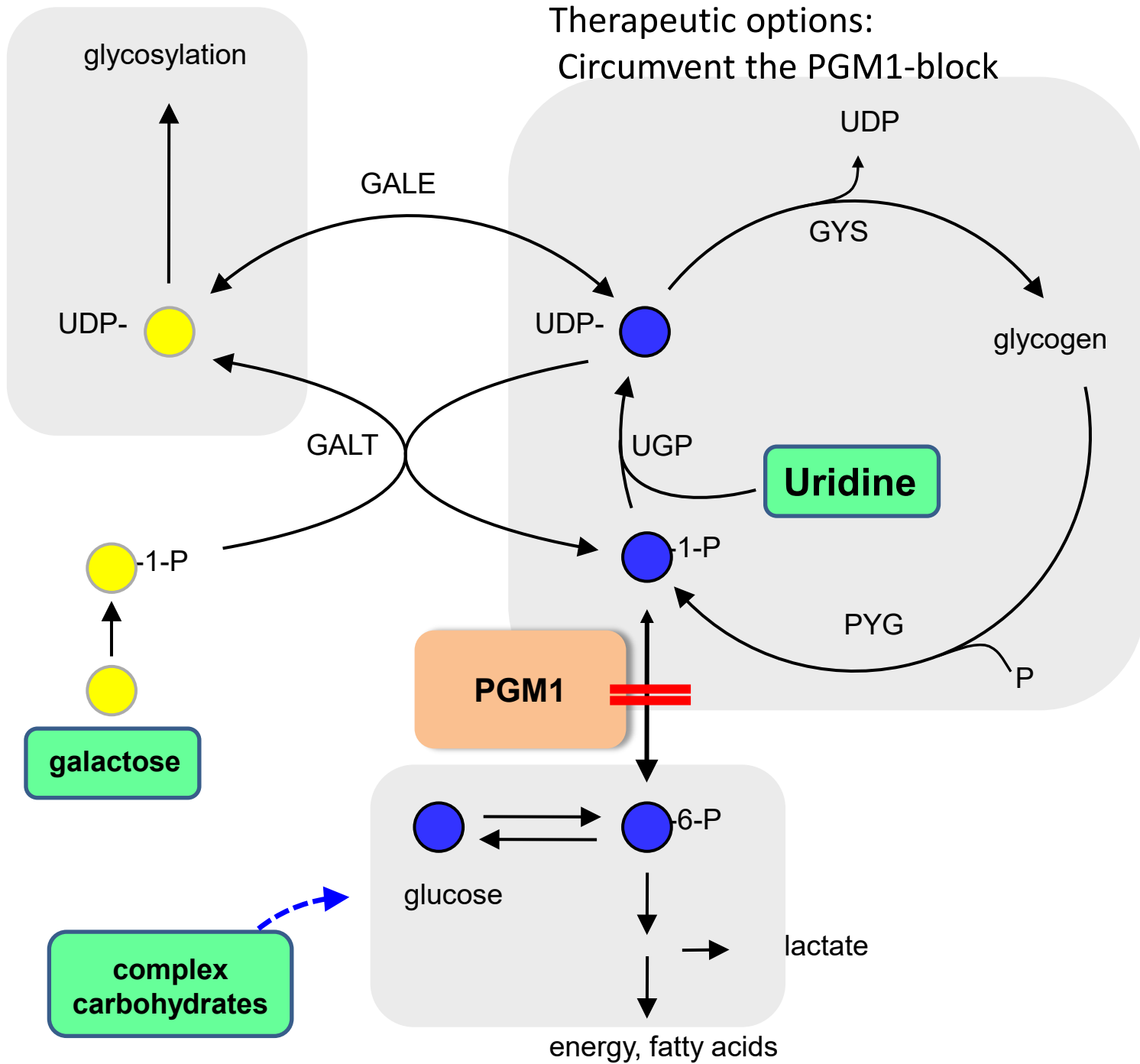
Galactose treatment of PGM1-deficiency tends to correct CDG:



PGM1-Defect

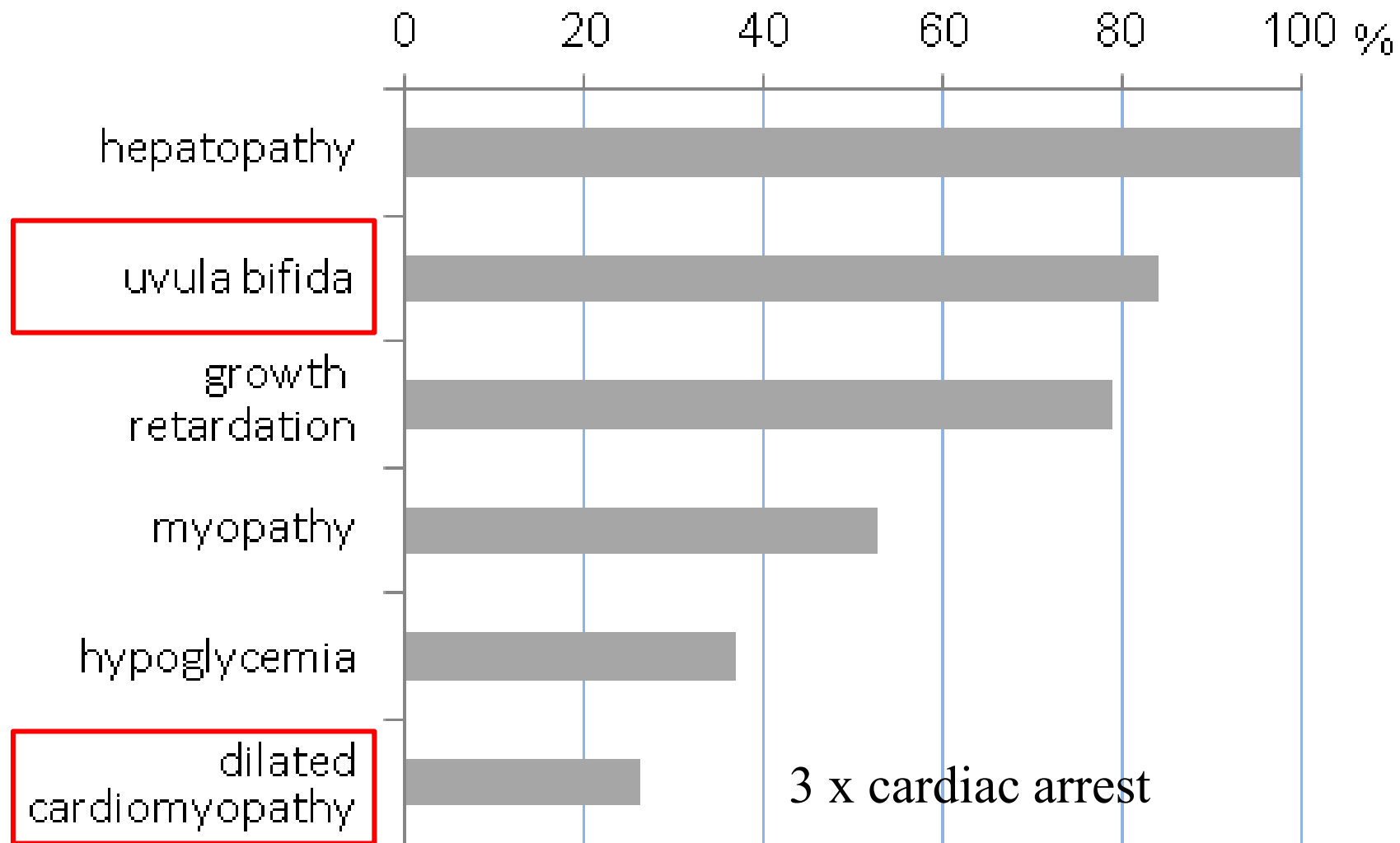


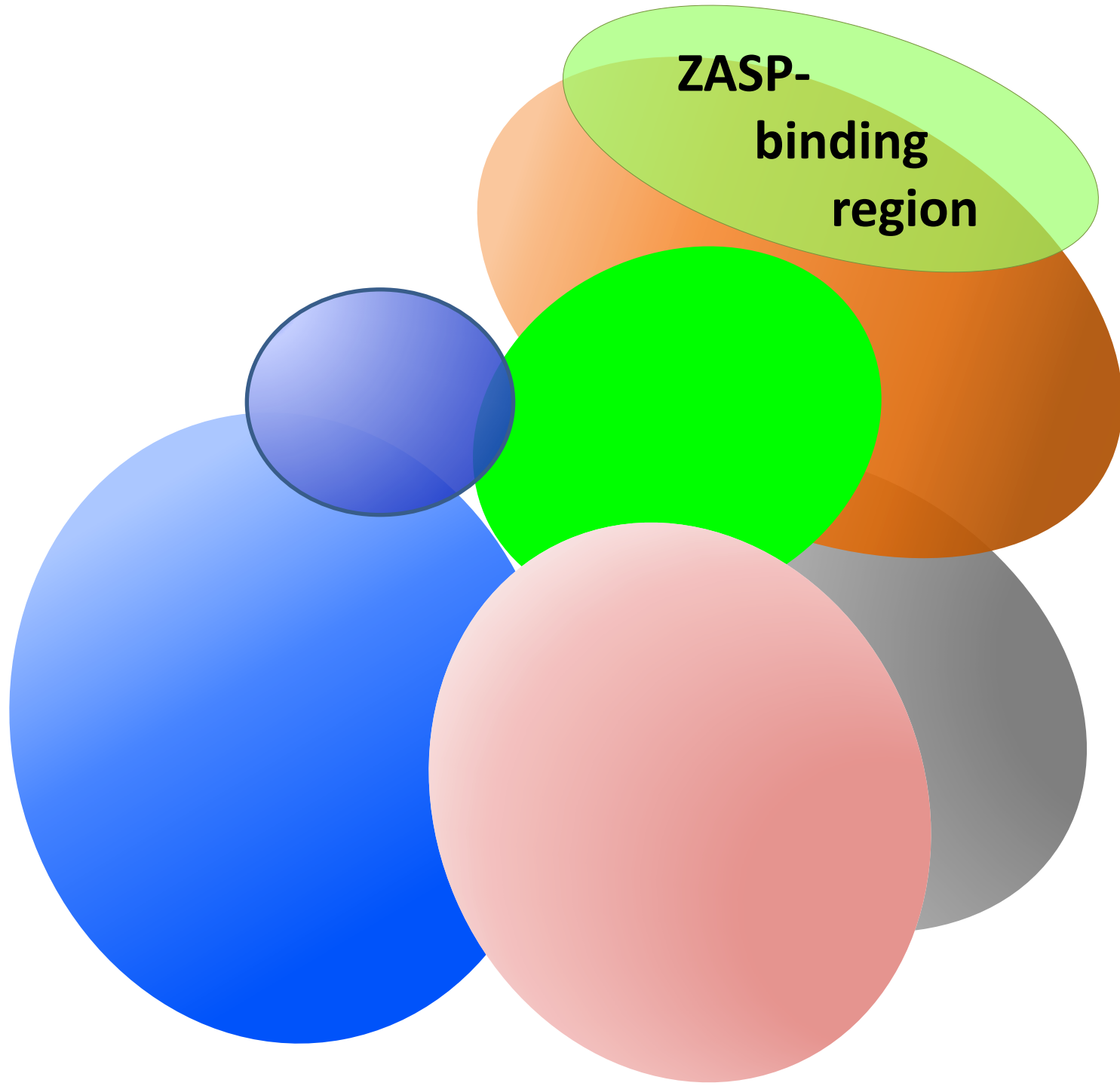
Therapeutic options:
Circumvent the PGM1-block



Symptoms of PGM1-deficiency

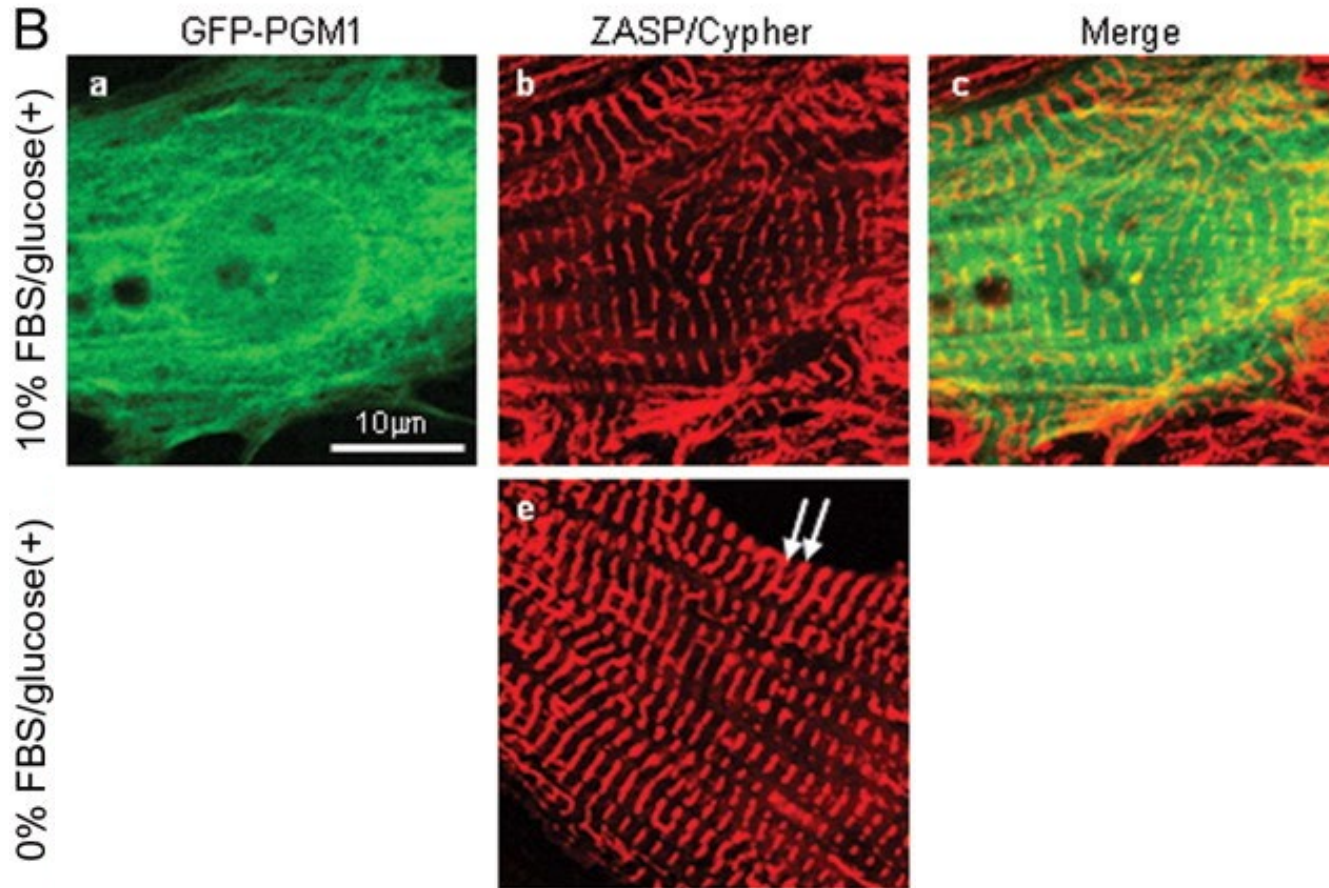






Fluorescence images of transiently expressed GFP-tagged PGM1

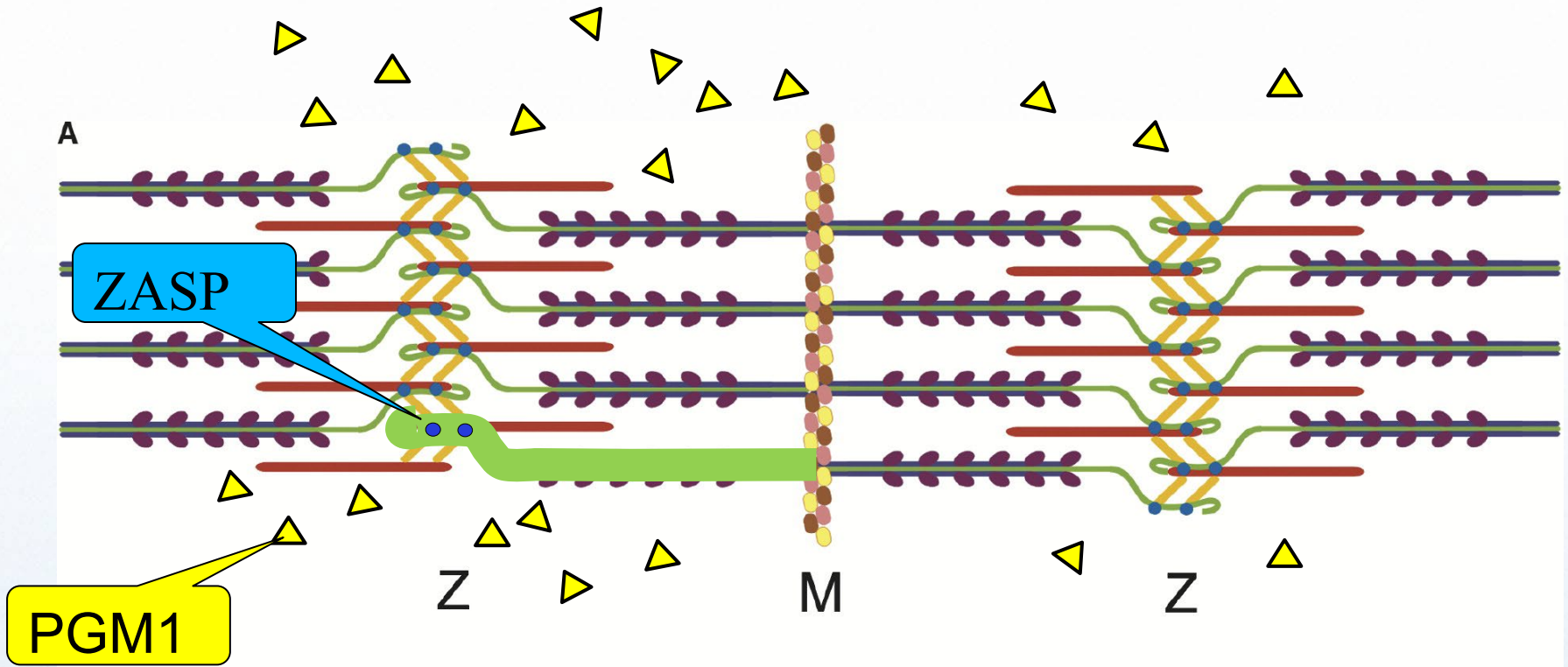
(in rat cardiomyocytes)



Arimura T et al.
Cardiovasc Res 2009;83:80-88

Dilatative Kardiomyopathie - ZASP

Z band alternately spliced PDZ-containing protein



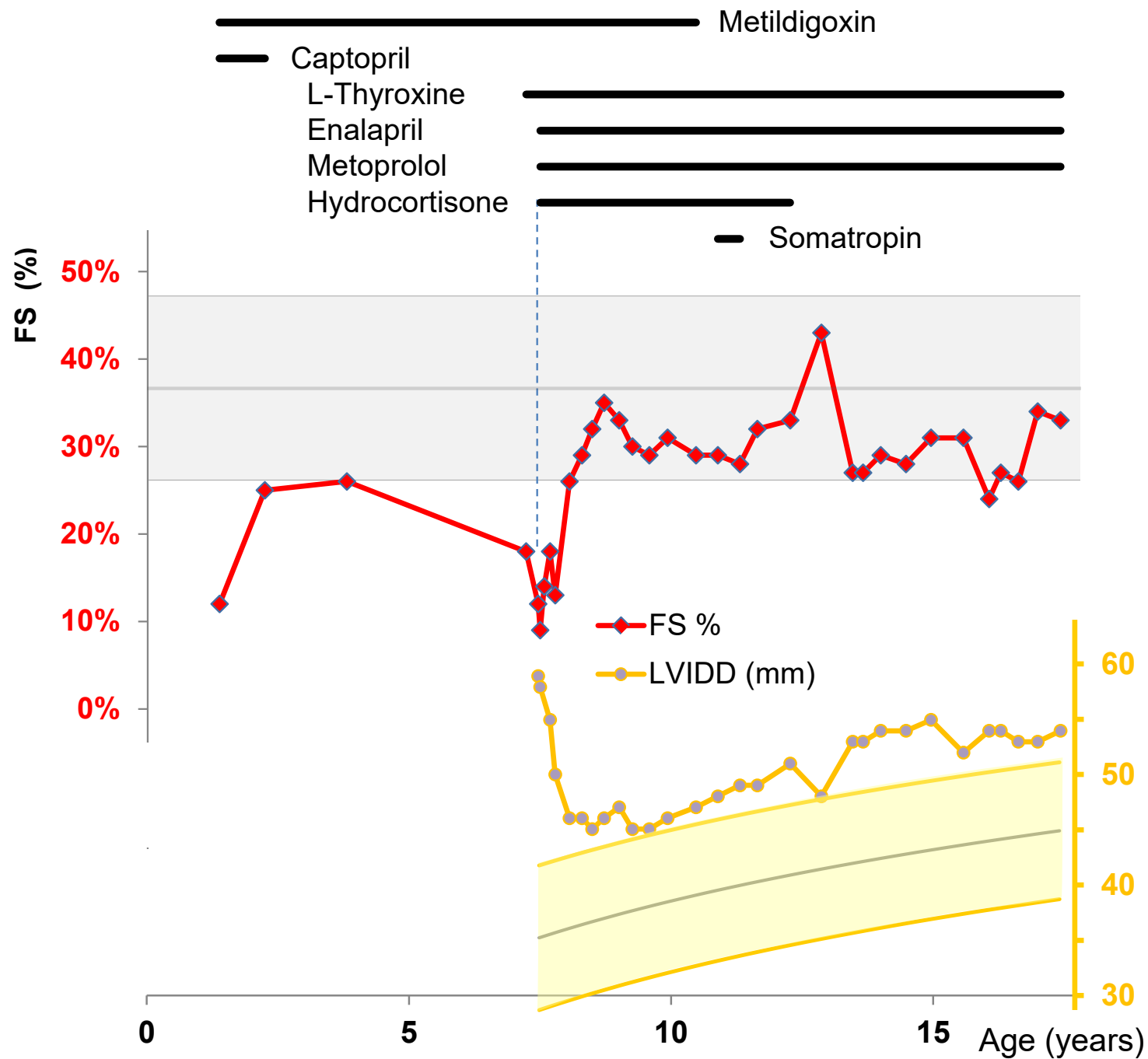
- ZASP Defekt → keine Bindung von PGM1 → DCM

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

Effekt wird sichtbar bei Entzug von Serum in der Zellkultur

Sichtbar nach 3 Tagen, evtl. durch Verbrauch der Fettsäuren, Umschalten auf Energie aus Glucose

Mögliche Therapie: Stabilisierung der Glucose und Lipide, Vermeidung von Glucose Bolus
Komplexe Kohlenhydrate



Therapeutic options

I: Circumvent the PGM1-block

Normalization of glucose & glycosylation:

galactose & uridine

complex carbohydrates

II: Myopathy, DCM

improved fatty acid use:

training below aerobic threshold to improve
oxidative capacity

MCT, heptanoic acid, citrate

=> Newborn screening

Aufspüren des ursächlichen Gens – wenn keine Konsanguinität vorliegt

Exom-Sequenzierung:
350 000 Mutationen

Allelfreq
≤ 2 % (5300)

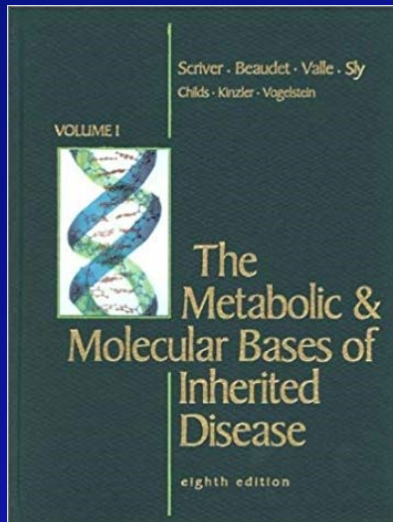
451 relevante
Mutationen
in 35 Genen

Genedestiller,
Brain-
storming ►

Stand seit ca. 2017: fast immer Triom-Analyse =>
Neumutationen bei Kind erkennbar

genesymbol	#Mut
ADAMTSL4	2
AGAP3	1
ATP5A1	1
BCLAF1	2
CDC27	2
CTDSP2	2
DAAM2	2
FAM131C	2
FAT2	2
FAT4	2
GFI1	1
GGA1	2
HIP1R	1
KCNT1	2
KIAA0319	1
KIR2DL3	2
LRP12	2
LSMD1	1
MSLN1	2
NCOA7	1
ND5	1
PIEZO1	2
PIK3C2G	2
PKHD1L1	1
POU2F3	2
RBFOX3	2
SH3BP4	2
SLC39A8	2
TBP	3
TEKT4	8
TLN2	2
USP48	2
WDR74	3
ZNF138	2
ZNF423	2

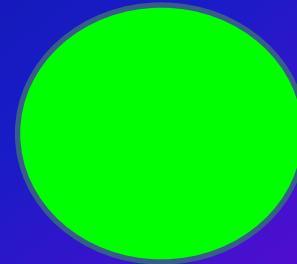
Effizientes SNP-Chip basiertes Mapping und
„next generation sequencing“, oft Triom
beschleunigen die Aufklärung der
„molecular basis of inherited disease“



Konsequenzen:

Pränatale und
prä-Implantations-Diagnostik möglich

Gezielte Therapie oft möglich
(Enzymersatztherapie, einfache
Nahrungsergänzung oder ...



Laura Tegtmeier
Janine Reunert
Julien Park

Thorsten Marquardt

Volker Debus

Anja Seehöfer
Stephan Rust

Universitätsklinikum Münster
Klinik für Kinder- und
Jugendmedizin

Marianne Jansen-Rust
Tanja Seehafer

Anika Sietmann

Melanie Bach
Michaela Schreiner
Michaela Tirre

LIFA (geschlossen)

Stephan Rust, Tel. 83 - 5 5182
rusts@uni-muenster.de