

Molekulárno-genetické a biochemické aspekty neurogenetických ochorení

(Ochorenia podmienené molekulárno – genetickými patológiami štrukturálnych konštituentov nervového systému – časť 1)

doc. MUDr. Ján Chandoga, CSc.¹, MUDr. Petra Jungová¹, RNDr. Katarína Kolečková, Ph.D.¹, RNDr. Robert Petrovič, PhD.¹, MUDr. Juraj Štofko, MBA²

¹Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK a UNB,

Oddelenie molekulovej a biochemickej genetiky, Bratislava

²I. neurologická klinika LF UK a UNB; Nemocnica Staré mesto, Bratislava

Príznaky postihnutia nervového systému sú veľmi často spojené s genetickými ochoreniami. Vďaka akcelerácii genomického výskumu počas posledných dvadsať rokov sa u mnohých neurologických ochorení odhalila ich molekulárno-genetická podstata ako aj mechanizmy vzniku a vývoja molekulárnych patológií. Rozšírenie škály DNA diagnostických metód umožňuje u mnohých neurogenetických ochorení spoľahlivú a kauzálnu diagnostiku. Na druhej strane viaceré ochorenia (spinocerebelárne ataxie, hereditárne spastické paraplégie) sú podmienené mutáciami mnohých génov a ani široká škála molekulárno-genetických vyšetrení nemusí objasniť pôvod ochorenia. Vzhľadom na početnosť neurogenetických porúch možno v limitovanom rozsahu publikácie prezentovať iba časť poznatkov o vybraných nosologických jednotkách. Hlavný akcent pritom kladieme na genetické aspekty ochorení. V prvej časti prezentujeme prehľad častých neurogenetických ochorení, ktoré možno definovať ako cerebro-kortikálne a cerebro-vaskulárne genetické poruchy. Ďalšie pokračovanie bude zamerané na genetické ochorenia bazálnych ganglií, ochorenia spinocerebelárne a motorických neurónov.

Kľúčové slová: neurogenetika, mutácie, genetická konzultácia, syndróm fragilného chromozómu X, syndróm fragilného chromozómu X s tremorom a ataxiou, neurofibromatóza, tuberózna skleróza, Alzheimerova choroba, cerebrálne kavernózne malformácie, Cadasil, Ehlers-Danlos syndróm typ IV.

The molecular genetic and biochemical aspects of neurogenetic disorders

(Diseases caused by molecular genetic pathology of structural constituents of nervous system – part 1)

Many of known genetic disorders are primarily neurologic or have important neurologic involvement. With acceleration of modern genomic research, over the past twenty years, the molecular genetic basis, molecular pathology and etiopathology mechanisms of many neurological diseases have been revealed. Improvement in the DNA laboratory methods allows us to perform reliable and causal diagnostic of many neurological diseases. But in several disorders such as spinocerebellar ataxia or hereditary spastic paraplegia remains the searching for molecular pathology still difficult because of number of genes and mutations. Given the abundance of neurogenetic diseases and limits of this publication we present only a part of the knowledge of selected nosological units. The main accent is put on the genetic aspects of these diseases. In the first part of this work we present an overview of diseases caused by mutations in genes that encodes structural constituents of nerve cells and belongs to groups of cerebro-cortical and cerebro-vascular diseases. The next part will focus to genetic disorders of basal ganglia, spinocerebellar and motor neuron diseases.

Key words: neurogenetics, Fragile X syndrome, Fragile X tremor/ataxia syndrome, Neurofibromatosis, Tuberous sclerosis, Alzheimer disease, Cerebral cavernous malformations, Cadasil, Ehlers-Danlos syndrome type IV.

Neurol. praxi 2013; 14(5): 209

Seznam zkratek

AD – autozómovo dominantný

AR – autozómovo recesívny

CCM – cerebrálne kavernózne malformácie

EDS – Ehler-Danlos syndróm

FXS – syndróm fragilného chromozómu X

MLPA – Multiple Ligation Probe Assay

NF – neurofibromatóza

PCR – polymerase chain reaction

XL – na X chromozóm viazaný

Neurogenetické ochorenia a ich klasifikácia

Neurogenetické ochorenia predstavujú širokú škálu genetických ochorení s dominujúcimi príznakmi postihnutia nervového systému. Odhaduje sa, že viac než tretina genetických patológií postihuje vo výraznej miere nervový systém. Tradičná klasifikácia týchto ochorení vychádza z kritéria dominujúceho postihnutia neuroanatomických oblastí a rezultujúcich po-

rúch nervových funkcií. Podľa tohto kritéria sú to ochorenia cerebro-kortikálne, bazálnych ganglií, spinocerebelárne, motorických neurónov, periférneho nervového systému, neuromuskulárnych spojov a cerebrovaskulárne. Iný prístup ku klasifikácii môže akcentovať viac funkciu proteínov, zmenu ich štruktúry spôsobenú mutáciami génov a následne modifikáciu funkcií až po ich úplnú stratu. Z takéhoto aspektu je možné členiť neurogenetické ochorenia do troch hlavných

kategórií a to na ochorenia podmienené mutáciami génov pre špecifické štrukturálne konštituenty nervového systému, ochorenia pri ktorých mutácie pozmenia funkciu proteínov iónových kanálov a tretiu kategóriu by predstavovali neurometabolické genetické ochorenia. Pri poslednej skupine mutácie s rezultujúcou zmenou proteínu môžu ovplyvniť funkciu celého subcelulárneho kompartmentu (mitochondriové, lyzozómové, peroxizómové choroby) alebo spôsobia deficit enzýmu so závažnými dôsledkami na štruktúru a funkciu nervových buniek (deficit pyruvát dehydrogenázového komplexu, Canavanova choroba, nonketotická hyperglycinémia).

Rozdelenie neurogenetických ochorení

- ochorenia podmienené molekulárno-genetickými patológiami štrukturálnych konštituentov nervového systému
- ochorenia podmienené molekulárno-genetickými patológiami iónových kanálov
- neurometabolické genetické ochorenia

Molekulárno-genetické patológie

Z hľadiska molekulárno-genetickej patológie podobne ako iné genetické ochorenia môžu byť aj neurogenetické ochorenia podmienené:

- zmenami kódujúcich úsekov DNA (exónov)
- zmenami nekódujúcich úsekov DNA (intrónov a intergénových oblastí)
- zmenami regulačných úsekov DNA (promótorov, enhancerov, silencerov)
- zmenami v transkripcii DNA
- epigenetickými faktormi – poruchami génového imprintingu

Pojmom mutácia sa v genetike označuje stav trvalej zmeny obsahu, štruktúry a organizácie DNA. Mutácie sa z hľadiska mechanizmu vzniku delia na spontánne a indukované. Podľa druhu buniek, ktorých DNA pozmenia rozdeľujú sa na gametické mutácie (prenášajú sa na všetky somatické bunky postihnutého potomka) a somatické mutácie (vznikajú v somatických bunkách a prenášajú sa na dcérske bunky – majú vzťah napr. aj ku karcinogénze). Podľa charakteru resp. rozsahu poškodenia DNA sa delia na: genómové, štruktúrne aberácie chromozómov a génové mutácie. Z molekulárneho hľadiska možno mutácie zdeliť do týchto hlavných tried: delécie, inzercie a substitúcie jednej bázy (bodové mutácie). Funkčne sa mutácie rozdeľujú na:

- **mutácie meniace zmysel** (missense mutations) – zmena jednej bázy na inú, spôsobí náhradu jednej aminokyseliny na druhú v génovom produkte,

- **tiché mutácie** (silent mutations) – v dôsledku degenerácie genetického kódu, zmena jedného nukleotidu za iný, nezapríčiní zmenu aminokyseliny a funkcia proteínu zostáva zachovaná,

- **nezmyselné mutácie** (nonsense mutations) – zmena jednej bázy na inú, spôsobí zmenu kodónu pre aminokyseliny za terminálny (stop) kodón. Uvedený typ mutácie má zväčša závažný dopad na funkciu syntetizovaného proteínu, nakoľko ten je skrátený (truncated),

- **zostrihové mutácie** (splice site mutations) – zmenu nukleotidu, vytvorí alebo zruší signál pre zostrih exónu/intrónu,

- **posunové mutácie** (frameshift mutations) – delécie alebo inzercie, ktoré nie sú násobkom 3 nukleotidov a teda spôsobia posun v čítacom rámci pôvodných tripletov. Tieto mutácie majú zväčša závažný dopad na funkciu syntetizovaného proteínu,

- **delécie alebo inzercie**, ktoré sú násobkom 3 nukleotidov zapríčiňujú vznik skráteného resp. predĺženého polypeptidu,

- **expanzie trinukleotidových opakovaní** – v niektorých génoch sa vyskytuje úsek s mnohonásobným opakovaním trojice báz (trinukleotidov). Pri uvedenom type mutácie dochádza k zväčšeniu uvedeného úseku DNA, čo je kauzálnou príčinou mnohých neurodegeneratívnych ochorení ako sú napr. Huntingtonova choroba, syndróm fragilného chromozómu X, Kennedyho choroba, či niektoré spinocereberálne ataxie. Jednou zo základných charakteristík mutácií vzniknutých expanziou trinukleotidových opakovaní je tzv. genetická anticipácia, keď intergeneračne narastá veľkosť zväčšeného trinukleotidového úseku. Veľkosť expandovanej alely koreluje s vekom nástupu a klinickou manifestáciou ochorenia.

Podľa typu dedičnosti ochorenia sa vyznačujú autozómovo dominantným (AD), autozómovo recesívnym (AR), na X chromozóm viazaným (XL) a mitochondriálnym typom dedičnosti.

Mutácie a metódy ich odhaľovania

Odhaľovanie mutácií je možné pomocou DNA techník využívajúcich princíp komplementarity nukleových kyselín. V laboratórnej praxi je prvým krokom izolácia DNA z buniek pacienta, najčastejšie sa využívajú leukocyty, bunky bukalnej sliznice, fibroblasty, amniocyty a ďalšie. Následne prebieha selektívna amplifikácia vyšetrovanej oblasti DNA pomocou poly-

merázovej reťazovej reakcie (PCR – Polymerase Chain Reaction). PCR je metóda, ktorá umožňuje zväčšenie špecifických úsekov DNA *in vitro* polymerizáciou, za využitia katalytického účinku enzýmu DNA-polymerázy. Zväčšenie sa realizuje cyklickým opakovaním celého procesu, preto sa označuje ako reťazová reakcia. Touto metódou je možné v priebehu krátkeho času získať až niekoľkomiliónové zväčšenie ľubovoľného úseku DNA, u ktorého je známa sekvencia aspoň oboch koncových oblastí a ktorého dĺžka nepresahuje 20kb. Ďalšia analýza zväčša pozostáva z elektroforetického rozdelenia PCR produktov v agarózovom alebo polyakrylamidovom géli a následnej vizualizácii za použitia interkalačných farbív a UV transiluminátora. Priamu detekciu – diagnostiku mutácie možno doceliť viacerými technikami, ktoré nadväzujú resp. sú modifikáciou PCR. Medzi takéto techniky patrí PCR-RFLP (polymorfizmus dĺžky restrikčných fragmentov), pri ktorom dochádza k vzniku alebo zániku známeho restrikčného miesta v DNA konkrétneho génu a tak je možné určiť mutáciu alebo polymorfizmus, ktorý má vzťah k dedičnej chorobe alebo k predispozícii k chorobe. Metóda kvantitatívnej Real-time PCR využíva fluorescenčne značené próby a umožňuje monitorovať amplifikáciu pomocou PCR v reálnom čase (sleduje sa nárast fluorescence). Týmto spôsobom je možné zistiť expresiu génu, počet kópií templátu alebo zistiť bodovú mutáciu bez restrikčného štiepenia. Metódou MLPA (Multiple Ligation Probe Assay) je možné detekovať delécie a duplikácie vyšetovaných oblastí jednotlivých génov. Sekvenovanie nukleových kyselín, zlatý štandard pri analýze DNA, umožňuje identifikáciu presnej sekvencie – poradia jednotlivých nukleotidov v DNA. V praxi sa využíva najmä automatické sekvenovanie s fluorescenčne značenými dideoxynukleotidami založené na princípe elektroforetického delenia DNA fragmentov v kapiláre genetického analyzátoru.

Genetická konzultácia

Genetické testy (vyšetrenia) vzhľadom k tomu, že potenciálne môžu odhaliť kauzálnu dedičnú podstatu ochorení a majú vysokú prediktívnu hodnotu sú eticky veľmi háklivým vyšetrením. Pozitívny výsledok vyšetrenia závažných genetických ochorení nastoľuje požiadavku vyšetriť aj pokrvných príbuzných, ktorí nesú riziko. Genetická konzultácia má pacientovi a príbuzným poskytnúť informácie o povahe ochorenia, dôsledkoch genetickej poruchy, pravdepodobnosti prenosu a preventívnych

možnostiach z hľadiska plánovania potomstva. Súčasne musí upozorniť aj na limity možných testov. Štandardne by malo genetickému vyšetreniu predchádzať klinické vyšetrenie. Vyšetrenia by mali byť vykonané iba na základe informovaného súhlasu pacienta. Lekárska genetika je odlišná od iných odborov medicíny skutočnosťou, že starostlivosť je zameraná na viacerých členov rodiny, budúcich partnerov, nerieši iba konkrétneho pacienta, ktorý má klinické príznaky. S výsledkom genetickej analýzy sú však spojené aj isté interpretačné komplikácie, ktoré sú podmienené fenoménmi neúplnej penetrancie, rôznej expresivity, germinatívnom a somatickom mozaicisme (viď text). Genetická konzultácia je psychologicky náročná pri prediktívnom testovaní, keď je v rodine známa mutácia ale proband je ešte bez príznakov a pre ochorenie neexistuje kauzálna terapia. Ak nie je ochorenie terapeuticky ovplyvniteľné, testy pre „presymptomatické“ osoby mladšie ako 18 rokov by nemali byť lekárom navrhnuté. Neskôr sa proband sám rozhodne, či sa chce dozvedieť relevantnú genetickú informáciu. Prenatálna genetická diagnostika sa využíva skôr pri závažných ochoreniach s manifestáciou v detskom veku. Pri prejavoch ochorenia v dospelom veku je ešte náročnejšie posúdiť nakoľko bude ochorenie závažné, s akou istotou vieme predikovať fenotyp a je tiež dôležité ako túto závažnosť vnímajú rodičia. Prvotná otázka je, či vôbec o takúto informáciu majú partneri záujem. Konzultácie sú výsostne individuálne a základným pravidlom je nedirektivnosť. Konzultované osoby sú podrobne informované o možnostiach ale aj limitoch a rizikách prenatálnej diagnostiky. V súčasnosti je u niektorých ochorení možná aj predimplantačná genetická diagnostika viazaná na metódy in vitro fertilizácie – IVF.

Časť 1. Kortikálne a cerebrálne ochorenia

Základné genetické charakteristiky pre frekvencované ochorenia podmienené molekulárno-genetickými patológiami štruktúrnych konštituentov nervového systému sú uvedené v tabuľke č. 1. V prehľade ochorení vychádzame z tohto členenia, ktoré rešpektuje dominujúce postihnutie neuroanatomických oblastí.

Syndróm fragilného chromozómu X – Martin-Bell syndróm

Syndróm fragilného chromozómu X (FXS) je jednou z najčastejších genetických príčin mentálnej retardácie u mužov. Ochorenie je gonozo-

málne dedičné s nekompletnou penetranciou a s variabilnou expresivitou. Incidencia tohto ochorenia je 1 : 4000 mužov a 1 : 6000 žien. Názov syndrómu fragilného chromozómu X sa vzťahuje k cytogenetickému markeru na X chromozóme v oblasti Xq27.3 (fragilné miesto *FRA(XE)*), v ktorom chromatín správne nekondenzuje počas mitózy. Gén **FMR1** (fragile X mental retardation 1) sa skladá zo 17 exónov, avšak mechanizmy alternatívneho zostrihu podmieňujú vznik rôznych mRNA a rôznych izoform proteínu **FMRP**. Porucha je spôsobená výraznou expanziou CGG tripletu v príslušnom lokuse – približne viac ako 200 opakovaní. Následkom genetických zmien (zmnoženie tripletov, hypermetylácia cytozínov) je potlačená expresia génu, ochorenie vedie k strate funkcie – nedostatočná je tvorba génového produktu-proteínu FMRP (Devys et al., 1993). Jedná sa o ochorenie s charakterom nestabilných dynamických mutácií a s existenciou premutácií (približne 55 až 200 opakovaní CGG), ktoré môžu byť príčinou ďalších dvoch genetických porúch (viď ďalej). Premutácie môžu v gametogéze expandovať, rodič s premutáciou môže byť prenášačom ochorenia. K expanzii premutácií u tohto syndrómu dochádza spravidla u žien, prenášačky sú teda väčšinou matky, aj keď tomu nie je vždy tak. Prítomný fenomén anticipácie, spôsobuje, že s každou ďalšou generáciou sa v rodine zvyšuje počet repetícií. Fenotyp u žien významne ovplyvňuje inaktivácia jedného X chromozómu. Nie je možné dopredu určiť, ktorý X chromozóm a v akom percente bude inaktívovaný (lyonizácia). Preto je častá klinická variabilita v expresii X viazaných ochorení u heterozygotiek, od úplnej manifestácie ochorenia až po fyziologický stav – zdravú ženu. Pre všetky vyššie popísané údaje, je problémom predikovať prenatálne fenotyp najmä u žien. Nedá sa s istotou tvrdiť či bude ženský plod s plnou mutáciou postihnutý alebo nie. Pacienti s FXS majú typickú fyziognómiu – majú pretiahnutú tvár (predĺžená je najmä brada), odstávajúce uši, ďalej väčšie semenníky (makroorchidizmus), ploché nohy. Okrem toho sa u nich vyskytuje nízky svalový tonus vedúci sekundárne až k hypermobilita v kĺboch. Dominantná je však mentálna retardácia a pacienti sú obvyčajne istým spôsobom aj sociopati – sú úzkostní až autistickí, majú poruchy pamäti a kognitívnych funkcií. V rannom detstve somatické črty nemusia byť typické, pozorujeme skôr psychomotorickú retardáciu, je naznačená makrocefália, prítomné sú poruchy učenia. U žien môže byť variabilný klinický obraz, často bývajú ako prenášačky bez klinických prejavov. Ak je prítomná MR, je skôr ľahšieho stupňa ako u mužov, eventuálne prejavuje sa poruchou učenia.

Syndróm fragilného chromozómu X s tremorom a ataxiou (FXTAS)

FXTAS predstavuje samostatnú chorobnú jednotku, ktorá je spôsobená premutáciami génu *FMR1*, teda expanziou CGG trinukleotidu v rozsahu 55 až 200 opakovaní (priemerne 84), pričom bežný fyziologický počet je 5 až 45 opakovaní. Od predchádzajúceho ochorenia sa odlišuje mechanizmami molekulárnej patológie, radiologickým, patologicko-anatomickým nálezom a klinickými prejavmi. Hoci *FMR1* gén bol identifikovaný už v r. 1991 asociácia medzi neurologickými príznakmi u pacientov – mužov vyššieho veku a premutáciami zostala pomerne dlho nepovšimnutá. U časti probandov s premutáciami boli pozorované promínujúce uši, mierne psychické poruchy (anxiózne a fóbické stavy) a približne u 20% žien predčasná menopauza – **FXPOF** (fragile X chromosome premature ovarian failure). Vzťah medzi zvýšeným počtom repetitívnych sekvencií génu *FMR1* a charakteristickými neurologickými symptómami u starých otcov chlapcov s diagnostikovaným FXS prví popísali Hagerman, et al. (2001). Prevalencia FXTAS sa v bežnej populácii odhaduje na 1 : 50 000 až 1 : 20 000, pričom frekvencia premutácií v populácii dosahuje u žien hodnotu 1 : 260 a u mužov 1 : 800. Túto diskrepanciu možno vysvetliť tým, že penetrancia ochorenia je značne ovplyvnená vekom, rozsahom premutácií a pohlavím. Amiri et al. (2008) odhadujú celoživotné riziko FXTAS pre mužov až na 1 : 6 000. U rodín, v ktorých sa vyskytuje FXS je riziko manifestácie FXTAS u mužov s premutáciami v piatom decéniu 20%, v šiestom 40% a vo veku nad 80 rokov až 75%. Ženy prenášačky majú 8% riziko manifestácie vo veku vyššom ako 50 rokov. Nakoľko u skupiny cerebelárnych ataxií sa v etiológii predpokladá participácia viacerých génov, štúdie zamerané na preskúmanie výskytu premutácií *FMR1* majú v tomto prípade opodstatnenie. Ak niektoré pozorovania (Macpherson et al., 2003) vedú k záveru, že 2% až 4% prípadov cerebelárnych ataxií môže byť v kauzálnom vzťahu k premutáciám *FMR1*, v pilotnej štúdii Zumerovej et al. (2007) takáto vysoká frekvencia potvrdená nebola. V objasnení molekulárno-genetických mechanizmov vzniku tohto syndrómu sa vychádza z poznania, že u pacientov dochádza k 2 až 10 násobnému zvýšeniu množstva transkriptu génu, bez podstatného zvýšenia hodnôt proteínu FMRP. Ďalší významný údaj sa týka prítomnosti ubiquitín pozitívnych intracelulárnych inklúzií v neurónoch a v astrocytoch kortexu a cerebella. Predpokladá sa, že premutácie vyvolávajú neurotoxický efekt mechanizmom „gain of function“, tým, že zmnožená mRNA viaže radu proteínov (hnRNP A2, MBNL1, lamín A/C), ktoré sa akumuluju v inklúziách a ná-

sledne dochádza k deplécii v požadovaných bunkových štruktúrach. Priemerný vek manifestácie FXTAS je 60 rokov. Klinický obraz sa výrazne odlišuje od predchádzajúcej jednotky FXS. Dominujú cerebelárne príznaky – ataxia a intenzívny tremor (podľa ktorých je aj utvorený názov syndrómu). Tieto príznaky sa postupne zvyrazňujú, cerebelárna ataxia môže viesť až k neschopnosti samostatnej chôdze, z ostatných príznakov sa objavuje dysartria, dysmetria, ktorá znemožňuje aj základné činnosti ako sú jedenie, obliekanie, písanie a prítomné sú aj poruchy rovnováhy. Okrem toho sa môžu pridružiť príznaky parkinsonského syndrómu (mierna bradykinézia, rigidita končatín), príznaky polyneuropatie (poruchy vibračnej a algickej citlivosti), poruchy autonómneho nervového systému (inkontinencia moča a stolice, erektilná dysfunkcia, ortostatická hypotenzia) a rozvoj dementného syndrómu (poruchy pamäti, kognitívnych a exekutívnych funkcií). Objavujú sa aj ďalšie príznaky spadajúce do domény psychiatrie – stavy úzkosti, depresie a apatie. Príznaky postihnutia iných funkcií predstavuje častá srdcová ischémia. Typický je obraz MR mozgu v T2 vážení s nálezom najmä hyperintenzitných lézií v pedunkuloch mozočka a okrem toho sú prítomné aj známky difúznej cerebrálnej atrofie, najmä bielej hmoty. Pre určenie diagnózy je potrebné zistiť prítomnosť klinických a röntgenologických, respektíve MR nálezov podľa kritérií publikovaných v práci Jacquemont et al. (2003), Hagerman et al. (2008). V molekulárno-genetickej diagnostike je potrebná aplikácia metód PCR, fragmentačnej analýzy a Southernovej hybridizácie. Pri genetickej konzultácii a zistení FXS v rodine sa odporučí okrem vyšetrenia matky probanda taktiež vyšetrenie starých rodičov kvôli riziku manifestácie FXTAS v neskorom veku.

Neurofibromatóza (NF)

Neurofibromatóza je AD dedičné ochorenie, zaraďuje sa medzi tzv. neurokutánne syndrómy (v minulosti boli označované ako fakomatózy). Ide o ochorenie s poruchou tkanivovej diferenciácie (najmä neuroektodermy) v embryonálnom období. Podľa génov, ktoré sú zodpovedné za ochorenie rozdeľuje sa na dva typy – NF1 (incidencia 1: 3000) a NF2 (incidencia 1: 40 000). **Neurofibromatózu typu I – morbus von Recklinghausen** spôsobujú mutácie v géne **NF1**, ktorý kóduje proteín **neurofibromín**. Tento patrí medzi proteíny, ktoré majú GTPázovú aktivitu a kontroluje aj funkciu p21-ras protoonkogénu – stimulátora bunkového rastu. Protoonkogén je aktívny po naviazaní GTP, zatiaľ čo vplyvom neurofibromínu nastáva hydrolýza na GDP a zmena na inaktívny p21-ras proteín. Mutovaný **NF1** nezabezpečí down regu-

láciu p21-ras, čo vedie k nekontrolovanému rastu buniek a k tvorbe nádorov. Podľa tohto účinku pôsobí **NF1** ako tumor-supresorový gén. Pre vysvetlenie vzniku nádorov pri ochorení je akceptovaný model dvoch zásahov v **NF1**. Potrebná je heterozygotná mutácia jednej alely génu zdedená od rodiča a druhá somatická mutácia, ktorá vzniká v bunkách počas ontogenézy (Wang et al., 2003). **Neurofibromatózu typu II** spôsobujú mutácie v géne **NF2**, ktorého génový produkt **merlín**, má pravdepodobne úlohu vo väzbe medzi proteínmi membrány a cytoskeletom bunky (Evans, 2009). Pre neurofibromatózu I. typu je charakteristická najmä tvorba početných benígnych podkožných tumorčekov a pigmentovaných škvŕn na koži. Tumorčeky (neurofibrómy) sú zložené z fibroblastov a Schwannových buniek vyskytujúcich sa prakticky po celom tele. Taktiež pigmentové škvŕny rozličnej veľkosti nazvané „café au lait“ (z francúzštiny „biela káva“ – vystihuje farbu škvŕn) sú posiate po celom tele okrem hlavy, dlaní a chodidiel. Pri neurofibromatóze II. typu nie sú zjavné pigmentované škvŕny, ani nie sú dominantné podkožné tumorčeky. Prítomné sú však viacpočetné neurinómy – najmä neurinómy nervus acusticus (aj obojstranne), intradurálne, alebo extradurálne neurinómy spôsobujúce hluchotu. Súčasne bývajú často prítomné aj meningeómy alebo gliómy. NF1 má variabilnú expresivitu, s nálezom benígnych zmien na koži až po závažné stavy s útlakom orgánov, hydrocefalom, malignitami, ložiskovou neurologickou symptomatológiou. U mikrodelečných foriem NF1 bol pozorovaný pozmenený klinický obraz u detí – mikrocefália, faciálna dysmorfia, psychomotorická retardácia, urýchlený rast, vrodené vývojové chyby srdca (väčšinou mierne) no v dospelosti sa môžu prejaviť kardiomyopatiou.

Tuberózna skleróza – morbus Bourneville

Tuberózna skleróza patrí medzi neurokutánne syndrómy (tzv. hamartomatózne syndrómy). Ochorenie má AD dedičnosť, vyznačuje sa vysokou penetranciou a variabilnou expresivitou. Incidencia ochorenia sa odhaduje približne na 1:50 000 až 1:10 000. Ochorenie spôsobujú mutácie génu **TSC1**, ktorý kóduje **hamartín** a génu **TSC2**, ktorého génový produkt je **tuberín** (Povey et al., 1994). Približne 80% mutácií vzniká „de novo“, teda ochorenie v týchto prípadoch nie je definované ako familiárne (Au et al., 2007). Mutácie v TSC1 géne sú zodpovedné za 10 až 30% prípadov ochorenia a prevažný podiel teda predstavujú mutácie v TSC2 géne (Kwiatkowska et al., 1998). Oba gény sú tumor supresorové, ich produkty sa spoločne podieľajú na neuronálnej diferenciácii a regulácii bunkovej

proliferácie a pravdepodobne sa podieľajú aj na endocytóze a vezikulárnom transporte. U tuberínu sa predpokladá funkcia GTPáza aktivujúceho proteínu, zatiaľ čo hamartín má pravdepodobne úlohu v bunkovej adhézii. Ochorenie postihuje ektodermálne a čiastočne aj mezodermálne tkanivá. Podstatou sú tumorčeky (hamartómy) v rôznych tkanivách, najmä v koži, mozgu, ale aj srdci. Klinicky sa prejavuje typickými kožnými prejavmi, epilepsiou a mentálnou retardáciou. Kožné prejavy sú tzv. adenoma sebaceum, čo sú mnohopočetné drobné červené alebo žlté papulky na tvári. Na chrbte sú zmeny označované ako tzv. „šagrénová koža“, alebo aj „prasačia“, resp. „slonia“ koža pre svoj hrbolatý povrch. Z menej častých príznakov vyskytujú sa mnohopočetné defekty zubnej skloviny, hamartomatózne polypy rekta, kostné, renálne cysty. Epilepsia sa vyskytuje už v útlom veku, záchvaty môžu byť fokálne alebo generalizované.

Alzheimerova choroba – AD

AD je multifaktoriálne ochorenie čiastočne podmienené aj genetickými determinantami. Vyskytuje sa vo familiárnej alebo sporadickej forme. Klasifikuje sa na základe veku nástupu ochorenia na formu so skorým nástupom do 65 roku života (presenilná demencia) a na formu s neskorým začiatkom po roku 65 (senilná demencia). AD so skorým nástupom ochorenia predstavuje 6–7% všetkých prípadov. Pri skorom nástupe familiárna forma (FAD) tvorí až 60%, pričom 13% má dominantný typ dedičnosti (Campion et al., 1999). Doposiaľ boli popísané tri gény, ktorých mutácie vedú k ADFAD. Sú to gén pre amyloidový prekurzorový proteín (**APP**), presenilín 1 (**PSEN1**) a presenilín 2 (**PSEN2**). Podľa mutačnej databázy AD (<http://www.molgen.ua.ac.be/ADMutations/>) 80% predstavujú mutácie v **PSEN1**, 14% v géne **APP** a 6% v **PSEN2**. Mutácie v daných génoch zodpovedajú za 0,5% všetkých prípadov AD. Nakoľko väčšina prípadov FAD nie je vysvetlená mutáciami v daných génoch, tak sa predpokladá vplyv aj iných génov a genetických faktorov. Okolo 75% tvorí práve sporadická forma AD, pričom sa predpokladá, že v 40% až 50% sa na ochorení podieľajú genetické rizikové faktory, zvlášť apolipoproteínový E4 genotyp. Najdôležitejšou patologickou abnormalitou AD je nahromadenie dvoch fibrilárnych proteínov v mozgu, β -amyloidového peptidu (**A β**) a proteínu Tau. Dôležitú úlohu pri štiepení APP majú proteíny presenilín 1 a presenilín 2. Predpokladá sa, že biologická funkcia presenilínu 1 spočíva v γ sekretázovej aktivite alebo že je kofaktor γ sekretázy. Mutácie v géne pre presenilín 1 vedú k zisku funkcie a k zvýšeniu

Tabuľka 1. Gény zodpovedné za ochorenie, dedičnosť a ich chromozómová lokalizácia

Ochorenie	Dedičnosť	Gén (lokus)	Lokalizácia
KORTIKÁLNE			
Syndróm fragilného X-chromozómu	XD	FMR1	Xq27.3
Neurofibromatóza I	AD	NF1	17q11.2
Neurofibromatóza II	AD	NF2	22q12.2
Tuberózna skleróza	AD	TSC1; TSC2	9q34;16p13
Alzheimerova choroba	AD	APP; PSEN1; PSEN2	21q21.3;14q24.3;1q31-q42
CEREBRO-VASKULÁRNE			
Cadasil	AD	NOTCH	19p13.2
Cerebro-kavernózne malformácie	AD	KRIT1; CCM2; PDCD10	7q21.1; 7p13; 3q26.1
Ehlers-Danlos syndrom typ IV	AD	COL3A1	2q31
BAZÁLNYCH GANGLÍÍ			
Huntingtonova choroba	AD	HTT	4p16.3
Parkinsonova choroba	AD; AR	PARK1-PARK13	
Familiárne dystónie	AD; AR; XL	DYT1-DYT16	
SPINOCEREBELÁRNE			
Friedreichova choroba	AR	FXN	9q13
Spinocerebelárna ataxie	AD, AR	SCA1-SCA35	
MOTORICKÝCH NEURÓNOV			
Amyotrofická laterálna skleróza	AD, AR	SOD1, ALSIN	21q12; 2q33
Spinálna a bulbárna muskulárna atrofia	XR	AR	Xq11-12
Spinálna muskulárna atrofia	AR, AD	SMN1	5q11.2-q13.3
Hereditárne spastické paraplégie	AR, AD, XL	SPG1-SPG31	
PERIFERNÉHO NERVOVÉHO SYSTÉMU			
Choroba Charcot-Marie-Tooth	AD, AR	PMP22, MPZ	17p11.2; 1q22
Hereditárna neuropatia s náchylnosťou na tlakovú obrnu	AD	PMP22	17p11.2

produkcie toxického A β . Nadprodukcia A β sa zdá byť ústredným patogenetickým mechanizmom AD. V patologickom a neurotoxickom efekte u pacientov s AD má dôležitú úlohu proteín Tau. Hlavná funkcia Tau je asemblácia mikrotubulov, udržiavanie integrity neurónov a axonálny transport. Vyskytuje sa vo fosforylovanej a defosforylovanej forme. V defosforylovanej forme sa viaže na mikrotubuly. U pacientov s AD nastáva hyperfosforylácia Tau, čo znižuje jeho schopnosť viazať a stabilizovať mikrotubuly. Hyperfosforylovaný Tau sa zhlukuje a tvorí neurofibrilárne splete, čo vedie k poruche axonálneho transportu, k strate funkcií neurónu a k demencii. Mutácie v géne kódujúcom Tau (*MAPT*) vedú taktiež k frontotemporálnej demencii. V sporadickej forme AD hrá významnú úlohu apolipoproteínový E genotyp. APOE sa vyskytuje v troch izoformách (E2, E3, E4), je exprimovaný z jedného lokusu v troch alelických formách (E2, E3, E4). Najčastejšia varianta v populácii je alela E3, s frekvenciou 72%, alela E2 sa vyskytuje s frekvenciou 11% a alela E4 sa vyskytuje s frekvenciou 17%. Prítomnosť APOE alely E4 zvyšuje riziko ochorenia 3-násobne u heterozygotov a 15-násobne u homozygotov. AD je

ireverzibilné, progresívne neurodegeneratívne ochorenie s rozvojom demencie a atrofie mozgu. Spočiatku sa začína prejavovať poruchami pamäti, najmä novopamäti, pacienti zabúdajú na nedávne udalosti. Neskôr si pacienti nespomínajú na mená osôb, ktoré poznajú, nie sú orientovaní časom. Ich slovník sa stáva čoraz chudobnejší, dochádza k poruche kognitívnych funkcií. V pokročilom štádiu sa objavuje extrapyramídová symptomatika, poruchy chôdze, ataxia, poruchy kontinencie. Pri vyšetrení sú pozitívne patologické axiálne reflexy, dochádza k rozpadu osobnosti. Ťažšie prípady začínajú už v 4. alebo 5. decéniu.

Cerebrálne kavernózne malformácie (CCM)

Synonymá: familiárne kavernózne hemangiomy, familiárne cerebrálne kavernózne angiomy, cerebrálne kapilárne malformácie

Ide o ochorenie s familiárnym výskytom spravidla viacpočetných vaskulárnych malformácií (hemangiómov) v mozgu. Na základe MR nálezov a údajov z autopsie sa frekvencia CCM v bežnej populácii odhaduje na 0,1% až 0,5%. Z toho familiárne formy (výskyt minimálne u dvoch rodinných

príslušníkov) predstavujú 10 až 40% (Labauge et al., 2007). Kavernózne útvary – malformácie veľkosti niekoľko mm až cm sú tvorené zväčšenými kapilárnymi sieťami -kanálmi iba s vrstvou endoteliálnych buniek, bez hladkej svaloviny. Pri familiárnom výskyte hemangiomy v CNS sú spravidla viacpočetné, so vzrastajúcim vekom ich počet rastie a taktiež rastie riziko hemoragických komplikácií. U sporadického výskytu CCM, ak pacienti mali zistené viacpočetné lézie, genetické vyšetrenia odhalili u viac než 50% prípadov de novo mutácie korešpondujúcich génov (Denier et al., 2006). Okrem mozgu sa môžu angiomy zriedkavo vyskytovať v mieche, v retine a v hyperkeratotických kožných ložiskách. Pri dokázaných geneticky podmienených formách dedičnosť je autozómovo dominantná s neúplnou avšak vysokou penetranciou. Molekulárno-genetické vyšetrenia potvrdili až u 80% familiárnych foriem mutácie v troch kaulných génoch – **CCM1/KRIT1**, **CCM2** a **CCM3/PDCD10**. Proteínové produkty uvedených génov zrejme zohrávajú významnú úlohu v regulácii angiogenézy. Farmakoterapeutické ovplyvnenie (statiny, sorafenib) by malo zvrátiť nepriaznivý efekt deficiencie. Pomocou sekvenčnej analýzy boli zistené germinatívne missense, nonsense, zstrihové mutácie, malé delécie, duplikácie, ktoré obvykle spôsobujú kompletnú stratu funkcie jednej alely a syntézu skrátených proteínov. Predpokladá sa, že k manifestácii sú potrebné ešte somatické mutácie kapilárnych endoteliálnych buniek v CNS, ktoré postihnú druhú alelu (Knudsonova teória dvoch zásahov). Vyšetrenie pomocou metódy MLPA zamerané na odhalenie rozsiahlejších delécií a duplikácií CCM génov viedlo k prekvapujúcemu zisteniu, že tieto molekulárne patológie (delécie) dominujú u CCM2 génu (Liquori et al., 2007) a uvedený gén môže podmieniť ochorenie až u 40% prípadov (rovnako ako CCM1 gén). Vo veku do 20 až 30 rokov väčšina jedincov s potvrdenými CCM (MR alebo molekulárno-geneticky) je asymptomatických. Klinický nález sa objavuje až u 80% probandov starších ako 40 rokov. U viac ako 50% pacientov sa objavujú kŕče, ďalej sa zisťuje fokálny neurologický deficit (30%) a cefalea (10%–20%). Väčšina pacientov s kŕčmi má lézie vo frontálnom alebo temporálnom laloku, ktoré sú spôsobené mikrohemoragiami a produktmi degradácie hemoglobínu. Riziko hemoragie sa odhaduje na 0,25% až na 6% na rok (Raychadhuri et al., 2005), resp. 2,5% na léziu a na rok u familiárnych foriem (Labauge et al., 2007). Diagnostika je založená na MR zobrazovacích metódach, ktoré zachytia hemosiderínom obklopené lézie ako následok porušenej funkcie kapilár. V prípade hemoragie je citlivejšie CT vyšetrenie. U familiárnych foriem

alebo zistení mnohopočetných foriem heman-
giómov u sporadických prípadov, je indikované
molekulárno-genetické vyšetrenie CCM génov
pomocou sekvenčných analýz a MLPA metodiky.

Cadasil

CADASIL je akronym (z angl. cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy). Ide o AD ochorenie s arteriopatiou malých subkortikálnych artérií, leukoencefalopatiu s charakteristickým nálezom na MR mozgu. Prevalencia ochorenia v západnej Európe sa odhaduje na 2 až 4 prípady na 100 000 obyvateľov. Gén **NOTCH3** kóduje jeden z proteínov Notch signálnej dráhy, ktorá má úlohu v apoptóze, regulácii rastu a diferenciácii buniek. Následky mutácie na funkciu proteínu nie sú presne známe, ide o transmembránový receptor. Mutácie vedú často k zmene cysteínových zvyškov v prevažne v extracelulárnych častiach EGFR-like doméne proteínu, k tvorbe abnormálnych disulfidových mostíkov a k zmene terciárnej štruktúry. Pre toto ochorenie sú typické opakované ischemické cerebrálne ikty, ktoré môžu byť klinicky evidentné (t.j. prítomnosť porúch reči, motoriky apod.), alebo prebiehajú subklinicky (nepozorovane). V konečnom dôsledku dominujú najmä kognitívne poruchy a poruchy správania (behaviorálne). Klinické príznaky sú evidentné už v relatívne mladom veku – okolo 20. až 50. roku života. U pacientov sa nakoniec rozvíja obraz vaskulárnej demencie. Okrem toho býva častý aj výskyt migrény s aurou alebo aj bez aury (30–40% prípadov). Na MR sa pozoruje obraz subkortikálnej atrofie mozgu s rozsiahlymi splyvavými hyperintenzitnými léziami subkortikálne, prevažne frontálne a okcipitálne.

Ehlers-Danlos syndróm, typ IV (EDS IV)

Ehlers-Danlos syndróm, typ IV (vaskulárny) je autozómovo-dominantné dedičné ochorenie, pre ktoré je typické postihnutie ciev. Ochorenie patrí do skupiny geneticky podmienených ochorení spojiva. Prevalencia všetkých typov EDS je približne 1 : 10 000 až 1 : 25 000 z toho 5 %–10 % predstavuje EDS IV. Pre vznik ochorenia sú kauzálne mutácie génu **COL3A1**, pričom u polovice prípadov mutácie vznikajú de novo. Patologickým podkladom ochorenia je deficit kolagénu typu III – zložky stien artérií

a čriev. Následkom je tvorba aneuryziem, disekcia až ruptúra stien. Najčastejšie postihnuté cievy sú vetvy aorty, karotídy, vertebrálne, cerebrálne artérie. Vysoké riziko vaskulárnych ruptúr je v gravidite, pričom maternálna mortalita je až 12 %. Ruptúry artérií, spontánna ruptúra čreva a ruptúra matrice v gravidite sú najčastejšou klinickou komplikáciou EDS IV a často aj prvým príznakom ochorenia. Arteriálna ruptúra a krvácanie do telesných dutín je vedúcim príznakom, pri ktorom sa zväčša supponuje diagnóza EDS. Priemerná dĺžka života pacientov je skrátená na 48 rokov, prvú komplikáciu má 89 % pacientov do 40 rokov života (Pepin et al., 2000). Medzi iné časté klinické príznaky ochorenia patrí fragilná, tenká až priesvitná koža s viditeľnou podkožnou cievnu kresbou, telengiektázie na očných viečkach, venózne varikozity a častá je tvorba ekchymóz, hematómov. Diagnóza je supponovaná na základe klinického obrazu. Ďalej je možné pokračovať vyšetrením kolagénu z kultivovaných kožných fibroblastov, pričom sa zistí deficit alebo kvalitatívne zmeny spojené s abnormálnou ELFO mobilitou prokolagénu III (nájdene aj u jedincov bez zistenej mutácie). Potvrdzujúcim je molekulárno-genetické vyšetrenie **COL3A1** génu, pričom sekvenčná analýza odhalí až 98 % patológií.

Výskum genetických ochorení na pracovisku bol podporovaný grantmi Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky:

- Vypracovanie a translácia laboratórnych, klinicko-diferenciálno-diagnostických a terapeutických algoritmov pri peroxizómových dedičných metabolických poruchách (MZ SR č. 2007/38-FNSPBA-03)
- Farmakogenetický prístup pri výbere terapie nádorov (MZ SR č. 2007/39-FNSPBA-04)

Literatúra

1. Amiri K, Hagerman RJ, Hagerman PJ. Fragile X-Associated Tremor/Ataxia Syndrome. Arch Neurol 2008; 65: 19–25.
2. Au KS, Williams AT, Roach ES, et al. Genotype/phenotype correlation in 325 individuals referred for a diagnosis of tuberous sclerosis complex in the United States. Genet Med 2007; 9: 88–100.
3. Campion D, Dumanchin C, Hannequin D, et al. Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum. Am J Hum Genet 1999; 65: 664–670.

4. Devys D, Lutz Y, Rouyer N, Belloq JP, Mandel JL. The FMR-1 protein is cytoplasmic, most abundant in neurons and appears normal in carriers of a fragile X premutation. Nat genet 1993; 4: 335–340.
5. Evans DG. Neurofibromatosis type 2 (NF2): a clinical and molecular review. Orphanet J Rare Dis 2009; 4: 16.
6. Denier C, Labauge P, Bergametti, et al. Genotype-phenotype correlations in cerebral cavernous malformations patients. Ann Neurol 2006; 60: 550–556.
7. Hagerman RJ, Hall DA, Coffey S, et al. Treatment of fragile X-associated tremor ataxia syndrome (FXTAS) and related neurological problems. Clin Interv Aging 2008; 3: 251–26230.
8. Hagerman RJ, Leehey M, Heinrichs W, et al. Intention tremor, parkinsonism, and generalized brain atrophy in male carriers of fragile X. Neurology 2001; 57: 127–130.
9. Jacquemont S, Hagerman RJ, Leehey M, et al. Fragile X Premutation Tremor/Ataxia Syndrome: Molecular, Clinical, and Neuroimaging Correlates. Am J Hum Genet 2003; 72: 869–878.
10. Kwiatkowska J, Jozwiak S, Hall F, et al. Comprehensive mutational analysis of the TSC1 gene: observations on frequency of mutation, associated features, and nonpenetrance. Ann Hum Genet 1998; 62: 277–285.
11. Labauge P, Denier, Bergametti F, Tourner-Lasserre E. Genetics of cavernous angiomas: Lancet Neurol 2007; 6: 237–244.
12. Liquori C.L, Berg M.J, Squitieri F, et al. Deletions in CCM2 are a common cause of cerebral cavernous malformations: Am J Hum Genet 2007; 80: 69–75.
13. Macpherson J, Waghorn A, Hammans S, Jacobs P. Observation of an excess of fragile-X premutations in a population of males referred with spinocerebellar ataxia. Hum Genet 2003; 112: 619–620.
14. Pepin M, Schwarze U, Superti-Figura A, Byers P.H. Clinical and genetic features of Ehlers-danlos syndrome type IV, the vascular type. N Engl J Med 2000; 342: 673–668.
15. Povey S, Burley MW, Attwood J, et al. Two loci for tuberous sclerosis: one on 9q34 and one on 16p13. Ann Hum Genet 1994; 58: 107–127.
16. Raychaudhuri R, Batjer H, Awad I A. Intracranial cavernous angioma: a practical review of clinical and biological aspects. Surgical Neurol 2005; 63: 319–328.
17. Wang Q, Montmain G, Ruano E, et al. Neurofibromatosis type 1 gene as a mutational target in a mismatch repair-deficient cell type. Hum Genet 2003; 112: 117–123.
18. Zumrová A, Mušová Z, Havlovicová M, Schwabová J, Jech R, Hlavová E. Syndróm fragilního chromozómu X s tremorem/ataxií (FXTAS): pilotní studie na souboru pacientů s ataxií nejasné etiologie. Česk Slov Neurol N 2007; 70: 558–561.

Článek doručen redakci: 9. 11. 2012

Článek přijat k publikaci: 13. 2. 2012

doc. MUDr. Ján Chandoga, CSc.

Ústav lekárskej biológie, genetiky
a klinickej genetiky LF UK a UNB
Nemocnica Staré mesto,
Mickiewiczova 13, 813 69 Bratislava
clgfn@post.sk

