

*Warsztaty dla Pacjentów z PCD*

Warszawa 2015

# Molekularne i genetyczne podłoże pierwotnej dyskinezy rzęsek (PCD)

**Ewa Ziętkiewicz**

Z-d Genetyki Molekularnej i Klinicznej,  
Instytut Genetyki Człowieka PAN, Poznań

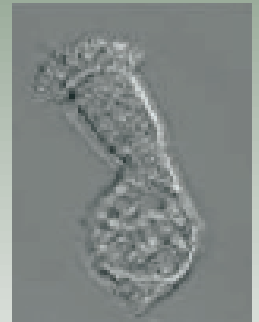
# Rzęski

Rzęski - mikroskopijne struktury występujące na powierzchni komórek

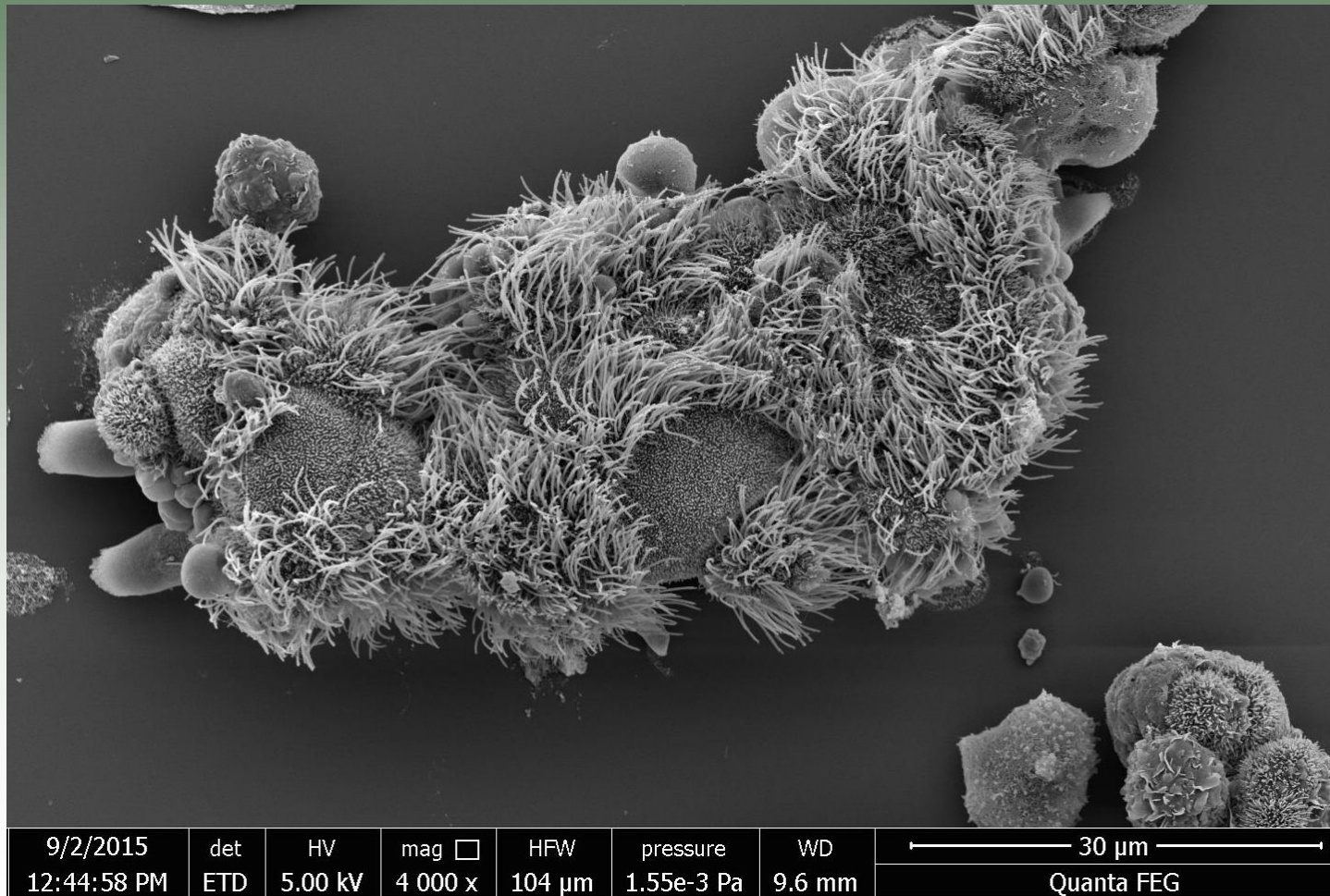
- motoryczne (ruchowe) i sensoryczne (czuciowe)
- w PCD - zaburzenie funkcji rzęsek ruchowych

## Występowanie i rola rzęsek ruchowych :

- powierzchnia komórek nabłonka (układ oddechowy; jajowody, mózg, ucho)
  - = na pojedynczej komórce setki rzęsek
  - = skoordynowany falowy ruch >>>> **przemieszczanie śluzu**
- plemniki (wici)
  - = pojedyncza wić, ruch wężowy >>>> **ruch plemników**
- komórki zarodka (rzęski pierwotne)
  - = pojedyncze rzęski, ruch spiralny >>>> **określenie a/symetrii ciała**



# Obraz nabłonka orzęsionego w skaningowym mikroskopie elektronowym (powiększenie 4 tys x)



# Ruch rzęsek

(ultraszybka kamera wideomikroskopowa )

<https://www.youtube.com/watch?v=8TIkmmwpY5Y>

<https://www.youtube.com/watch?v=Uvs5cOJYw7U>

# Pierwotna dyskineza rzęsek (PCD)

## Pierwotna dyskineza rzęsek (*primary ciliary dyskinesia, PCD*)

- \* częstość występowania: 1:16-60,000 żywych urodzeń (PL: około 1:40,000)

## Podłoże molekularne - zaburzenia funkcji rzęsek ruchowych

- brak ruchu, zmiana wzoru ruchu, brak koordynacji ruchu

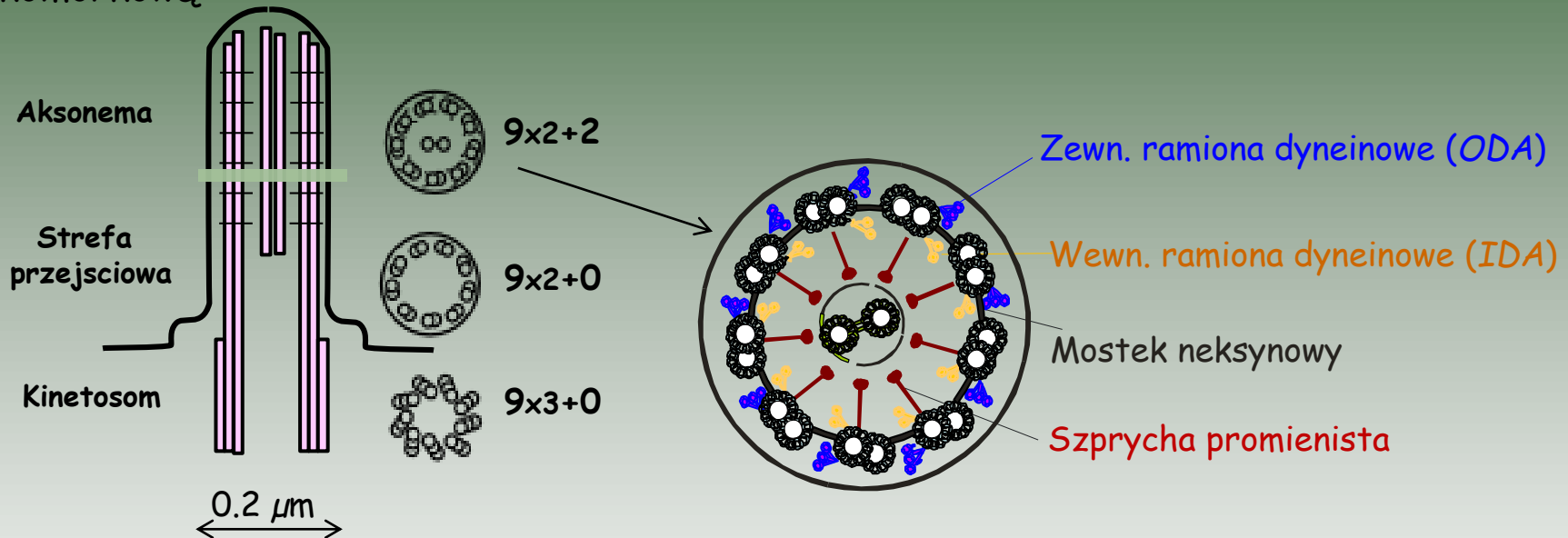
## Objawy kliniczne wynikają z zaburzenia funkcji rzęsek zależnych od ich lokalizacji:

- **komórki nabłonka oddechowego** (oczyszczanie śluzowo-rzęskowe)
  - nawracające zapalenia zatok i górnych dróg oddechowych, rozstrzenie oskrzeli
- **plemniki i komórki nabłonka jajowodów**
  - zaburzenia przemieszczanie gamet i obniżenie płodności
- **węzeł zarodkowy**
  - randomizacja symetrii ciała: w 50% przypadków całkowite przełożenie trzewi (podtyp PCD - zespół Kartagenera)

## Zaburzenia ruchu - związek z defektami ultrastruktury rzęsek

# Ultrastruktura rzęski - analiza w TME

Rzęska - zespół mikrotubuli (MT) wystających z powierzchni komórki, pokrytych błoną komórkową

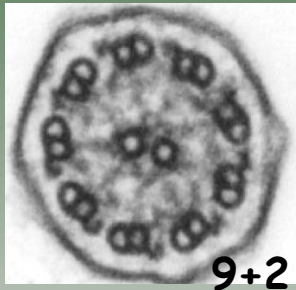


**Przekrój poprzeczny** - 2 mikrotubule centralne i 9 dubletów MT obwodowych oraz inne elementy (ramiona dyneinowe, mostki, szprychy), odpowiedzialne za ruch (zginanie) rzęski

Każdy z tych elementów zbudowany z wielu różnych białek (**ponad 200 białek strukturalnych, plus kilkaset innych**, związanych z funkcjonowaniem rzęsek)

# Defekty ultrastruktury rzęsek: analiza przekrojów w transm. mikroskopie elektronowym

Prawidłowa



Brak ramion dyneinowych (najczęstszy defekt)

brak ODA



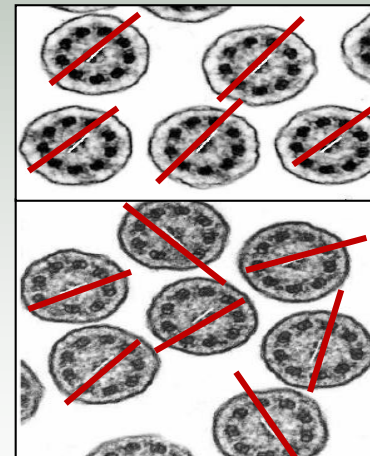
brak ODA i IDA



Zaburzenie ułożenia/liczby mikrotubul



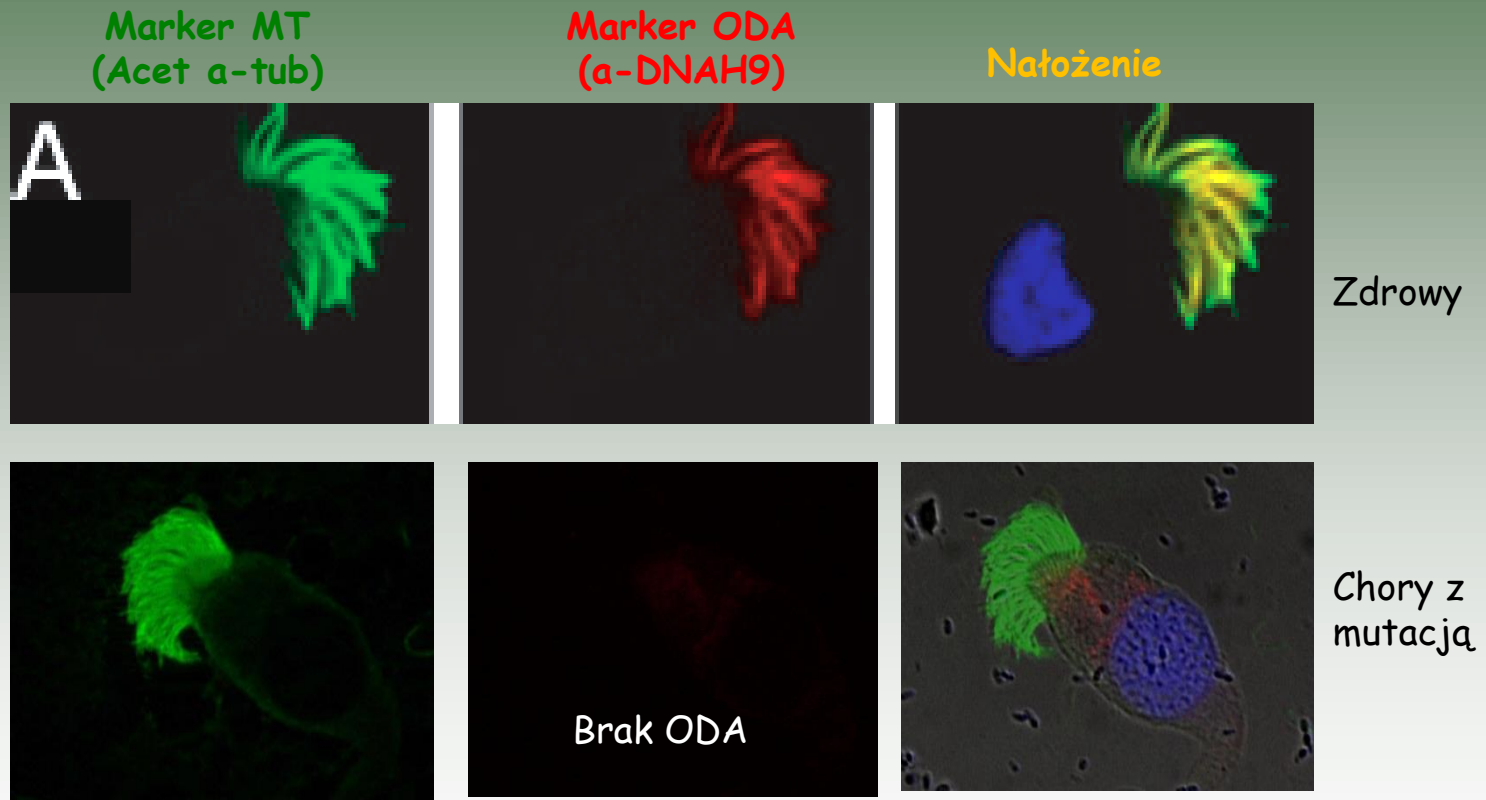
Zaburzenie orientacji



Badania trudne technicznie; możliwość defektów wtórnych

# Analiza immunofluorescencyjna (IF) rzęsek w komórkach nabłonka oddechowego

Podobnie jak TEM, dostarcza informacji nt defektu ultrastruktury



Przykład - brak sygnału markera ODA u chorego z mutacją w genie DNAH5

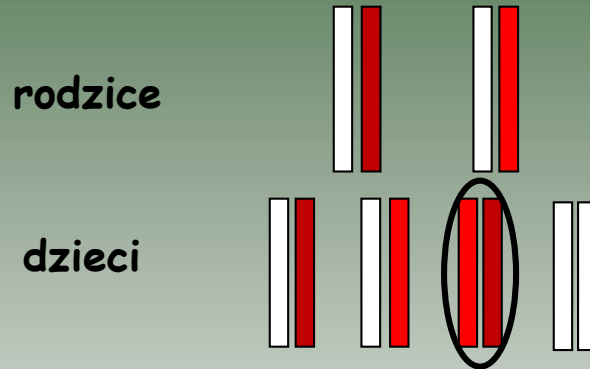


# Analiza obrazowa i badania genetyczne

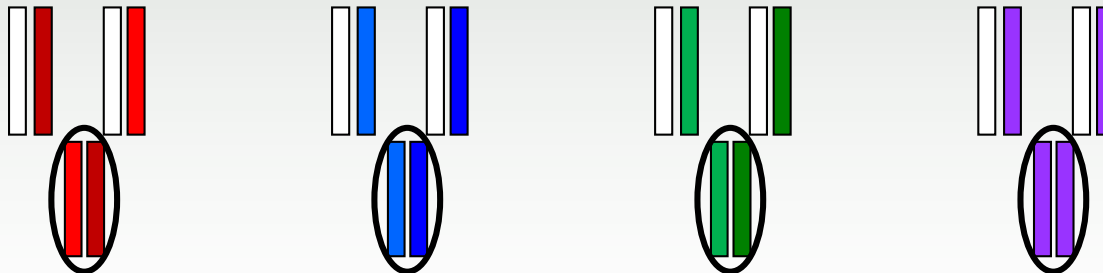
- **Czemu służą metody obrazowe (TEM, IF)**
  - Wstępne potwierdzenie diagnozy klinicznej
  - Określenie związku mutacji (w genie) z defektem struktury/funkcji rzęsek
  - Podział chorych pod kątem defektu - ukierunkowanie badań genetycznych
  - Nie pozwalają jednoznacznie określić pierwotnej przyczyny molekularnej (mutacje w różnych genach mogą powodować ten sam defekt ultrastruktury)
  - Obie metody wymagają pobrania nabłonka orzęsionego od pacjenta
  - Niektóre mutacje nie powodują zmian wykrywanych tymi metodami
- **Badania genetyczne**
  - Identyfikacja mutacji = jednoznaczne określenie przyczyny choroby
  - Możliwość diagnostyki przed wystąpieniem objawów
  - Możliwość określenia nosicielstwa
  - Materiał biologiczny do badań - próbka krwi
  - Trudność - heterogenność choroby (wiele genów, wiele różnych mutacji)
  - Nie wszystkie mutacje są znane

# Genetyczne podłoże PCD

Dziedziczenie recesywne autosomalne (rodzice - bezobjawowi nosiciele)



Złożoność budowy i funkcji rzęsek > **duża heterogenność genetyczna** w populacji chorych (PCD może być wywołana przez mutacje w różnych genach, ale w danej rodzinie zawsze jeden gen)



# Genetyczne podłoże PCD

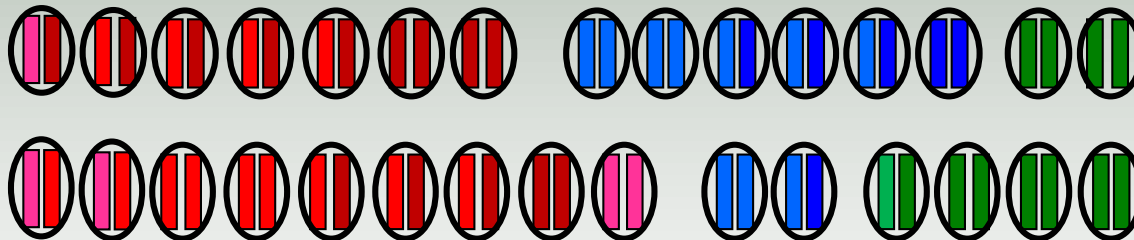
Aktualnie znane ~30 genów o udowodnionym związku z PCD

Mutacje w tych genach wyjaśniają podłoże 50-65% przypadków

Różny procentowy udział każdego z genów w patogenezie PCD



Częstość poszczególnych mutacji różna w różnych populacjach



Wiele mutacji „prywatnych” (ograniczonych do jednej rodziny)

Ponad 35% przypadków bez znanej mutacji -> konieczność poszukiwania dalszych genów zaangażowanych w patogenezę PCD

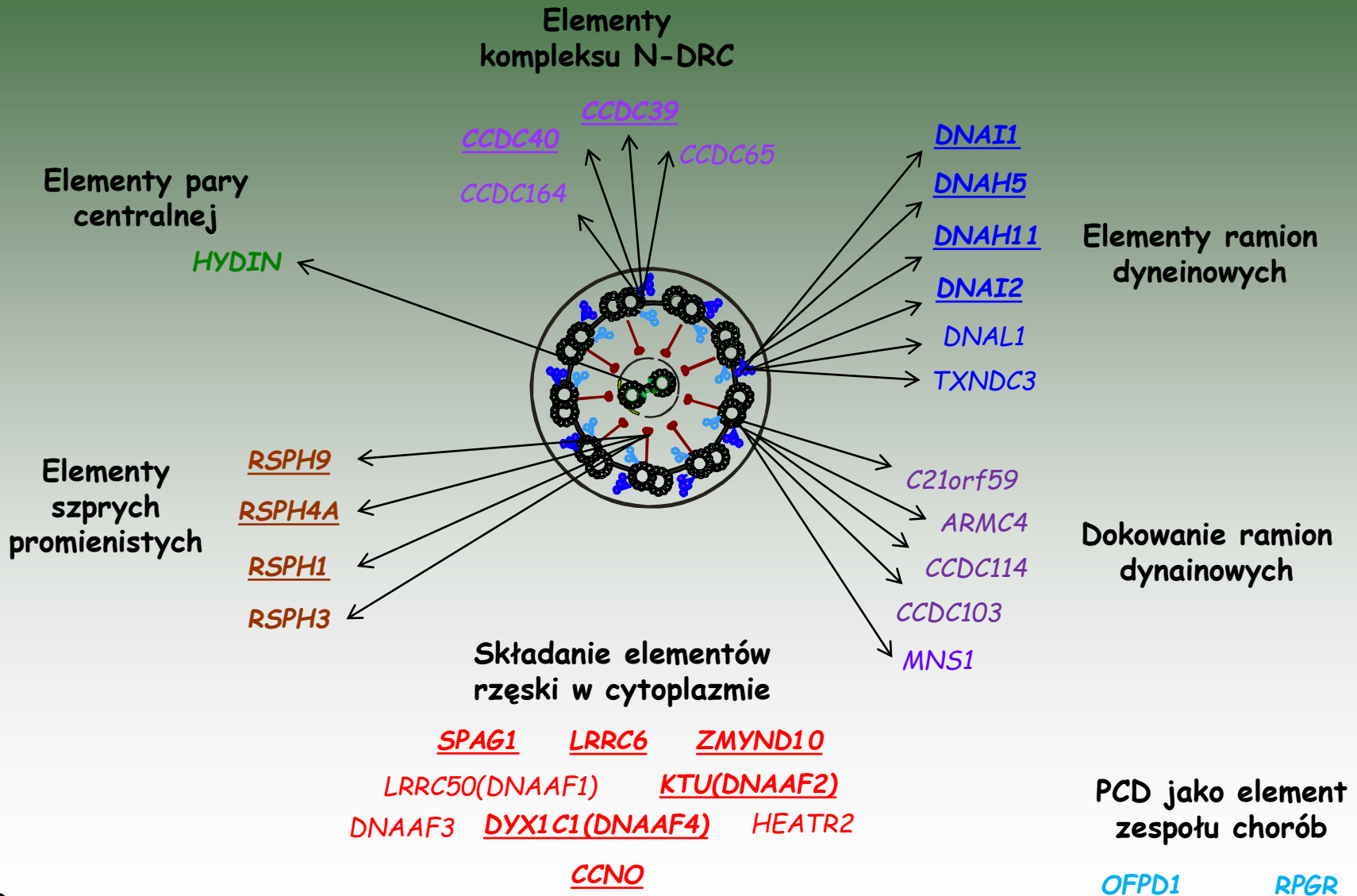
# Badania genetyki PCD w IGCz PAN

- Materiał (DNA z krwi obwodowej) głównie od chorych urodzonych po 1975r:
  - ponad **280** rodzin, ~1:1 z odwróceniem trzewi i bez
  - dla 1/3 chorych - dostępne wyniki TEM (diagnostyka)
  - wyniki badań IF - dla około 1/5 chorych (ograniczona dostępność wymazów)
  - pochodzenie regionalne - na podst. kodów pocztowych

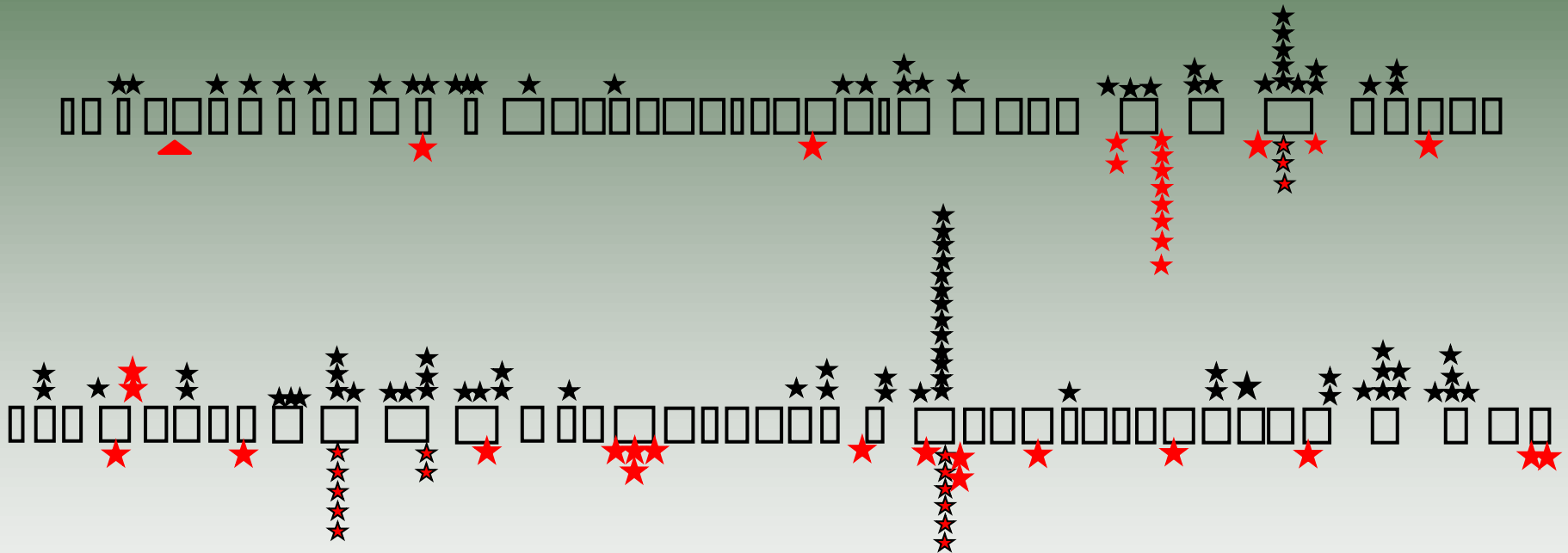


# Geny PCD badane w IGCz Poznań:

## 16 z 30



# Gen DNAH5

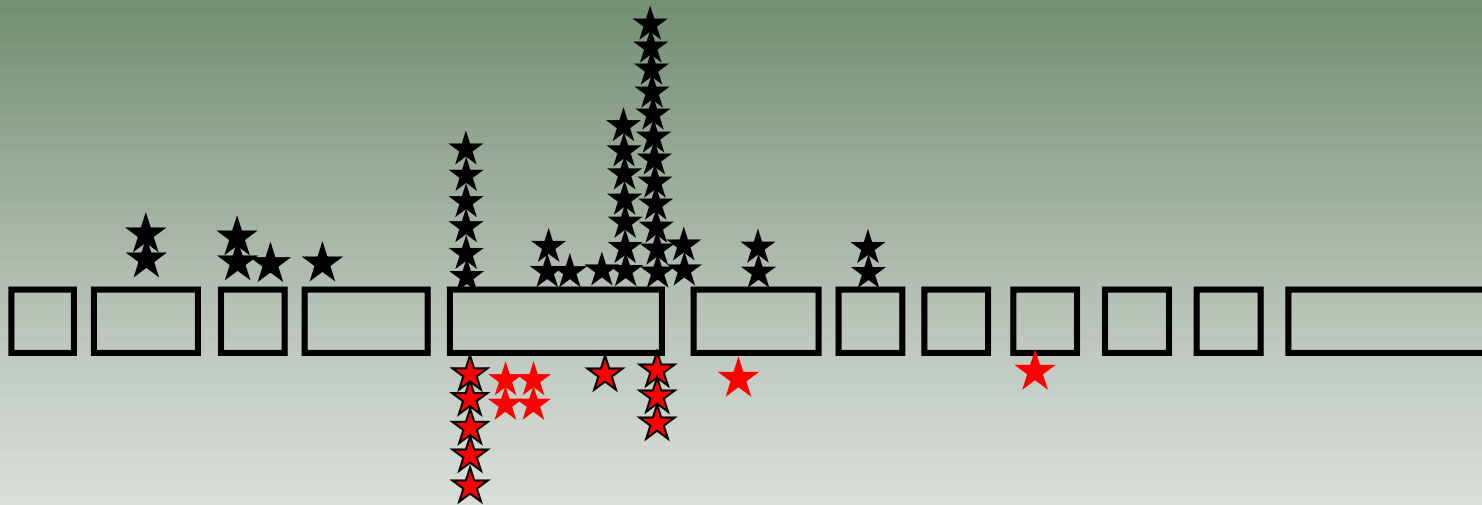


>110 mutacji

92 prywatne

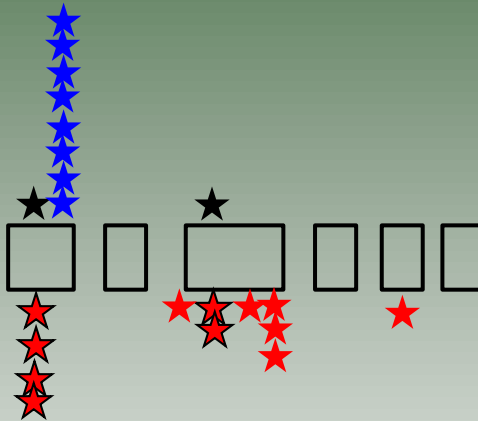
4 częste, w tym 1PL

# Gen LRRC6



17 mutacji  
11 prywatnych  
3 częste

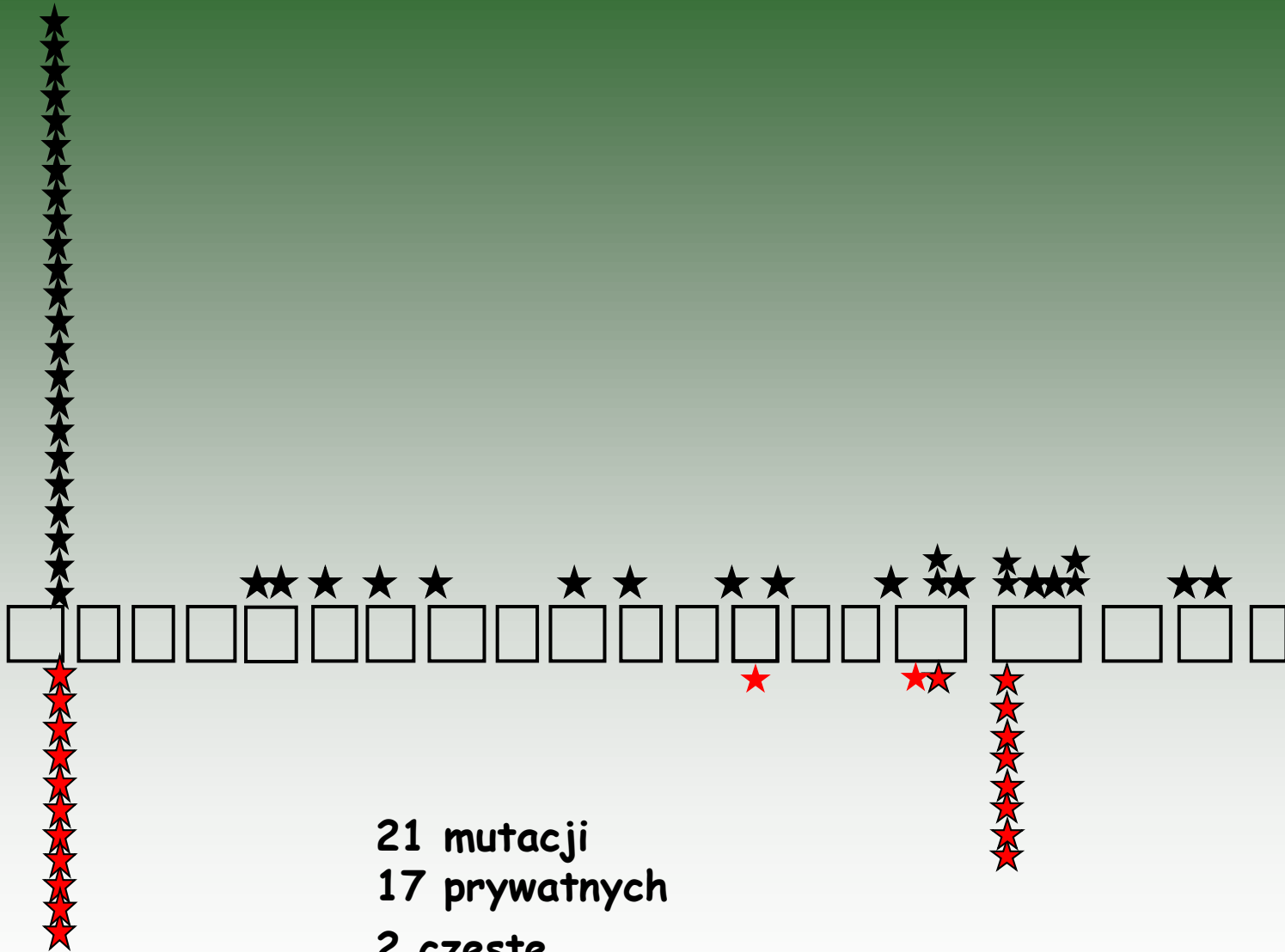
# Gen RSPH4A



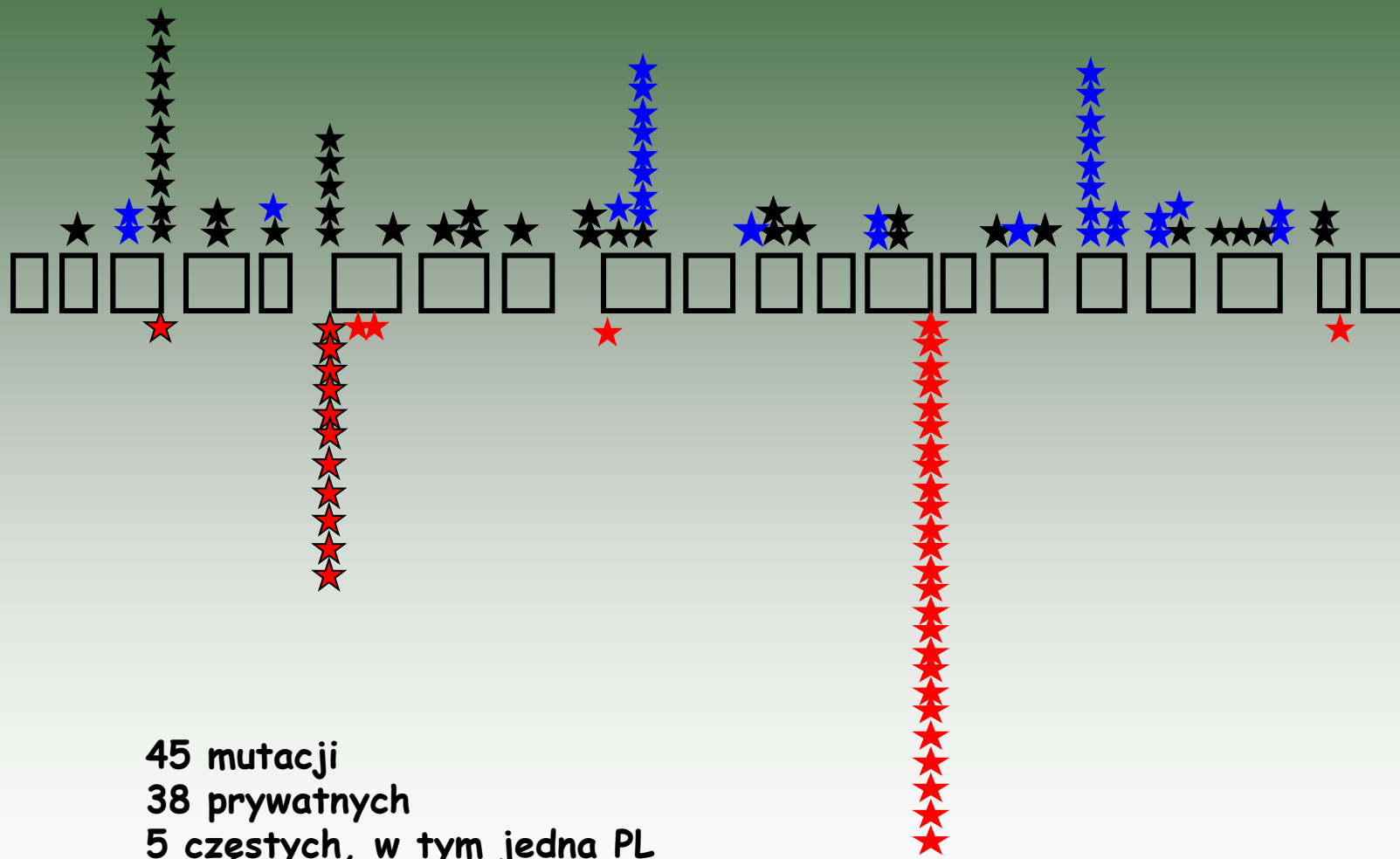
7 mutacji  
3 prywatne  
brak częstych



# Gen DNAI1

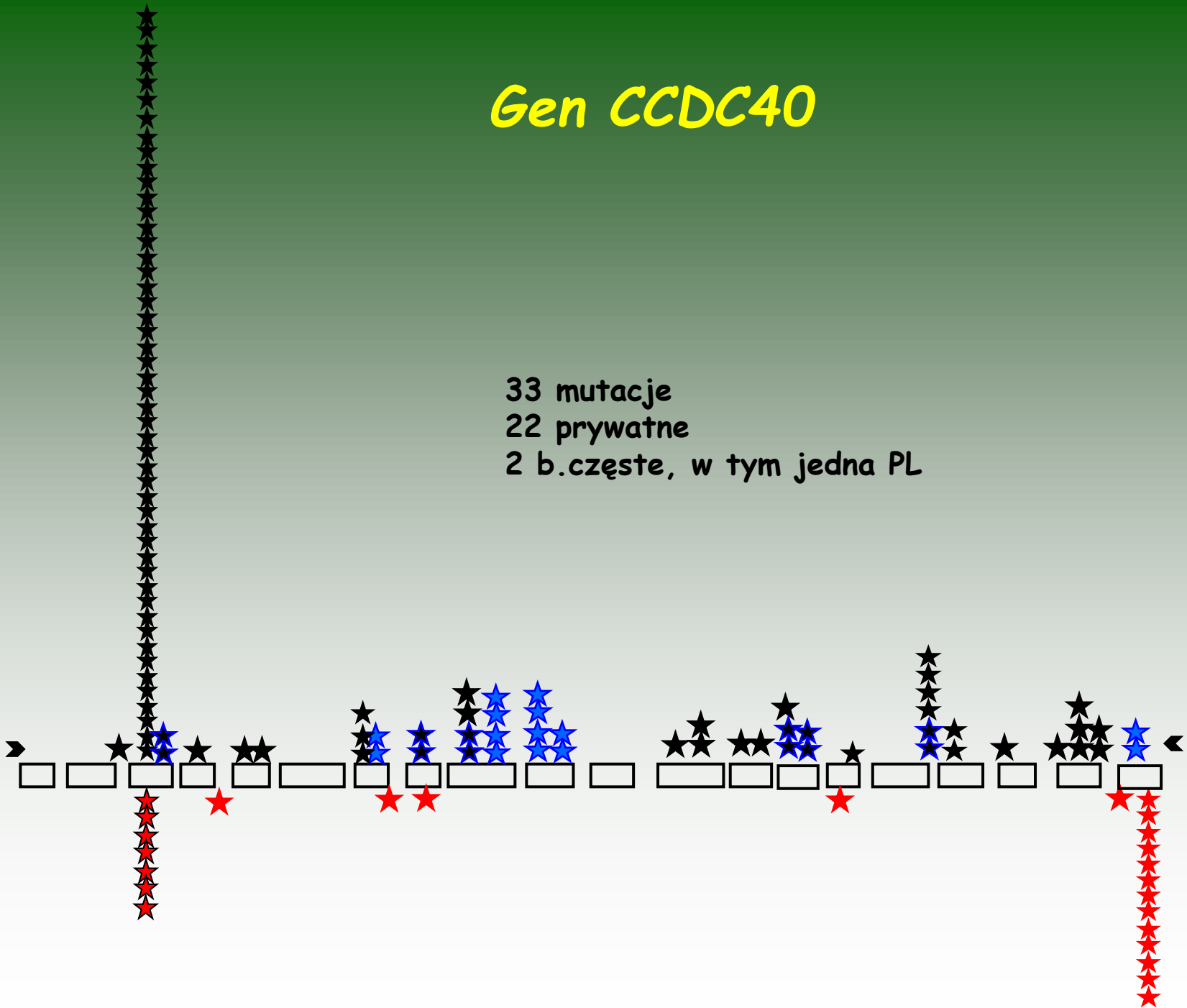


# Gen CCDC39

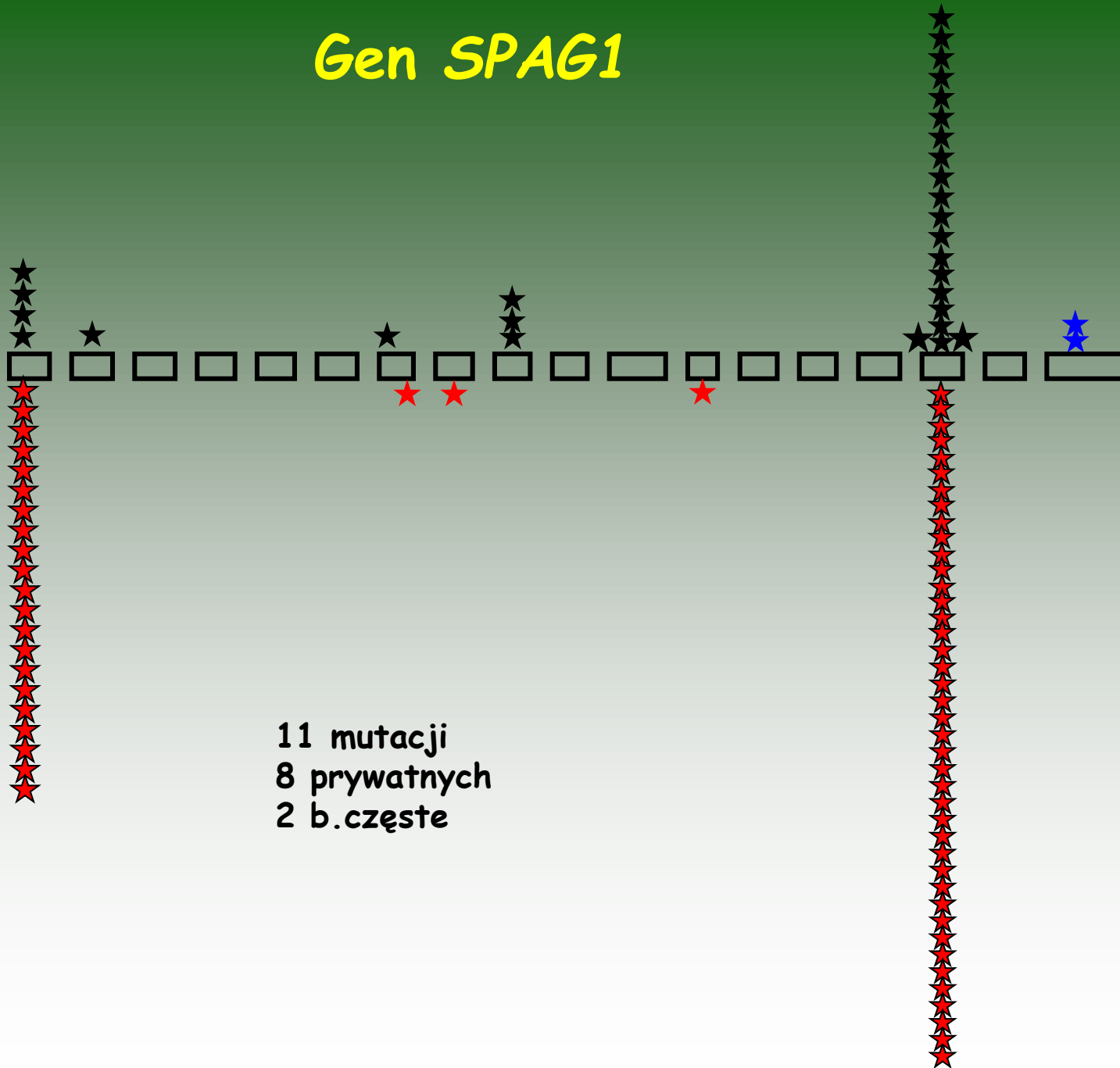


# Gen CCDC40

33 mutacje  
22 prywatne  
2 b. częste, w tym jedna PL

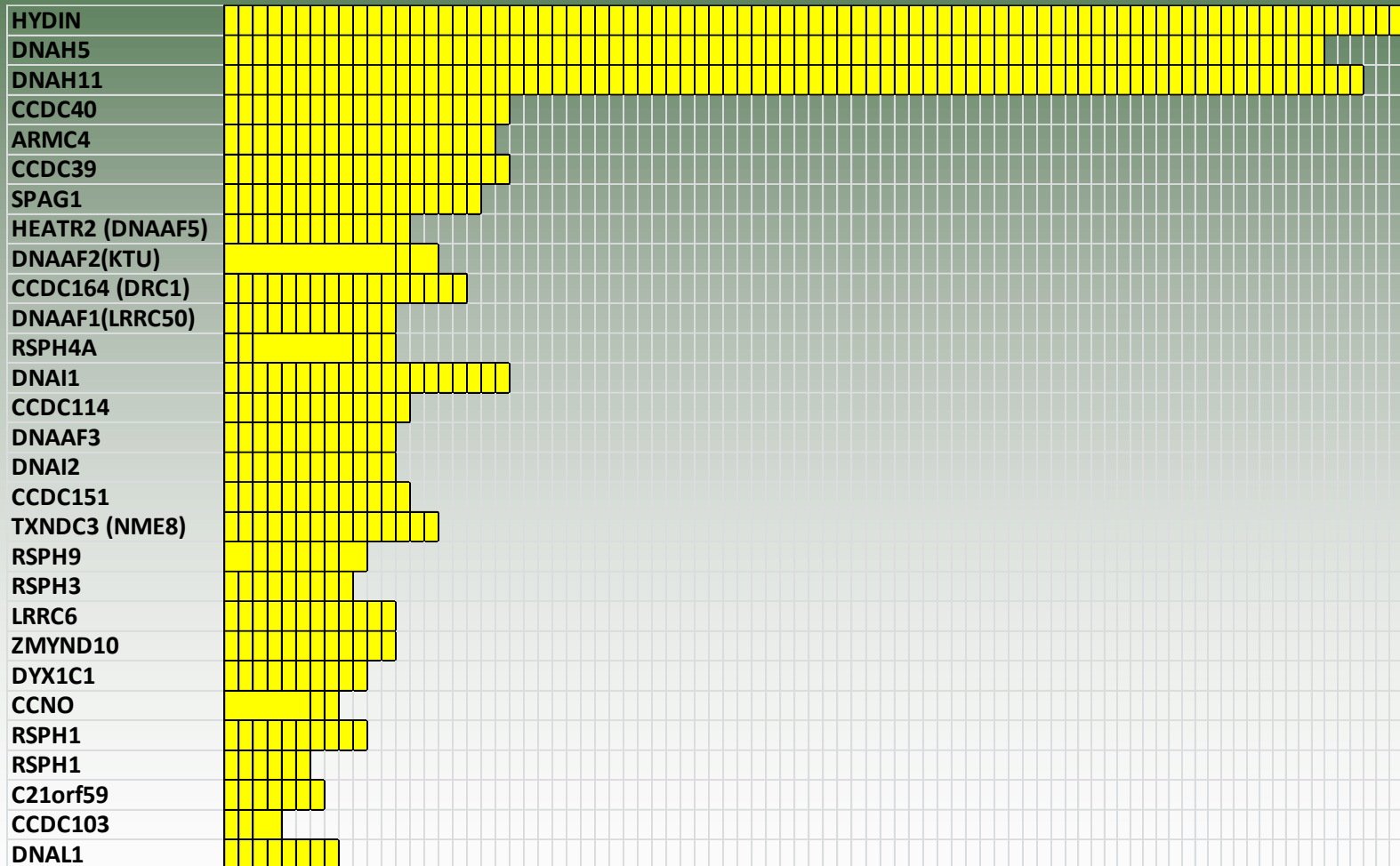


# Gen SPAG1

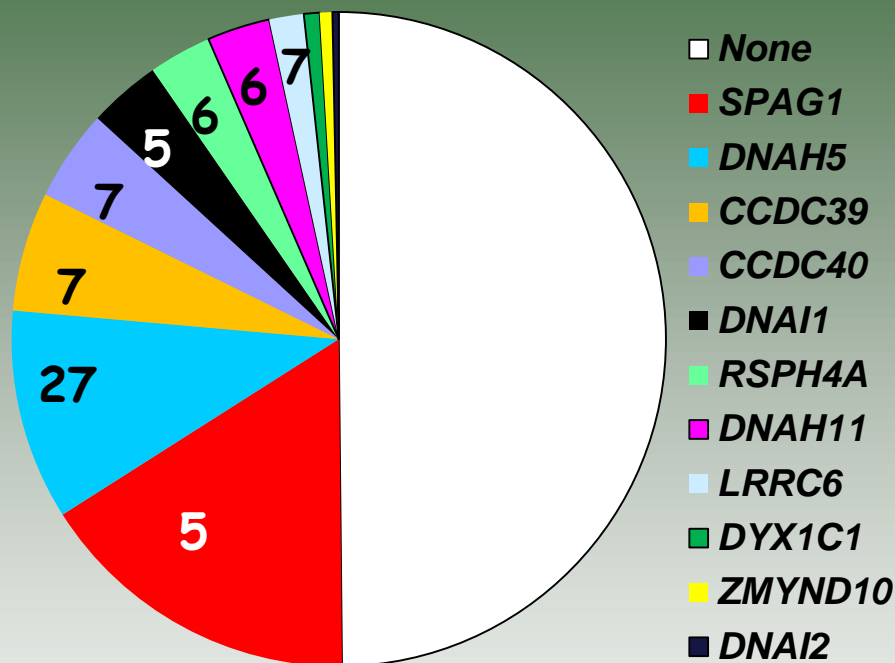


11 mutacji  
8 prywatnych  
2 b. częste

# Długości genów PCD



# Genetyczne podłoże PCD w polskiej populacji chorych



Analiza **11 z 28** genów PCD wyjaśniła podstawy genetyczne choroby  
u około połowy chorych

~60% mutacji - **prywatne** (znalezione w pojedynczej rodzinie)

# Genetyczne podłoże PCD w polskiej populacji

Polska populacja jest równie heterogenna genetycznie jak reszta Europy, ale posiada profil mutacji różniący się od profilu w innych populacjach

Nierównomierny rozkład mutacji w genach pozwala na ograniczenie zakresu badań diagnostycznych

Diagnostyka – wstępna analiza ograniczona do około 30 mutacji w 6 genach pozwala określić genetyczne podstawy PCD u około 1/3 pacjentów; pozostali – poszerzone badania obejmujące 30 znanych genów albo inne geny (badania w toku)

# Wykonawcy

- **Zakład Genetyki Molekularnej i Klinicznej IGCz PAN**

- Kierownik Zakładu : prof. Michał Witt
- Analiza molekularna genów PCD :
  - dr Z. Bukowy-Bieryłło, dr P. Daca-Roszak, dr A. Wojda,  
**mgr B. Klimek, mgr K. Voelkel, mgr A. Greber, E. Rutkiewicz;**
  - magistranci, doktoranci, stażyści
- Koordynacja i prowadzenie projektu : prof. Ewa Ziętkiewicz

- **Współpraca krajowa**

- Nabór pacjentów, ocena kliniczna, pozyskiwanie materiału biologicznego:
  - dr Pogorzelski (IGChP Rabka); dr Dmeńska (ICZDz Wwa); prof. Bręborowicz,  
dr Kycler (AM Poznań); dr Bielecka, dr Pomarańska, dr Eckerman i inni
- Ocena preparatów w mikroskopie elektronowym:
  - dr Sulikowska-Rowińska (UM Wwa), prof. Biczysko (UM Poznań)

- **Współpraca zagraniczna**

- Zespół prof. Omrana (Muenster, Niemcy)

- **Finansowanie**

- Granty KBN: 3PO5E03824; PBZ-KBN122/P05-1; NN401-277534; NN401-095537
- Grant NCN: 2011/01/B/NZ4/04840; 2014/05/B/NZ2/03858
- Projekt BESTCILIA



# Specjalne podziękowania

dla

**Chorych na PCD i ich Rodzin,  
ofiarodawców  
bezcennego materiału biologicznego 😊**

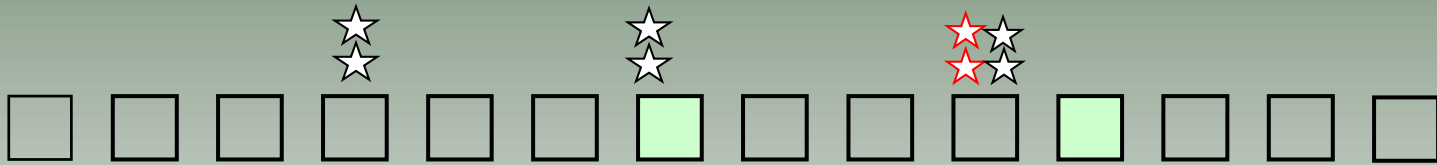




# Gen DNAI2

Łańcuch pośredni dyneiny aksonemalnej typu II (14 eksonów), wchodzi w skład ODA

U chorych z defektami ODA



Dana europejskie i polskie

- 4 różne homozygotyczne mutacje u pojedynczych rodzin