

Genetika ionotropních glutamátových receptorů ve vztahu k neurodevelopmentálním a neuropsychiatrickým onemocněním

RNDr. Aleš Balík, Ph.D.



*Oddělení buněčné neurofyzologie
Fyziologický ústav AVČR
BIOCEV*

Gen, genetika, molekulární genetika

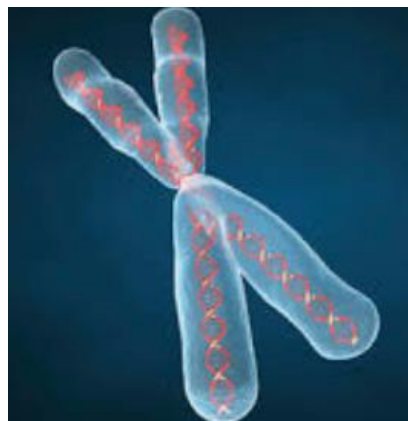


DNA

Biologický substrát kódující dědičnou informaci.

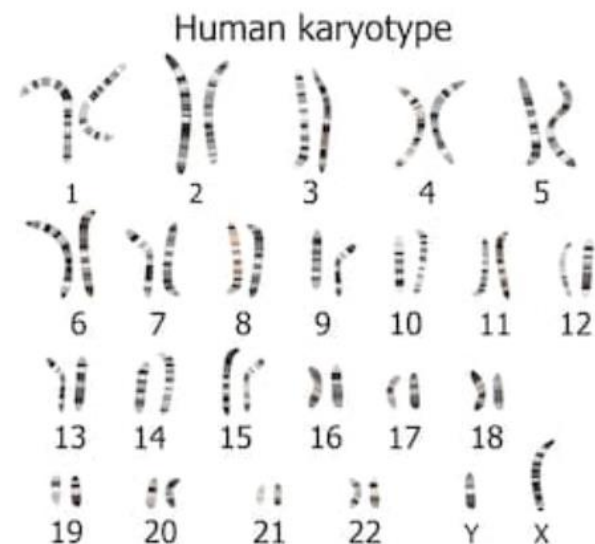
gen x alela

Gen představuje úsek DNA, který nese informaci pro tvorbu proteinu. Alela je pak specifickou formou daného genu.



chromozom

Strukturní komplex jednoho řetězce DNA (obsahující řadu genů) propojený s histonovými a dalšími proteiny.



karyotyp

Kompletní sestava všech chromozomů v buňce (autozomy, gonozomy).

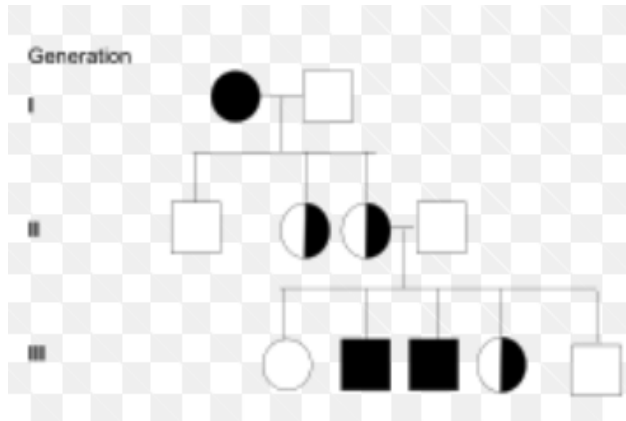
Mol. gen. je zabývá strukturou a funkcí genů, jejich regulací, změnami a dopadem těchto změn a to na molekulární úrovni.

Mendelovy zákony - přenos a síla alel

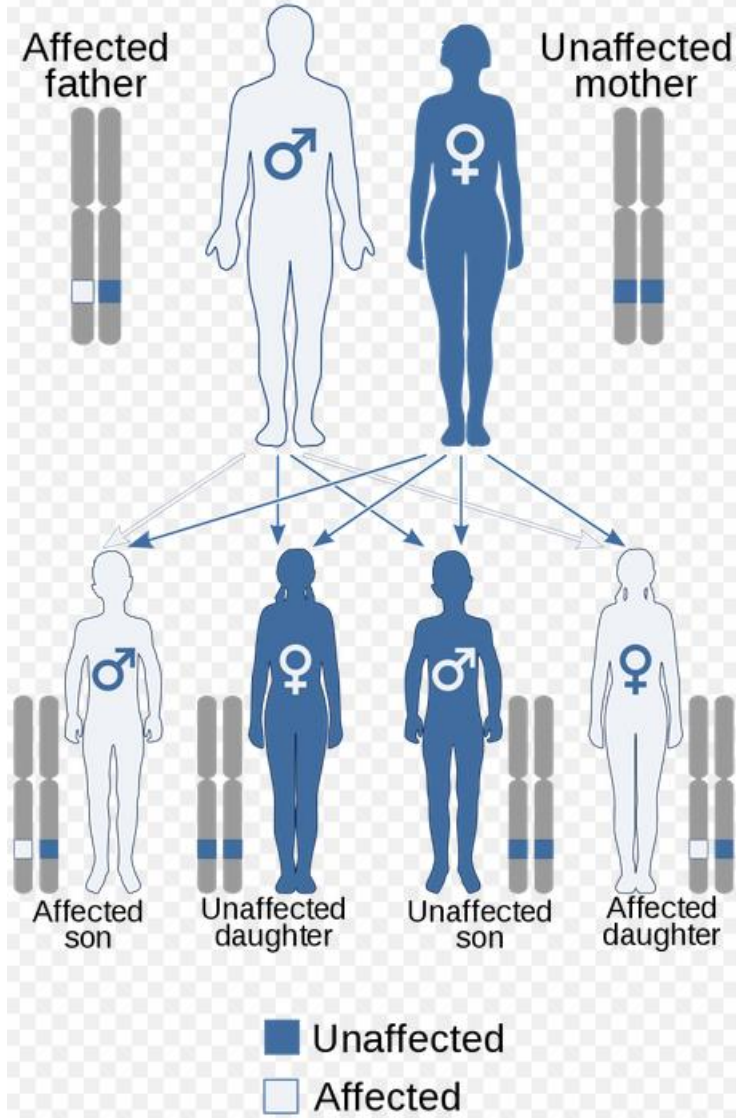
* Dominantní x recesivní alela

* Separace jednotlivých alel v gametogenezi

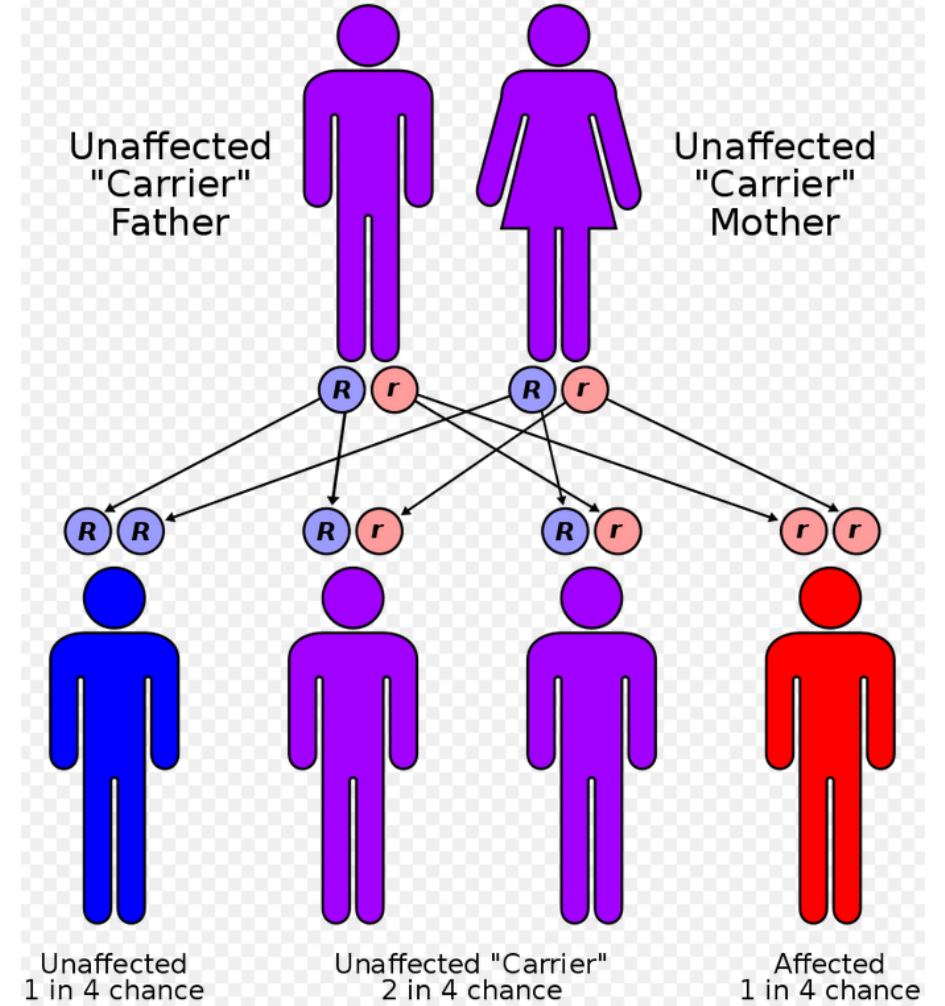
* Na ostatních genech nezávislá separace alel



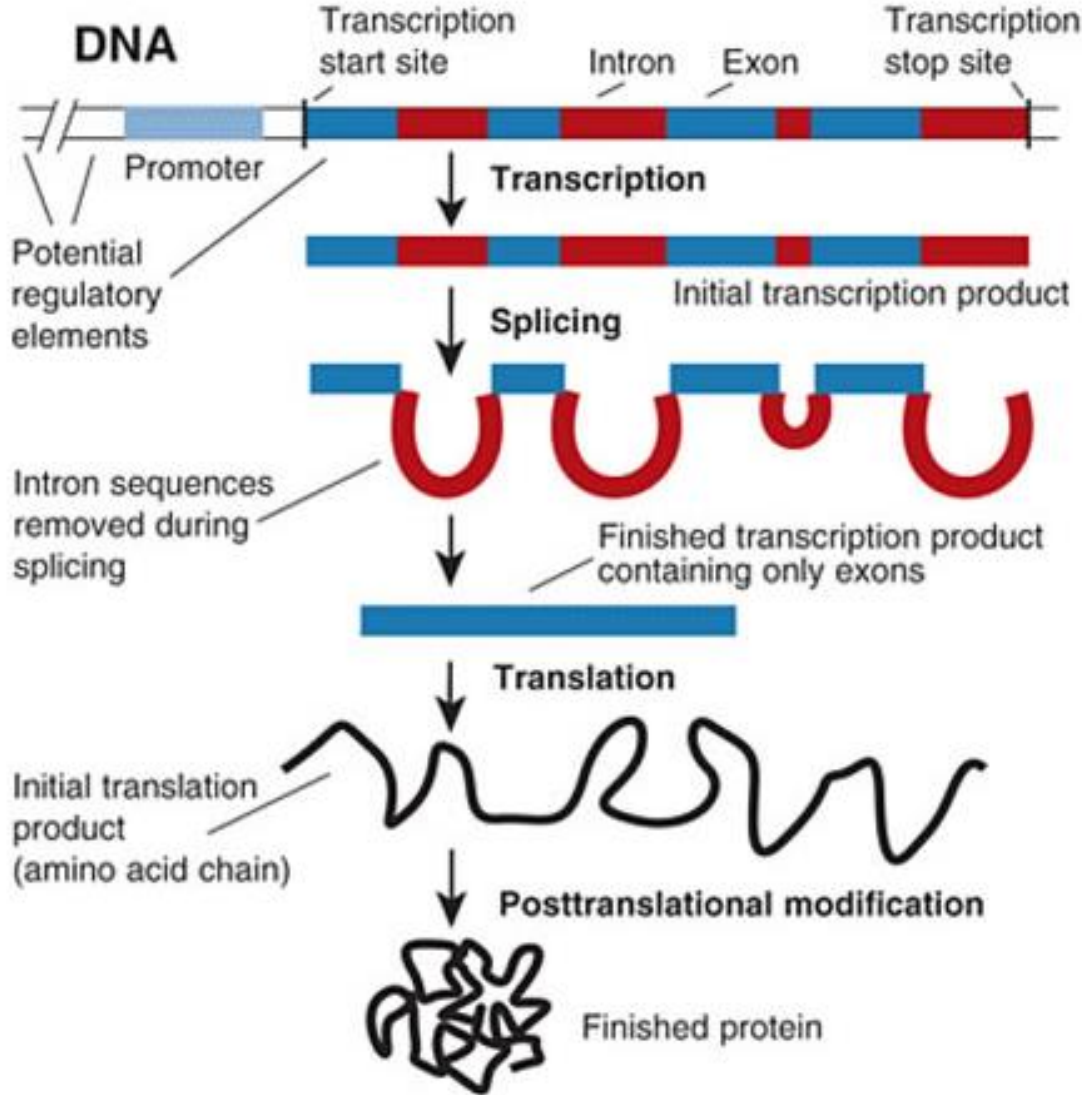
Autosomal dominant



Autosomal recessive



Expresse genů



DNA

pre-mRNA

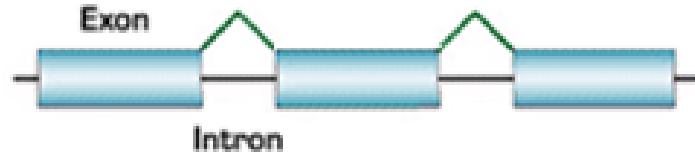
úpravy pre-mRNA
(editace, sestřih)

mRNA

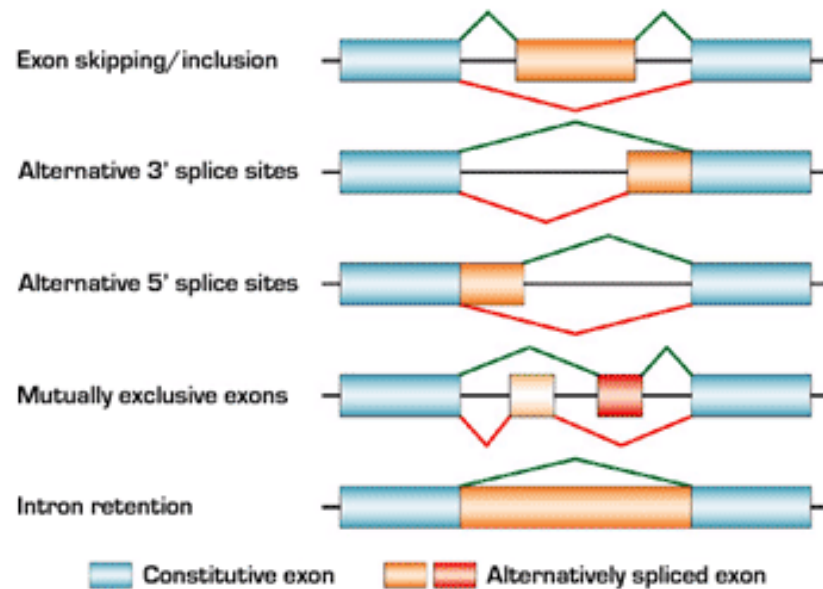
protein

Úpravy pre-mRNA

mRNA sestřih

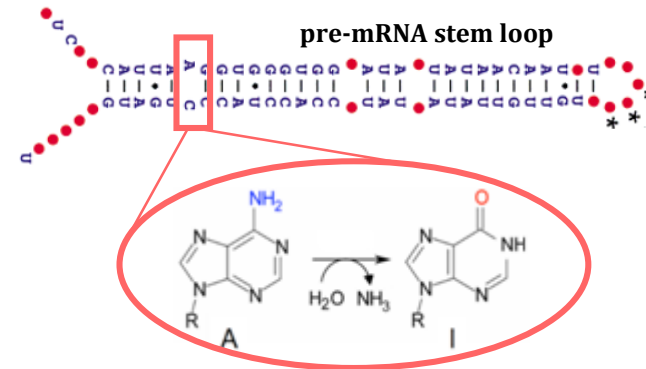


Alternativní sestřih

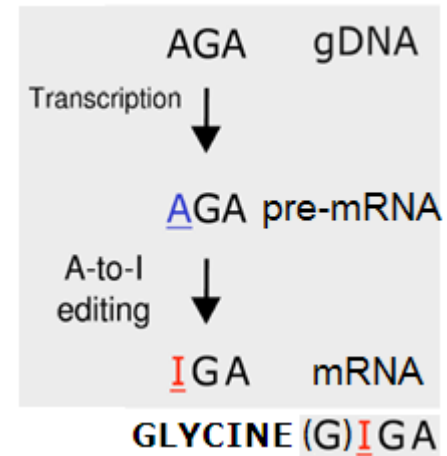


RNA editace

CtoU - cytidinová deaminace
AtoI - adenosinová deaminace



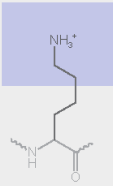
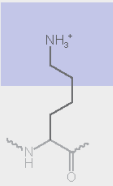
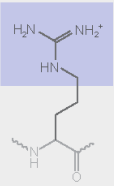
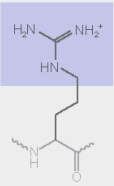
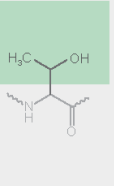
ARGININE AGA



Genetické variace

malého rozsahu

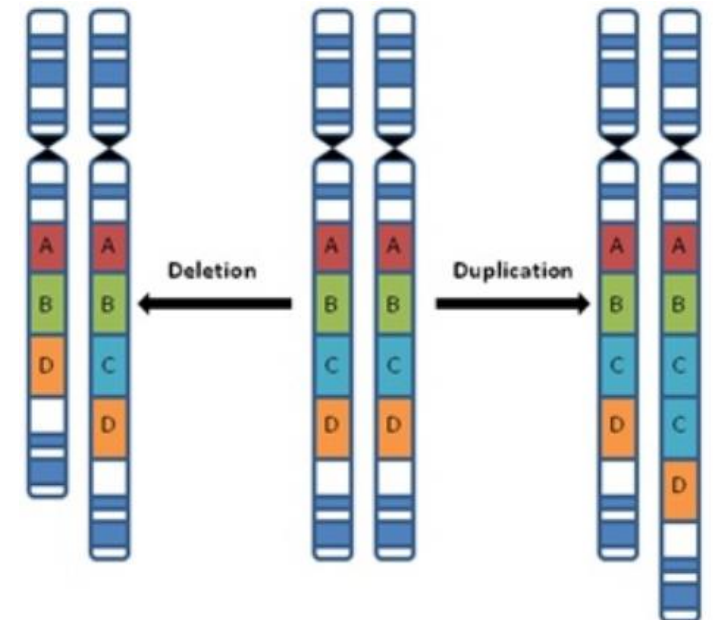
- * jednonukleotidové záměny
SNP – single nucleotide polymorphism
- * vícebodové změny nukleotidů
indels in=insertce del=delece

	Point mutations				
	No mutation	Silent	Nonsense	Missense	
				conservative	non-conservative
DNA level	TTC	TTT	ATC	TCC	TGC
mRNA level	AAG	AAA	UAG	AGG	ACG
protein level	Lys	Lys	STOP	Arg	Thr
					

■ basic
■ polar

velkého rozsahu

- * více jak 1kb insertce/delece
- * zdvojování/opakování oblasti uvnitř chromozómu
CNV – copy number variation
- * zpřeházení celých částí na chromozómu
- * duplikace chromozómů

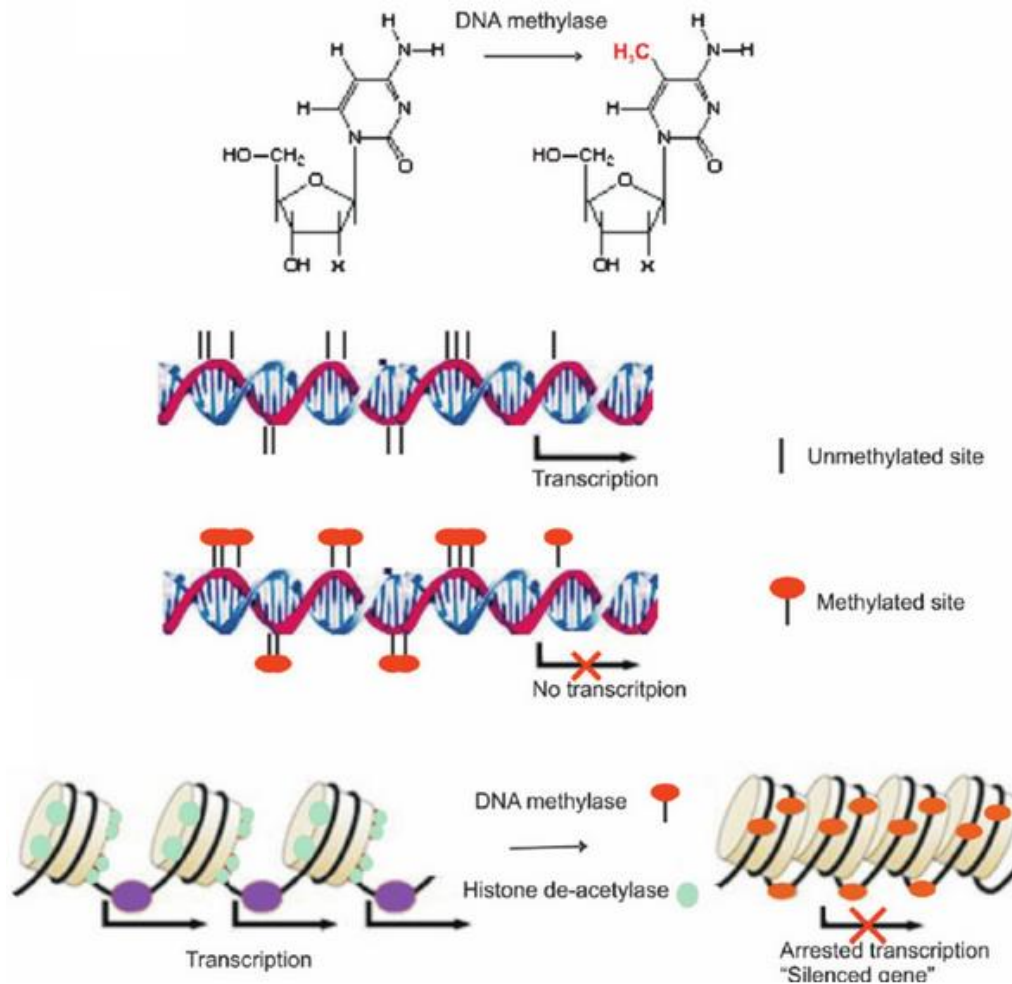


Epigenetika

Změny v expresi genů a výsledném fenotypu mohou být způsobeny i jinými mechanismy než jen variací v DNA.

* DNA metylace

* modifikace histonů



Neurologická onemocnění s významnou složkou dědičnosti

neurodevelopmentální

Těžké dopady na celkový stav pacienta

Velké změny v CNS na mnoha úrovních

Časný (okamžitý) nástup v postnatálním vývoji

Zatím farmakologicky prakticky neovlivnitelné

ASD autism spectrum disorder

ID intellectual disability

ADHD attention deficit hyperactivity disorder

EPI epilepsy (některé vrozené formy)

neuropsychiatrická

Mírnější (některé) projevy onemocnění

Nástup v pubertě či dalších fázích života

Environmentální faktory ovlivňující vznik a průběh onemocnění

Farmakoterapie, vývoj a testování nových látek

SCH schizophrenia

MD mood disorder

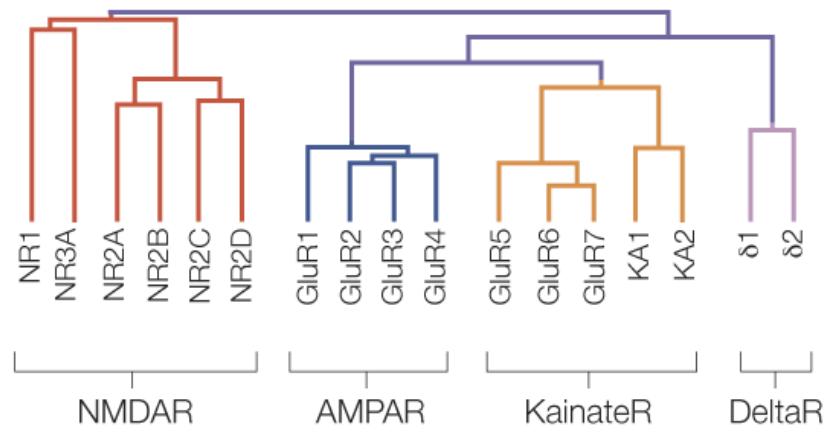
deprese, psychotické stavy

Geny/podjednotky ionotropních glutamátových receptorů

TABLE 1
Glutamate receptor subunits

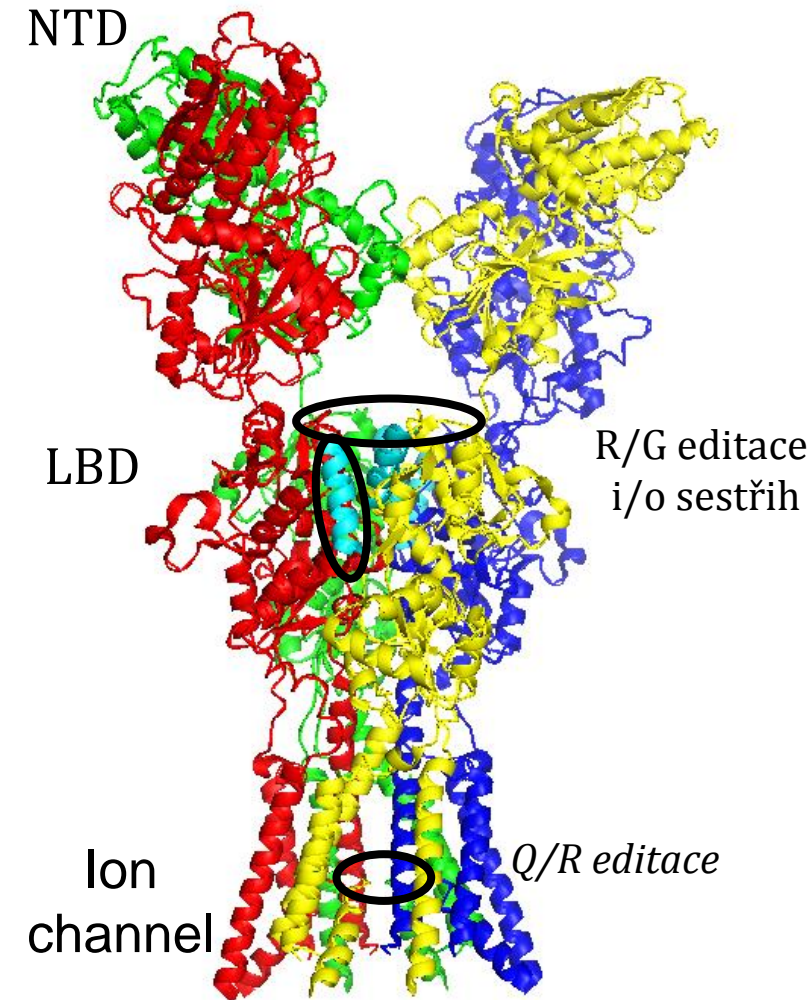
Nonhuman genes are represented by lowercase HUGO symbols (e.g., Gria1).

IUPHAR Name	HUGO Symbol	Common Names	Human Chromosome	Amino Acids in Longest Splice Variant
GluA1	GRIA1	GluR1, GluRA	5q31.1	906
GluA2	GRIA2	GluR2, GluRB	4q32-q33	901
GluA3	GRIA3	GluR3, GluRC	Xq25-q26	894
GluA4	GRIA4	GluR4, GluRD	11q22	902
GluK1	GRIK1	GluR5	21q22.11	918
GluK2	GRIK2	GluR6	6q16.3-q21	908
GluK3	GRIK3	GluR7	1p34-p33	919
GluK4	GRIK4	KA1	11q22.3	956
GluK5	GRIK5	KA2	19q13.2	981
GluN1	GRIN1	NMDAR1, NR1, GluR ξ 1	9q34.3	938
GluN2A	GRIN2A	NMDAR2A, NR2A, GluR ϵ 1	16p13.2	1464
GluN2B	GRIN2B	NMDAR2B, NR2B, GluR ϵ 2	12p12	1484
GluN2C	GRIN2C	NMDAR2C, NR2C, GluR ϵ 3	17q25	1236
GluN2D	GRIN2D	NMDAR2D, NR2D, GluR ϵ 4	19q13.1-qter	1336
GluN3A	GRIN3A	NR3A	9q31.1	1115
GluN3B	GRIN3B	NR3B	19p13.3	1043
GluD1	GRID1	δ 1, GluR delta-1	10q22	1009
GluD2	GRID2	δ 2, GluR delta-2	4q22	1007

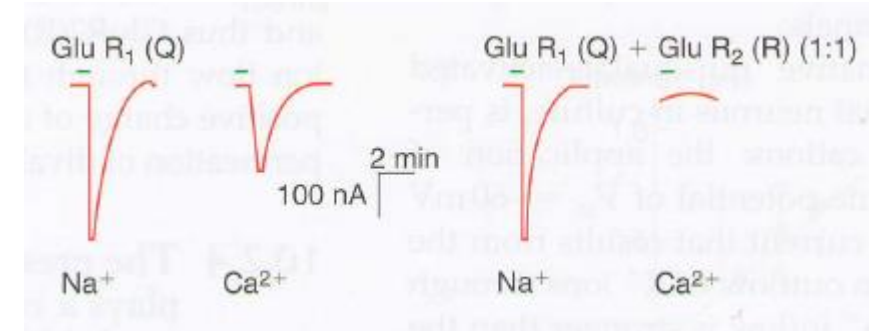


GluN1-3 GluA1-4 GluK1-5 GluD1,2

AMPA podjednotky ionotropních glutamátových receptorů



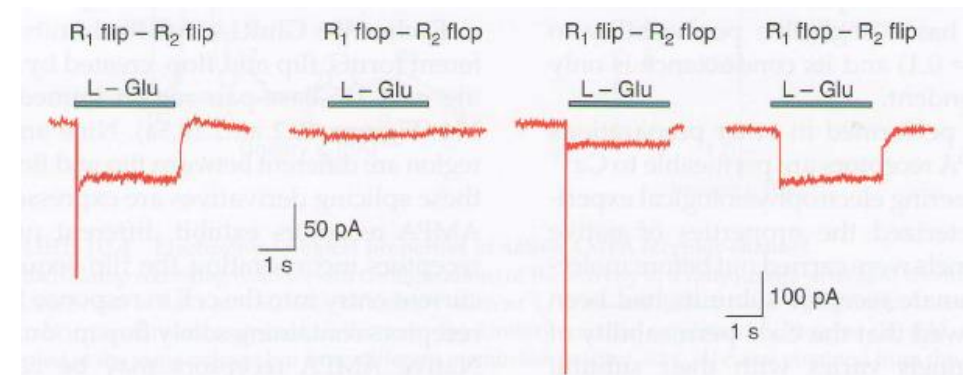
	<i>splicing</i>	<i>editing</i>	
GluA1	flip/flop	R	Q
GluA2	flip/flop	R/G	Q/R*
GluA3	flip/flop	R/G	Q
GluA4	flip/flop	R/G	Q
			* 99%



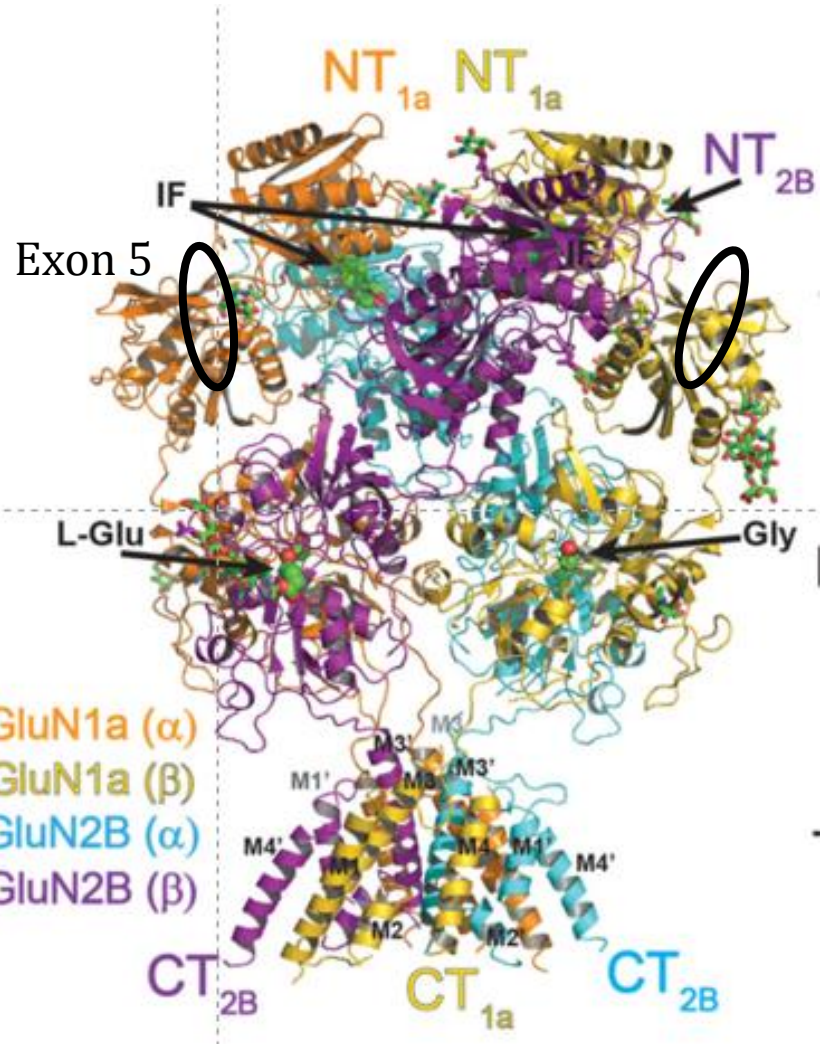
Q/R editace - Ca²⁺ permeabilita

R/G editace - kinetika desensitizace

i/o sestřih - flop desensitizuje rychleji než flip

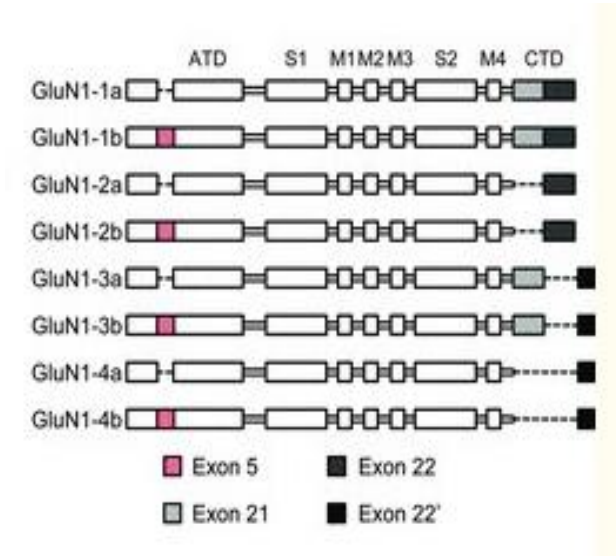


NMDA podjednotky ionotropních glutamátových receptorů

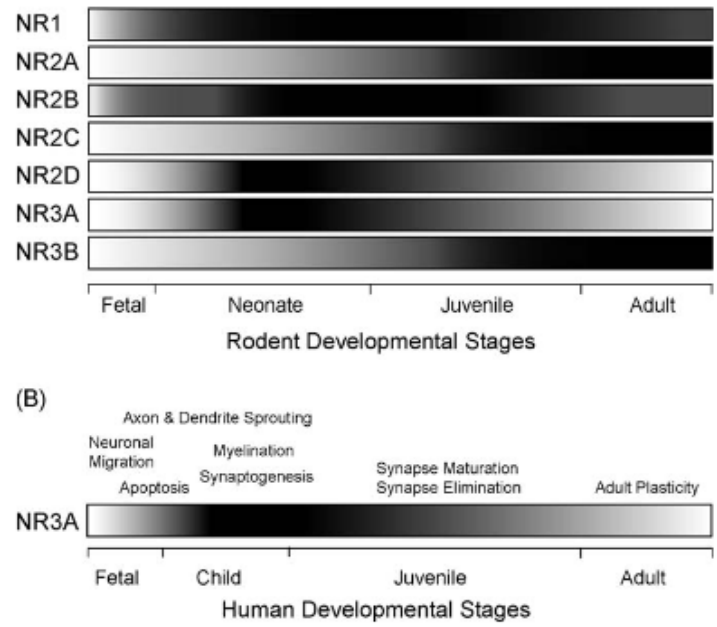


GluN1
GluN2A - D
GluN3A-B

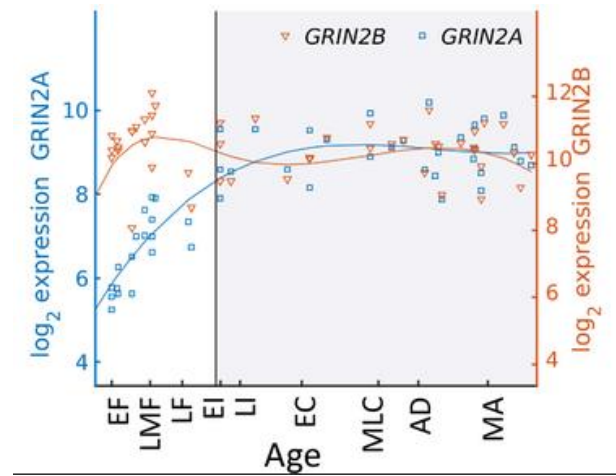
GluN1 – alternativní sestřih



GluN2A/B a 3A/B
 vývojem podmíněná exprese

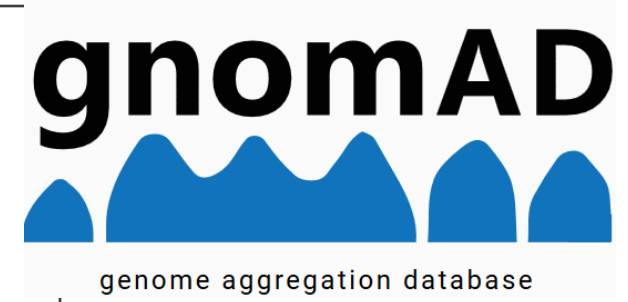
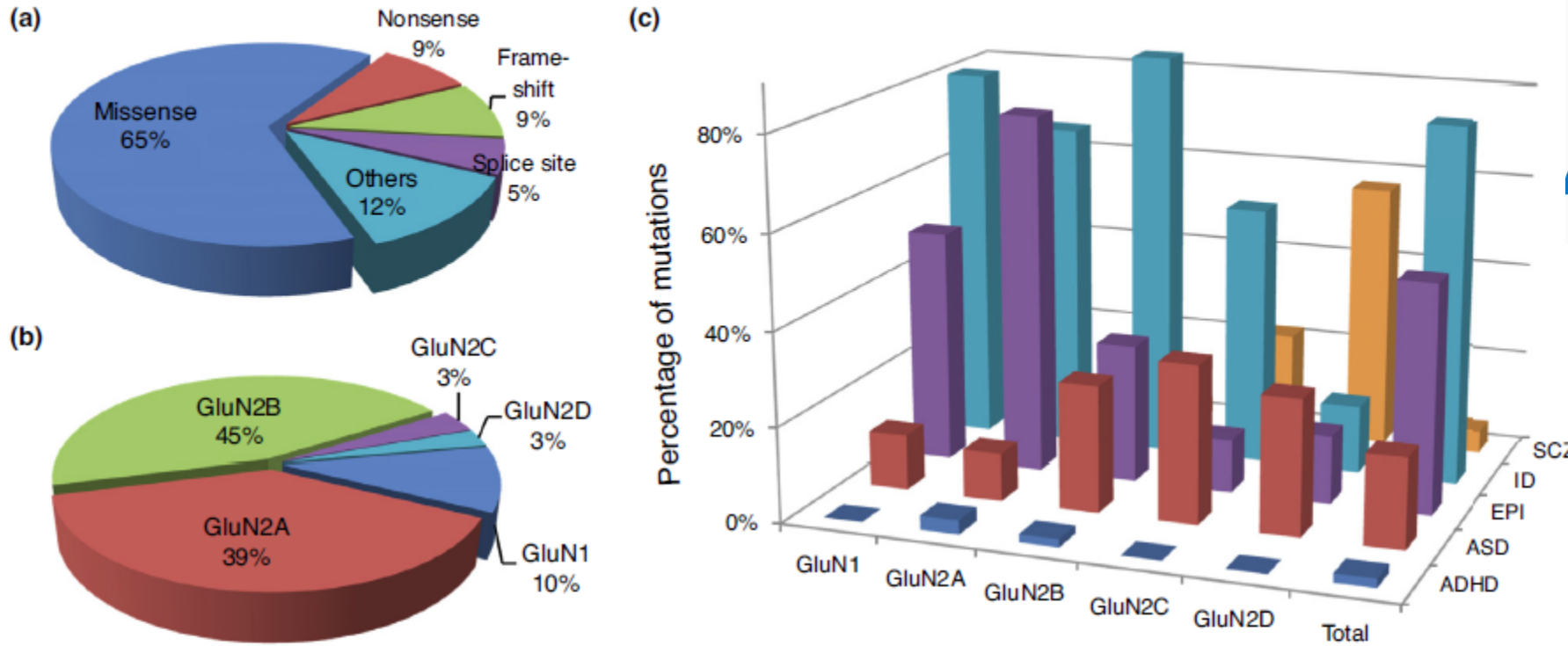


Expresse GluN2/B hipokampus



C-konec

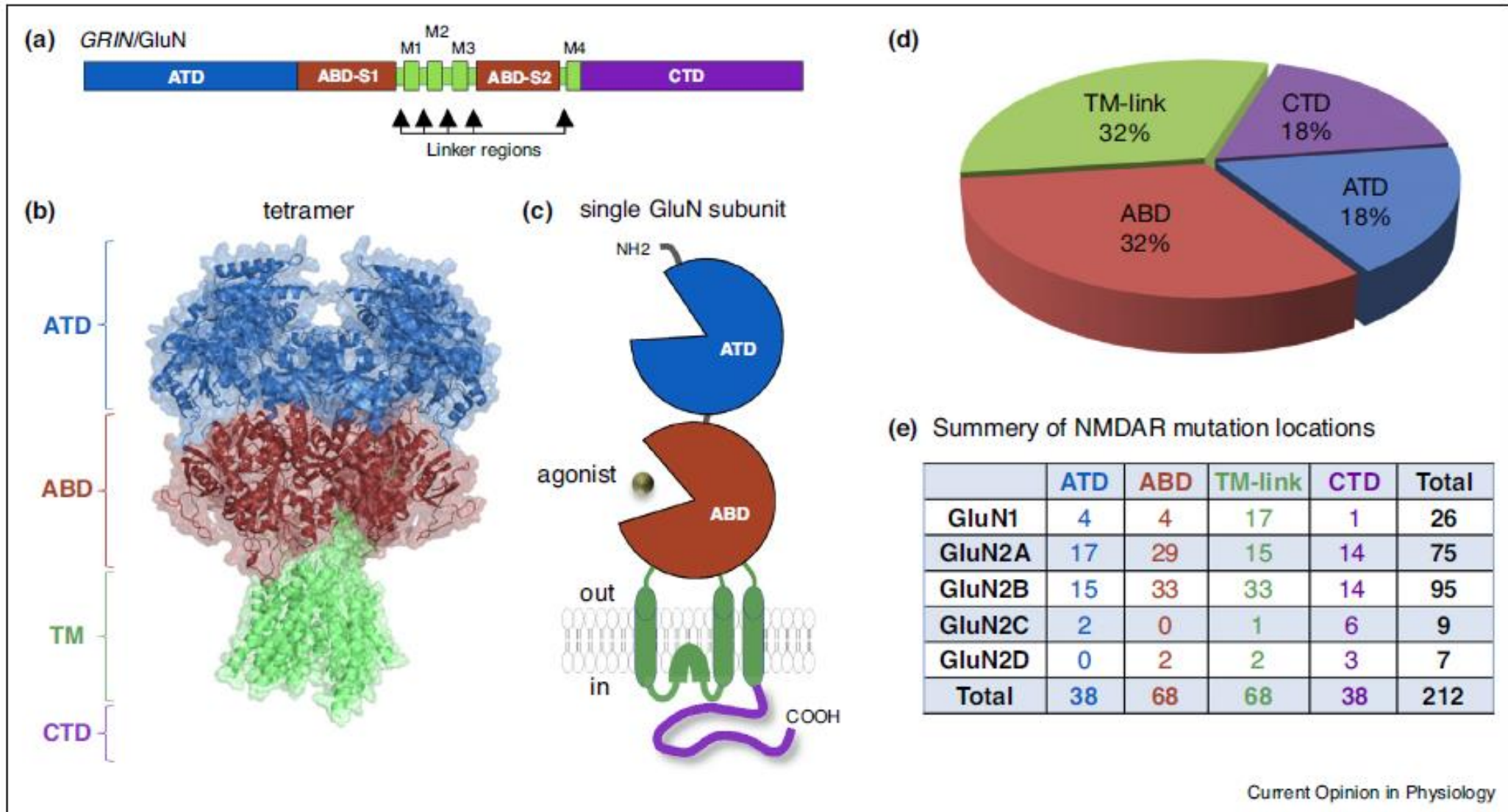
Genetické změny NMDAR a neurologická onemocnění



(d) Summary of NMDAR mutations identified in patients with neurological diseases

	Missense	Nonsense	Frame-shift	Splice site	Others	Total	ADHD	ASD	EPI	ID	SCZ
GluN1	24	1	1	0	0	26	0	3	13	21	1
GluN2A	56	10	9	7	18	100	3	10	78	70	2
GluN2B	75	11	9	7	14	116	2	31	34	101	4
GluN2C	5	0	4	0	0	9	0	3	1	5	2
GluN2D	7	0	0	0	0	7	0	2	1	1	4
Total	167	22	23	14	32	258	5	49	127	198	13

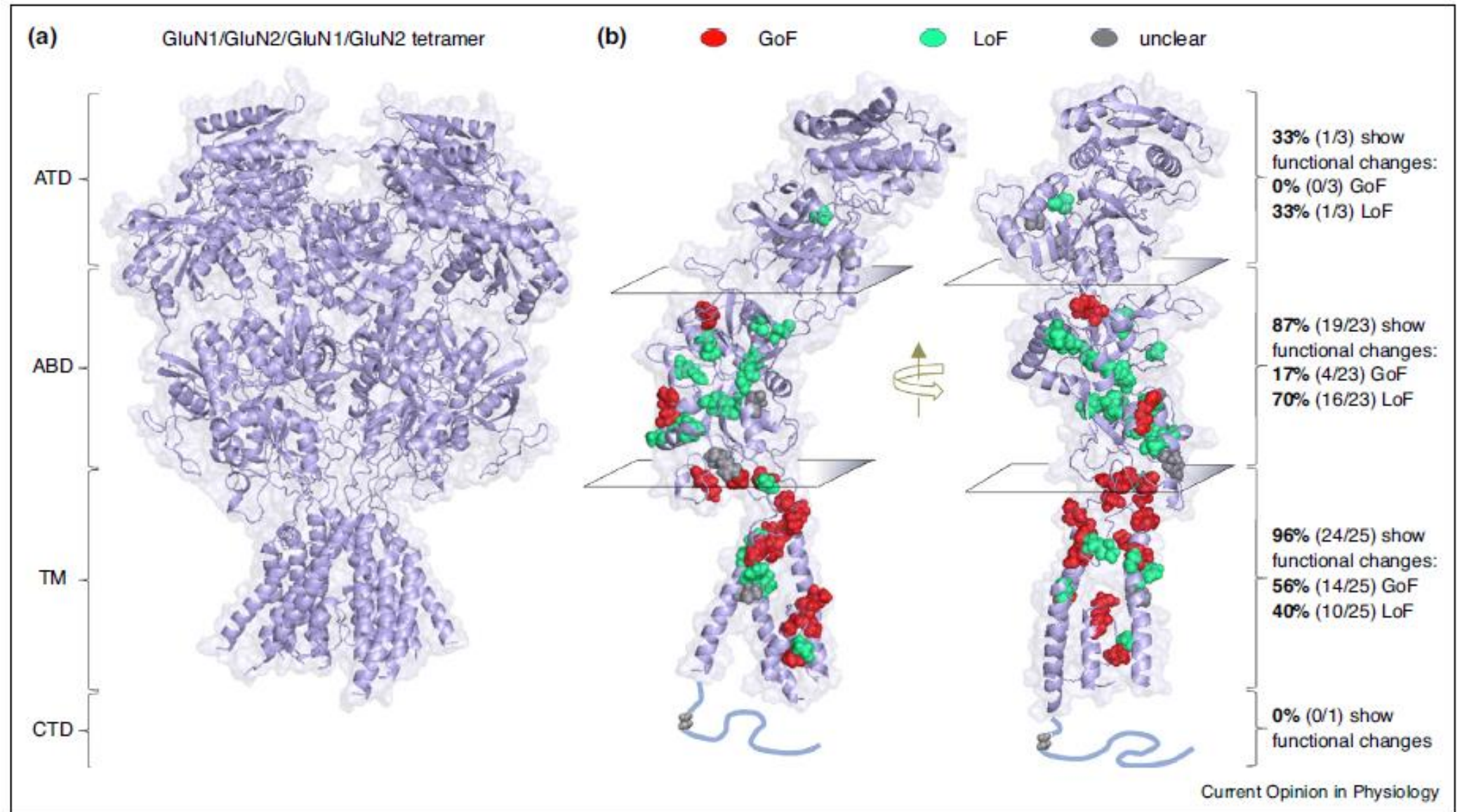
Genetické změny NMDAR a neurologická onemocnění



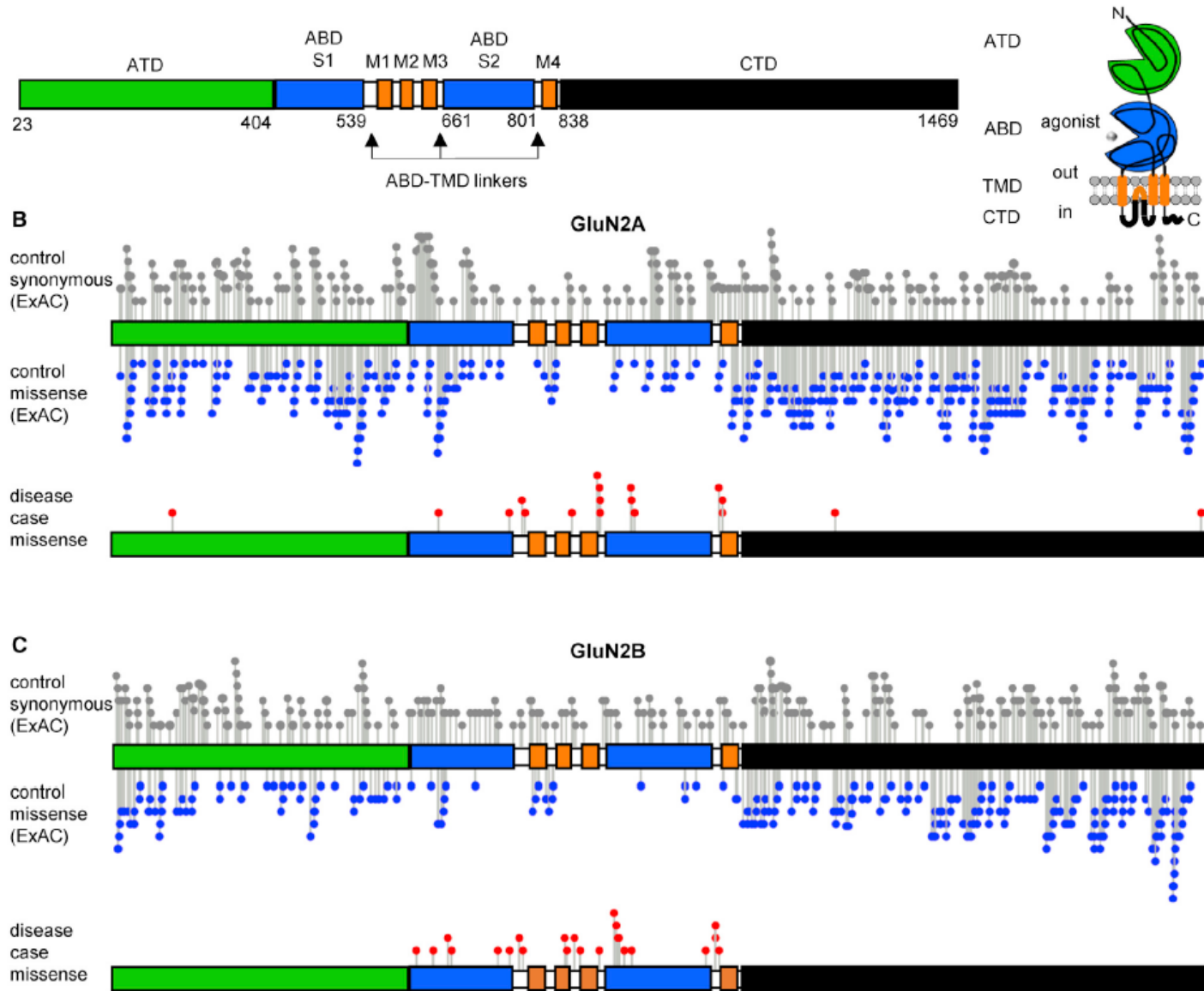
Genetické změny NMDAR a neurologická onemocnění

GoF
gain of function

LoF
loss of function



Genetické změny NMDAR a neurologická onemocnění



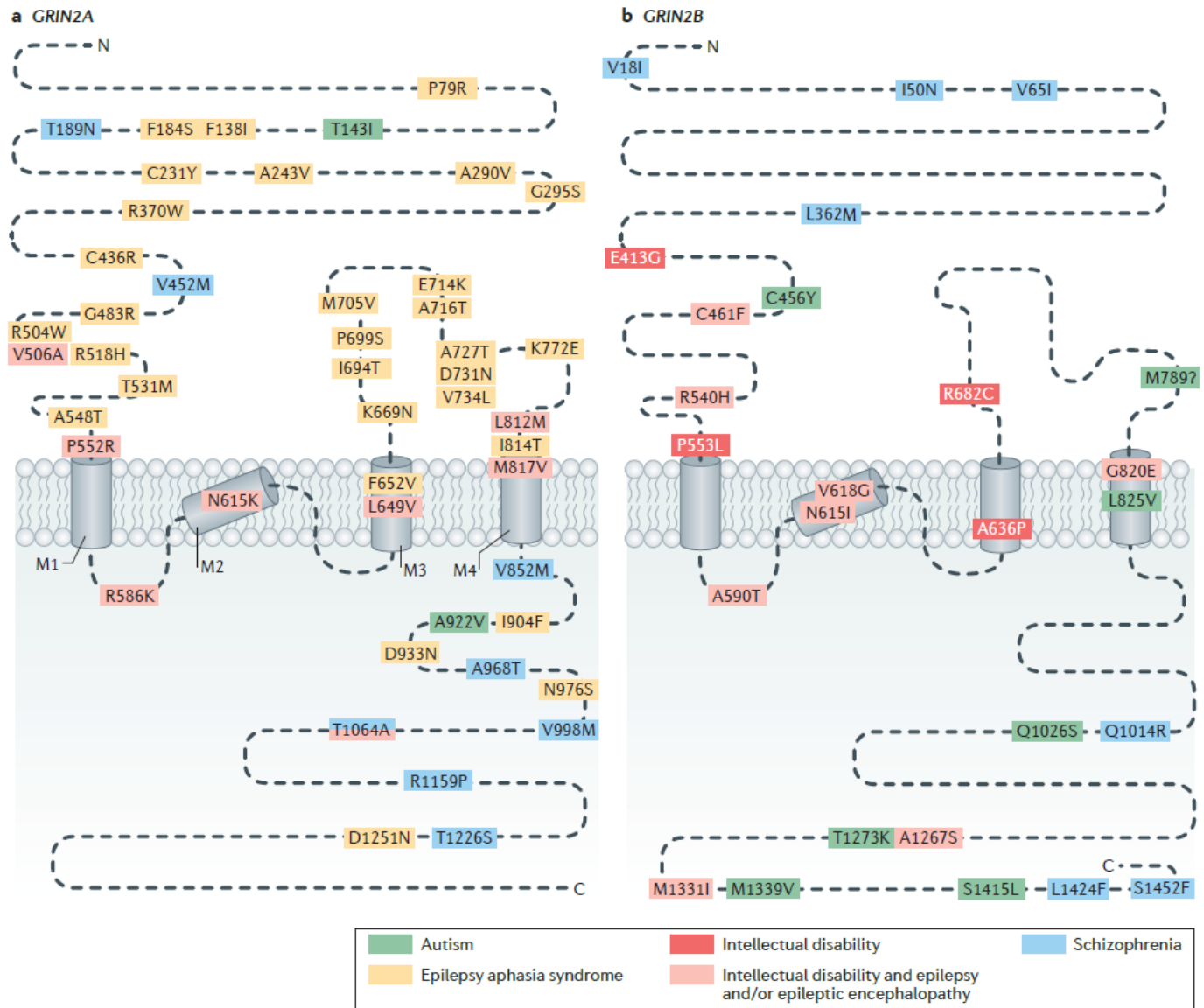
Synonymní mutace

Nesynonymní mutace (měnící AK)

Mutace spojená s onemocněním

Figure 1. Genetic Variation across Functional Domains of GluN2A and GluN2B

Genetické změny NMDAR a neurologická onemocnění



Určitý typ onemocnění, či závažnost jeho projevů souvisí s pozicí mutace a dané podjednotce NMDAR

EPILEPSIE = GluN2A

SCHIZOFRENIE = NTD+C-TERM

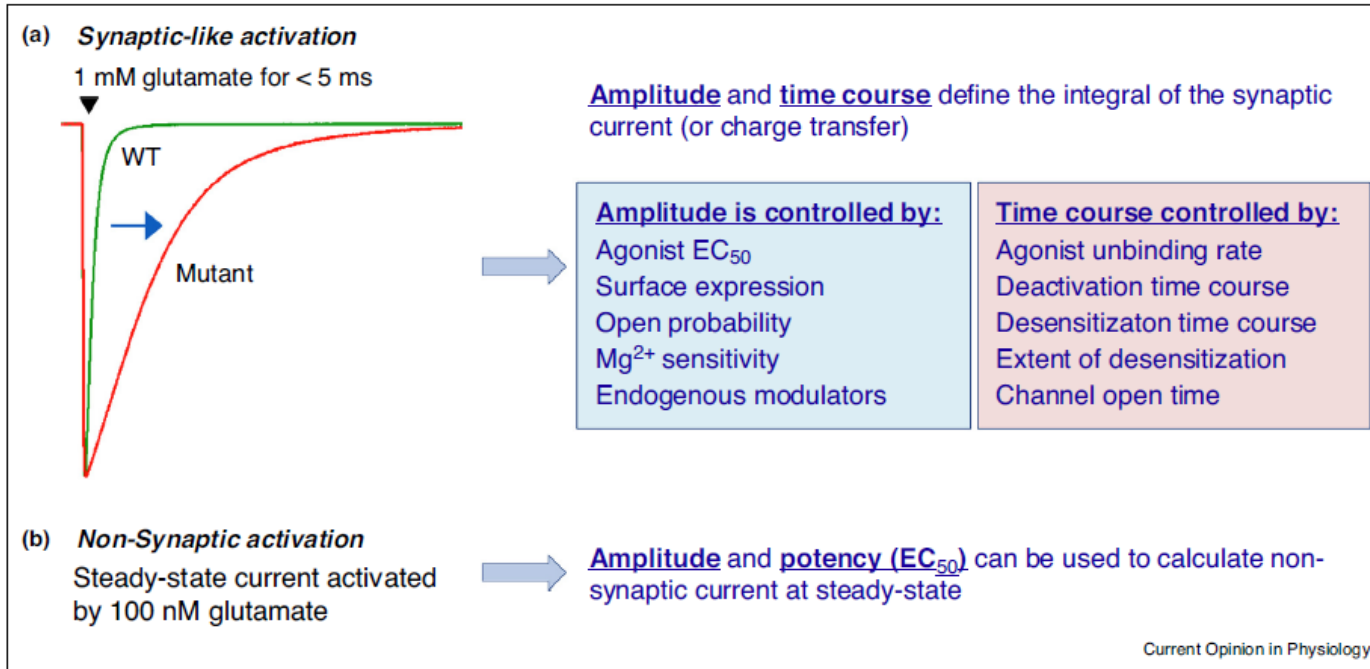
SNÍŽENÝ INTELEKT = LBD+TMD

AUTISMUS = náhodná pozice, převážně GluN2B?

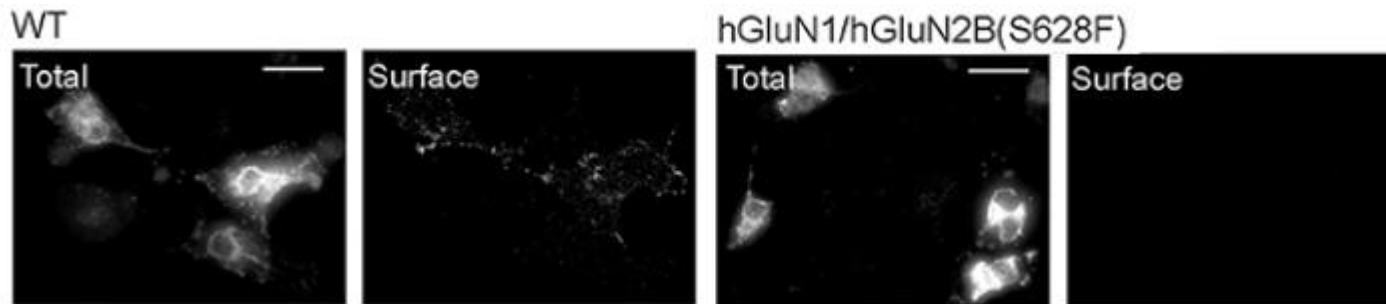
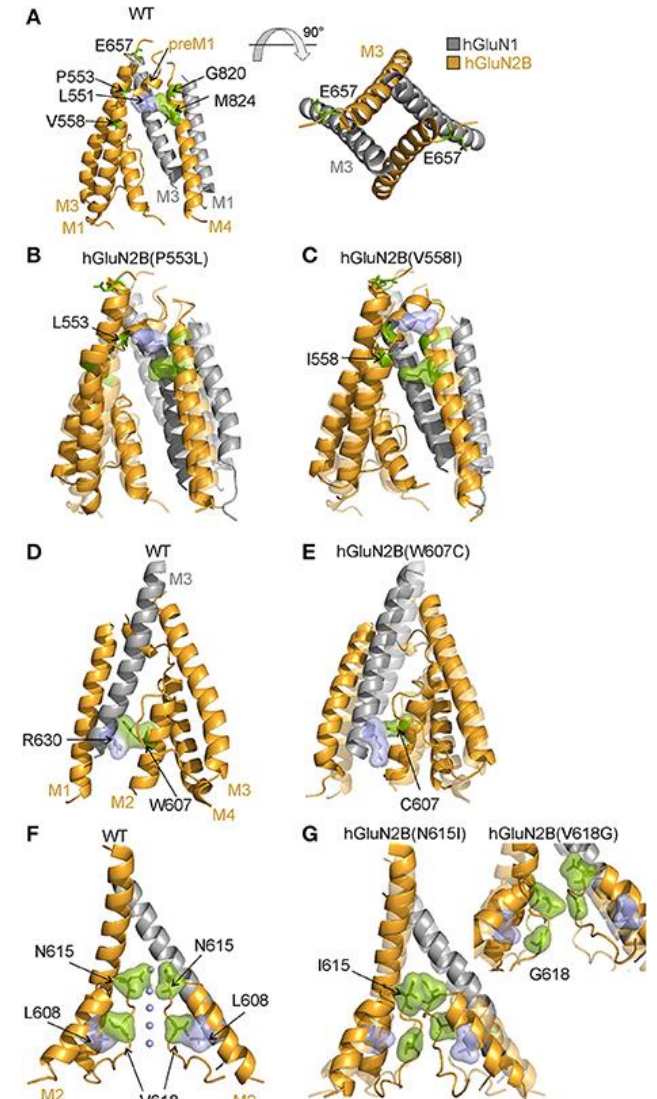
Genetické změny NMDAR a neurologická onemocnění

princip analýzy mutace

Přímá funkční analýza
(elektrofyzologie/biochemie)



Strukturní biologie a
in silico analýza
(molekulární dynamika)

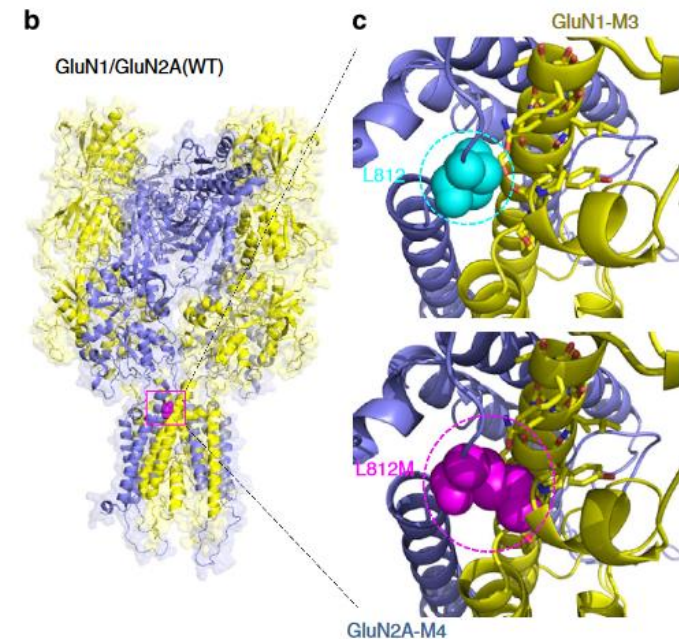
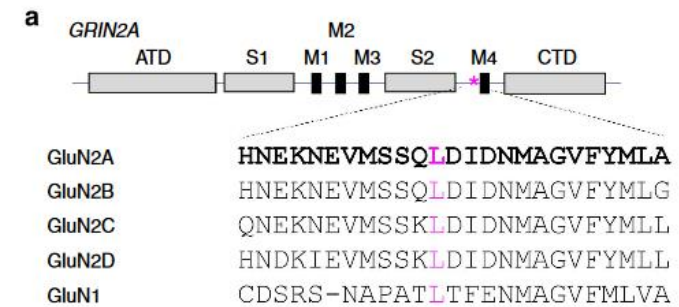
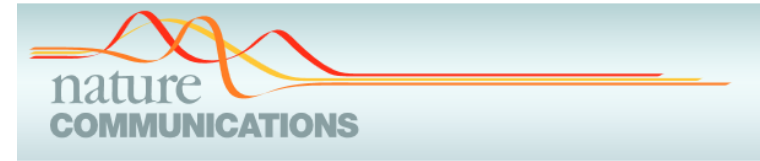


GluN2A L812M - příklad „case study“

Functional analysis of a *de novo* GRIN2A missense mutation associated with early-onset epileptic encephalopathy

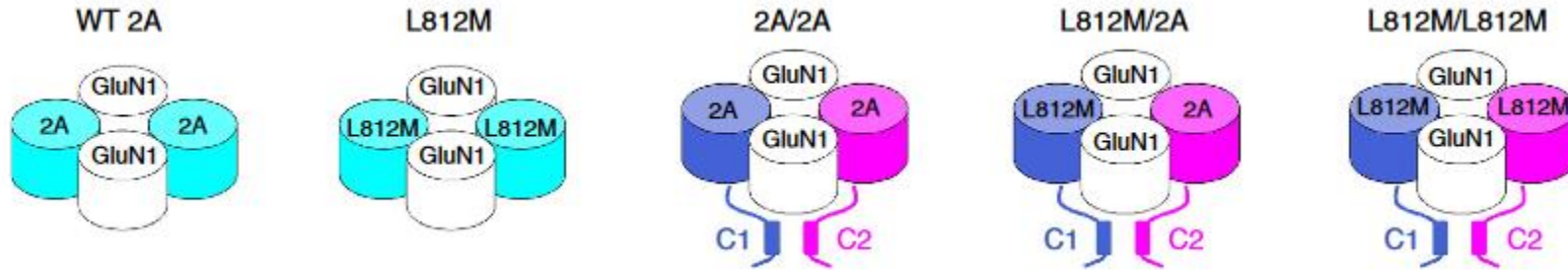
Hongjie Yuan¹, Kasper B. Hansen¹, Jing Zhang¹, Tyler Mark Pierson^{2,3}, Thomas C. Markello³, Karin V. Fuentes Fajardo³, Conisha M. Holloman³, Gretchen Golas³, David R. Adams³, Cornelius F. Boerkoel³, William A. Gahl³ & Stephen F. Traynelis¹

Analýza *de novo* mutace nalezené u pacienta s časným nástupem epilepsie spojené s celkovou poruchou vývoje



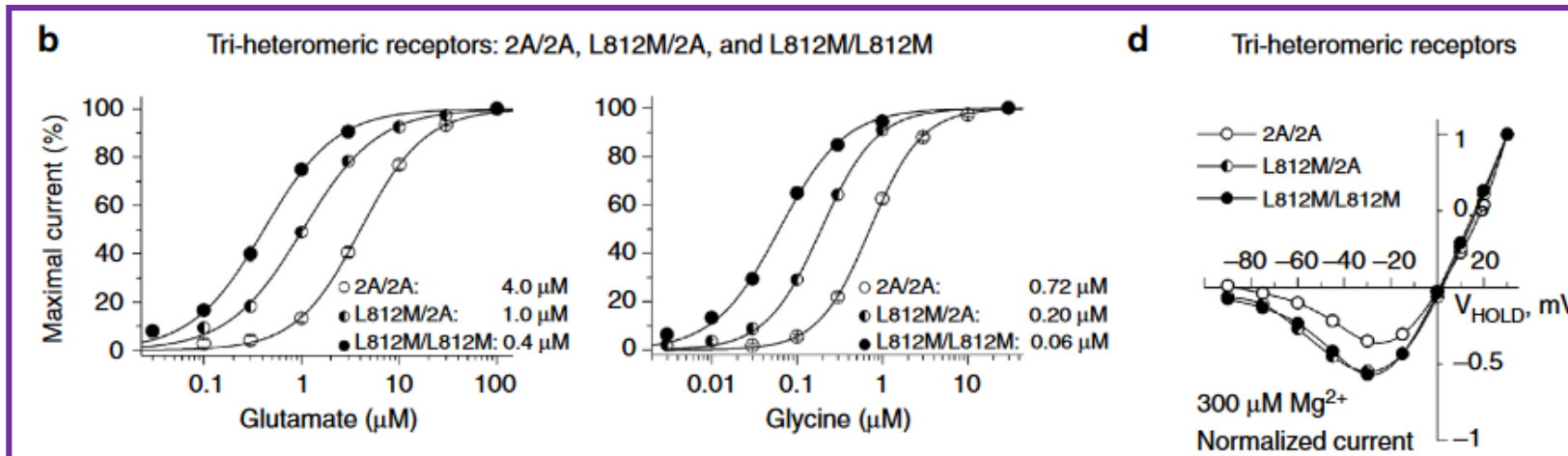
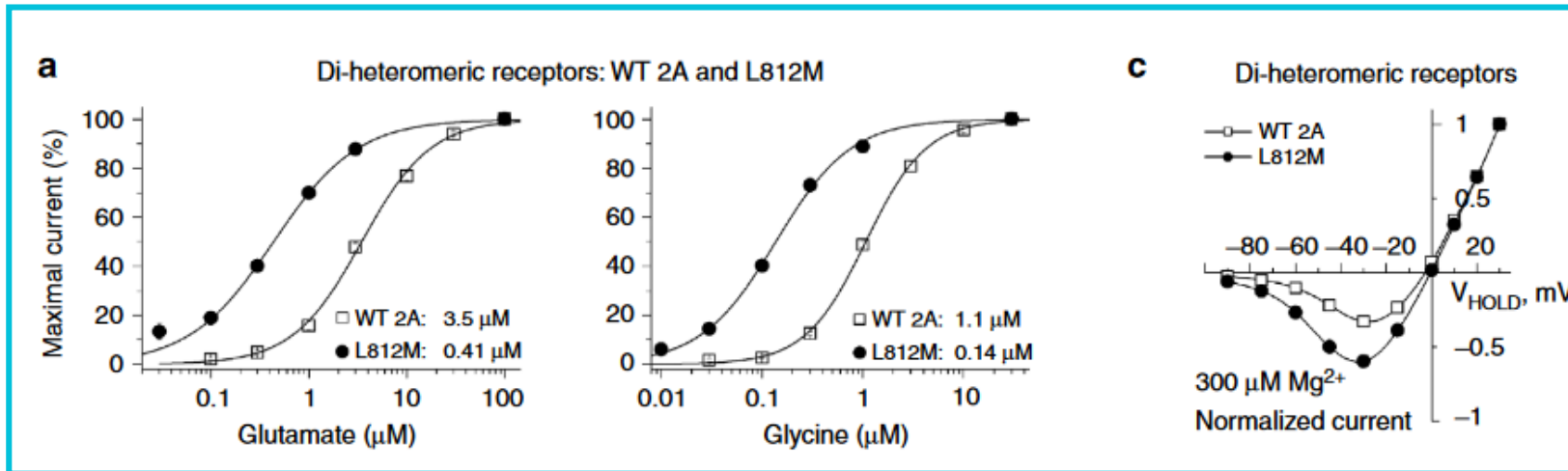
GluN2A L812M - příklad „case study“

Diheteromerní
NMDAR



Triheteromerní
NMDAR

Křivky závislosti
proudové odpovědi
na koncentraci
agonisty

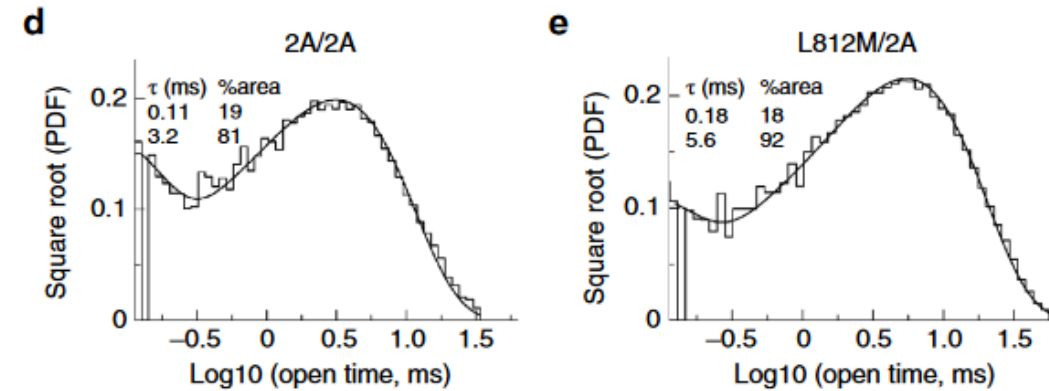
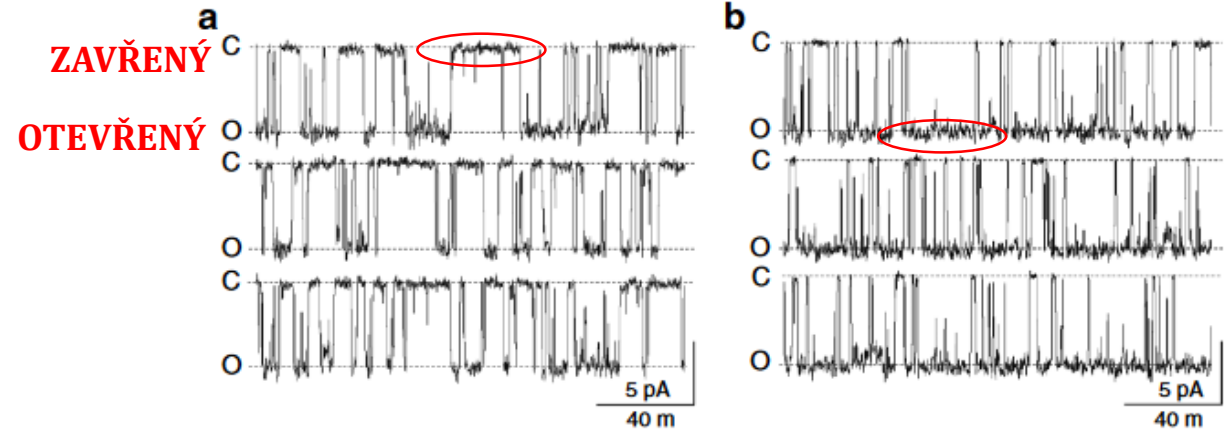
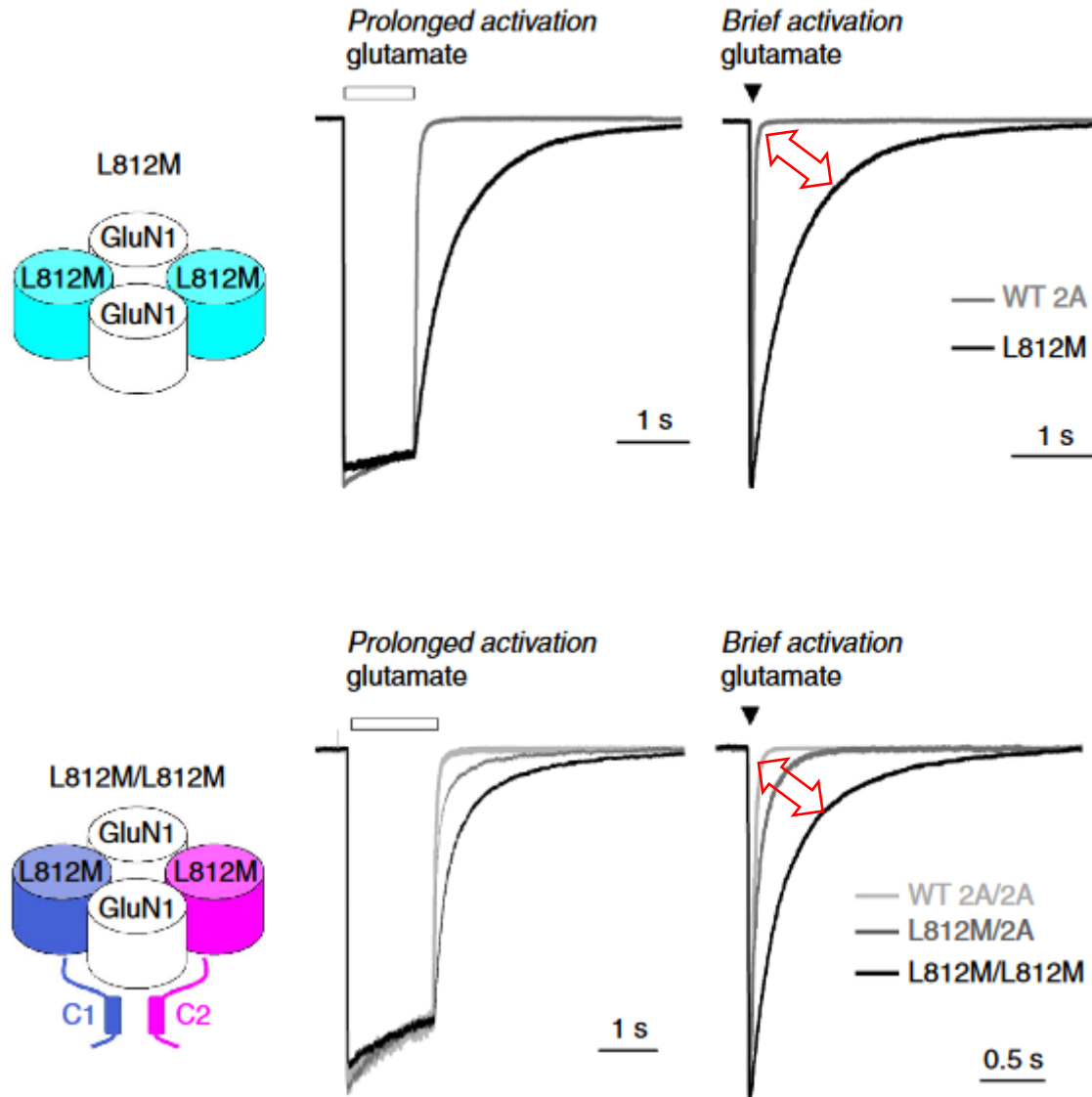


Křivky vztahu mezi
napětím a proudem
(za přítomnosti Mg^{2+})

GluN2A L812M - příklad „case study“

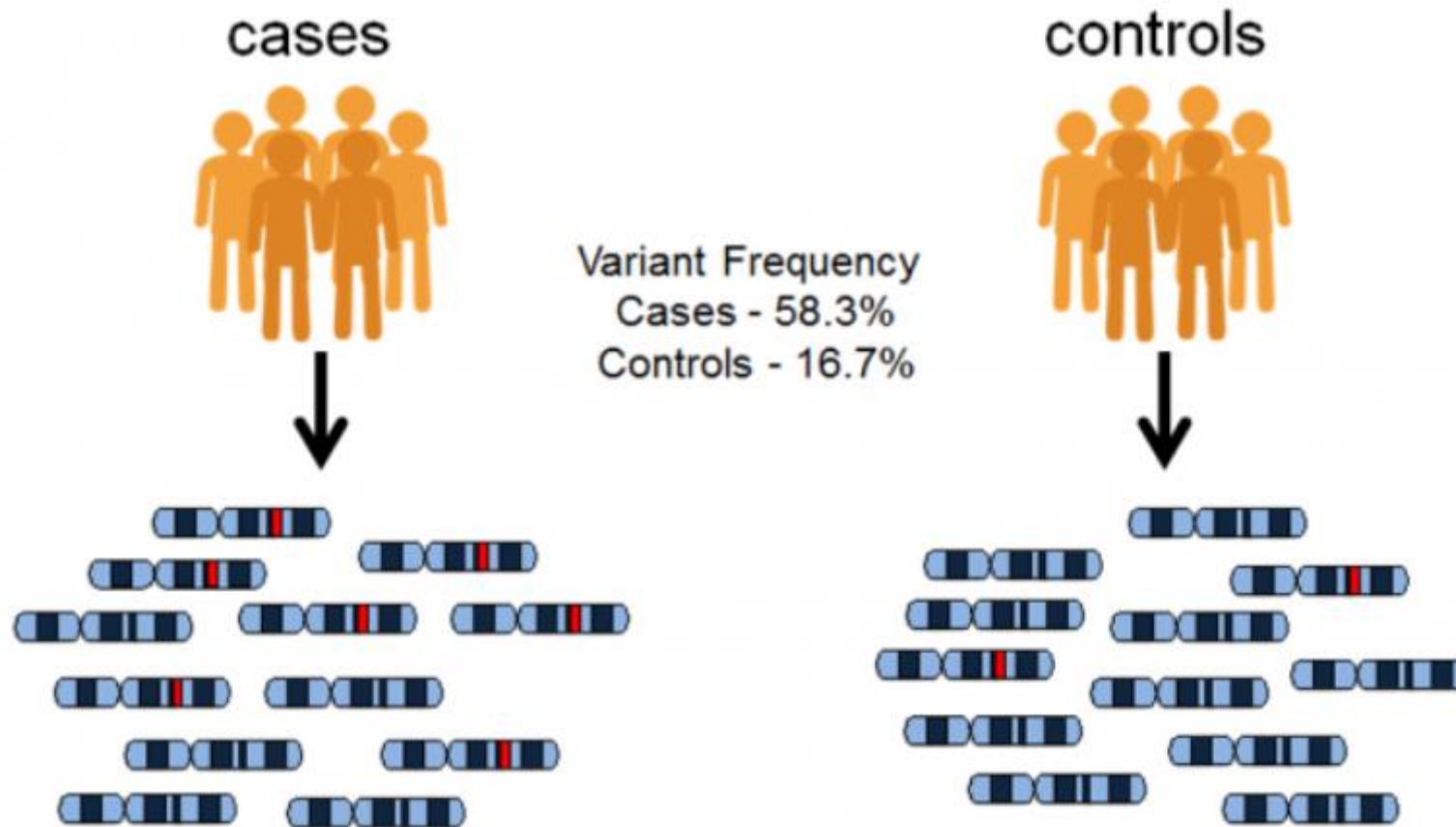
Dlouhý „extrasynaptický“ a krátký „synapsi napodobující“ pulz glutamátu

Změny vlastností jednotlivých kanálů – doba otevření



GWAS – genome wide association study

Studie zaměřená na hledání genetických variant, které by bylo možno spojit s přítomností daného fenotypu či onemocnění. Je založena na sekvenační analýze celého genomu či jeho částí, porovnání dat s kohortou nezasažených osob a následným propojením výsledků s konkrétními skupinami pacientů či daným onemocněním. Výsledkem (alespoň u neurologických onemocnění) zpravidla bývá skupina tzv. risk faktorů, celých alel nebo určitých variant které jsou daleko častěji zastoupeny u postižených osob



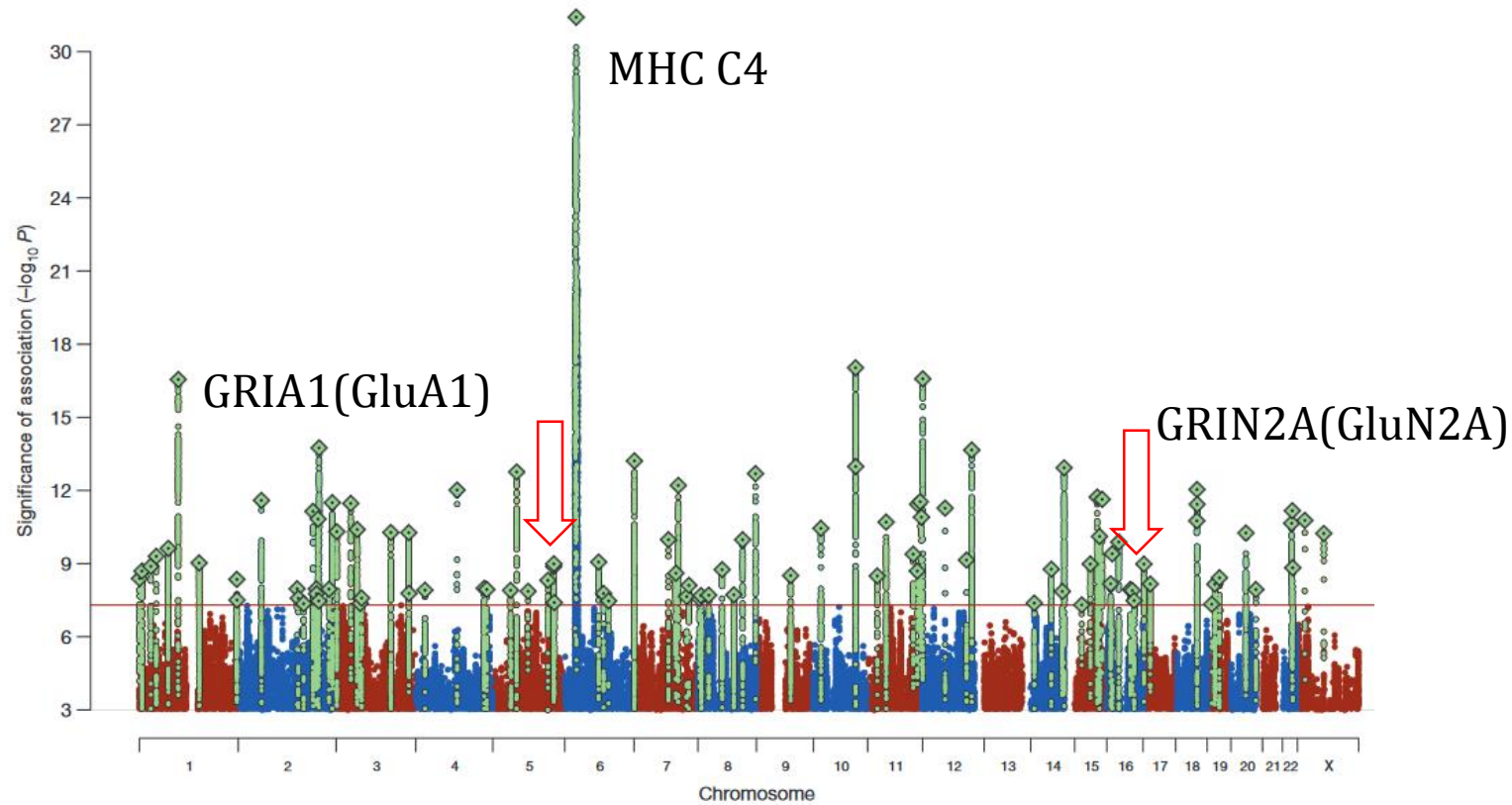
GWAS – genome wide association study – příklad schizofrenie

Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci



Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium*

Schizophrenia is a highly heritable disorder. Genetic risk is conferred by a large number of alleles, including common alleles of small effect that might be detected by genome-wide association studies. Here we report a multi-stage schizophrenia genome-wide association study of up to 36,989 cases and 113,075 controls. We identify 128 independent associations spanning 108 conservatively defined loci that meet genome-wide significance, 83 of which have not been previously reported. Associations were enriched among genes expressed in brain, providing biological plausibility for



40 000 pacientů/ 113 000 ctrl

Prezentace dat pomocí
Manhattan plot

Schizofrenie

- * Závažné neuropsychiatrické onemocnění postihuje až 1% populace na celém světě
- * Nástup během dospívání
- * Opětné návraty/zhoršení stavu onemocnění
- * Pozitivní / negativní symptomy, kognitivní defekty - halucinace, disorganizace řeči, ztráta motivace, snížení intelektuálních funkcí, poruchy paměti, pozměněná sociální kognice
- * Kratší délka života - kardiovaskulární onemocnění, sebevražedné tendence

Vznik a rozvoj:

Multifaktoriální onemocnění - genetická predispozice a environmentální podněty

Vysoká míra dědičnosti

Environmentální podněty aktivující genetickou predispozici (rychlost urbanizace, prenatální rizika – infekční onemocnění, psychiatrické trauma v pubertě, užívání drog)

Stovky rizikových alel / genů / variant

Hlavní hypotézy:

i / vysoká produkce dopaminu

ii / NMDAR hypofunkce a změněná excitační signalizace

iii / celkové defekty během vývoje neuronů a jejich propojení



Glutamatergní hypotéza vzniku schizofrenie – „NMDAR gene complex“

Glutamatergní hypotéza - hypofunkce NMDAR

- i/ nekompetitivní antagonisté fencyklidin, ketamin, MK-801 – funkční blok NMDA receptorů a následná indukce chování podobného projevům SCH
- ii/ genetický model *GriN1* neo *-/-* myši exprimujících *GluN1* jen na 5% úrovni oproti wild type způsobuje chování podobného projevům SCH

Excitační synapse – jejich organizace/morfologie/počet

Nárůst de novo mutací u genu excitačního NMDAR komplexu

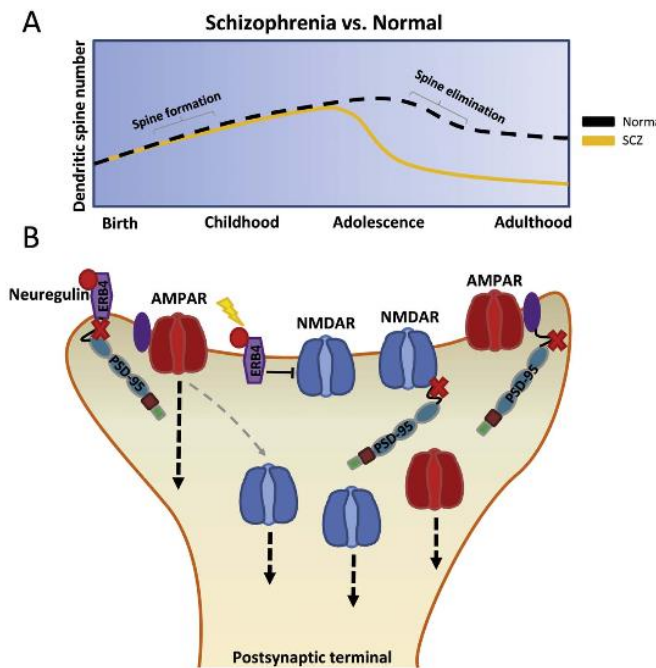
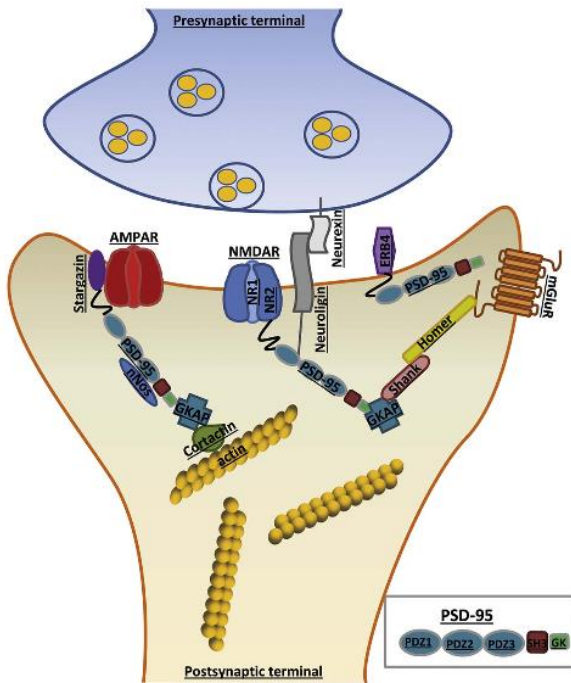


Table 3 | Enrichment of *de novo* mutations in postsynaptic protein complexes

Gene set	Genes (N)	P	Current study		Schizophrenia (ref. 14)		Schizophrenia (ref. 13)		Schizophrenia all (refs 12–14)				
			No. mut.	O/E	P	No. mut.	O/E	P	P	P	P		
Postsynaptic density	681	0.019	34	1.46	0.091	6	1.92	0.84	0.45	0.65	0.64	0.091	0.12
ARC complex	28	0.00048	6	6.06	0.005	2	17.42	1	1	1	1	0.0035	0.015
NMDAR complex	60	0.025	6	2.74	0.035	2	6.99	1	1	0.13	0.086	0.016	0.011

Statistical significance for enrichment of *de novo* mutations in all alternative postsynaptic gene sets: Nominally significant P values ($P < 0.05$) are indicated.

Genetické změny NMDAR u schizofrenie

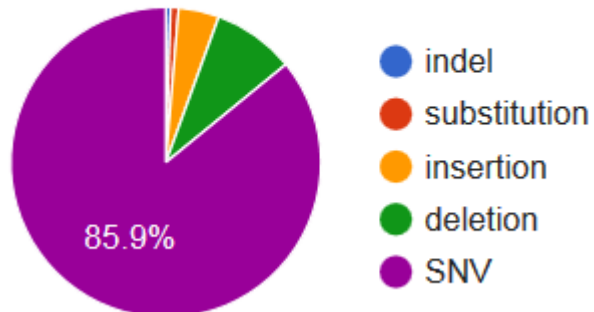
NÚDZ (prof. Jiří Horáček) - pečlivě definovaná kohorta 64 pacientů trpících SCH (časný nástup) a odpovídajících 32 zdravých kontrolních subjektů
Genově specifické sekvenování genů (+1000) NMDAR komplexu

Analýza dat 16 genů pro iGluR s detailním pohledem na NMDAR

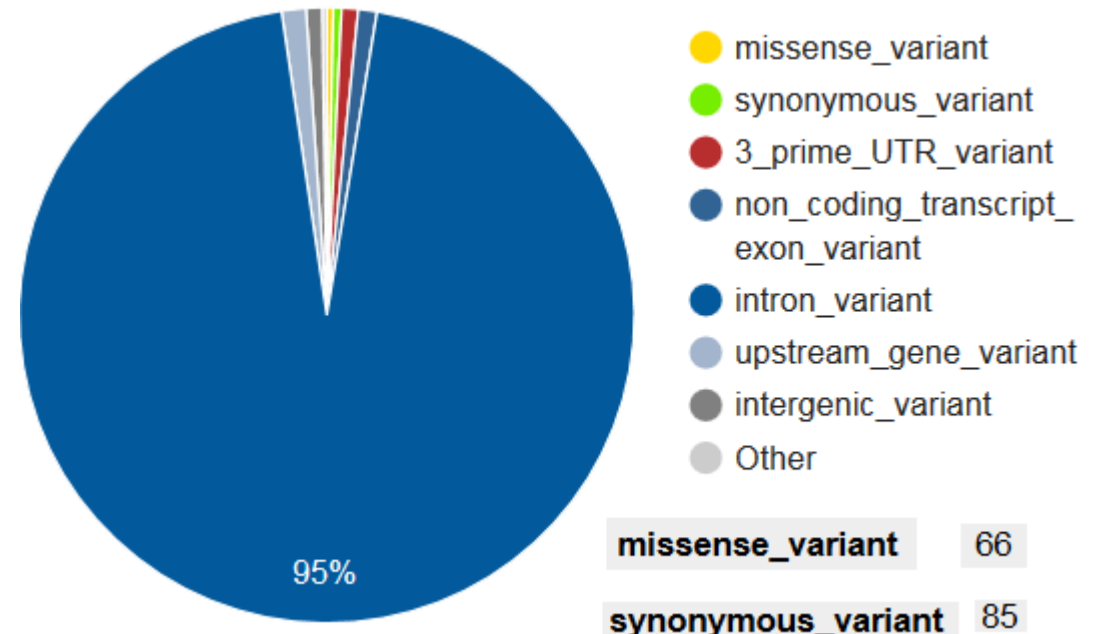
General statistics

Variants processed	19499
Novel / existing variants	1626 (8.3%) / 17873 (91.7%)

Variant classes

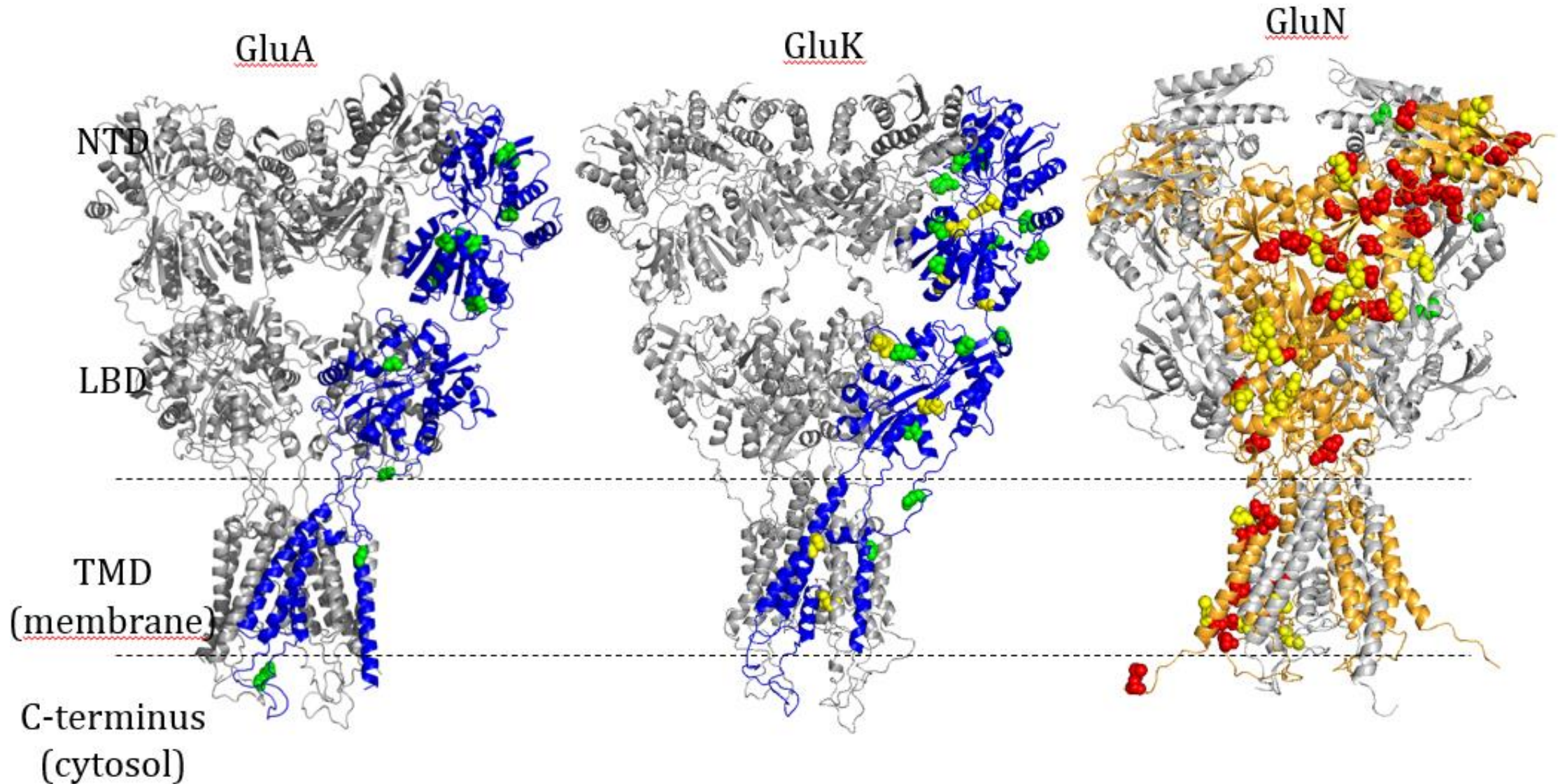


Consequences (most severe)



Genetické změny NMDAR u schizofrenie

Pozice mutací nalezených u iGluR genů



Genetické změny NMDAR u schizofrenie

Analýza dat 7 genů pro NMDAR

General statistics

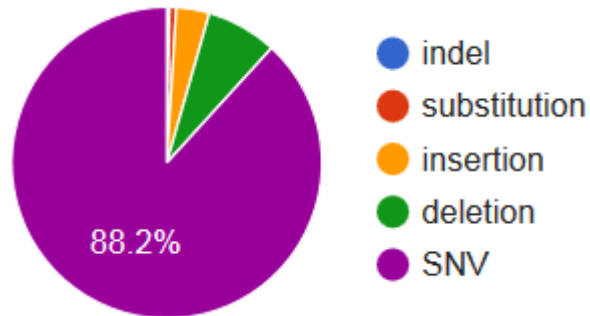
Variants processed

5903

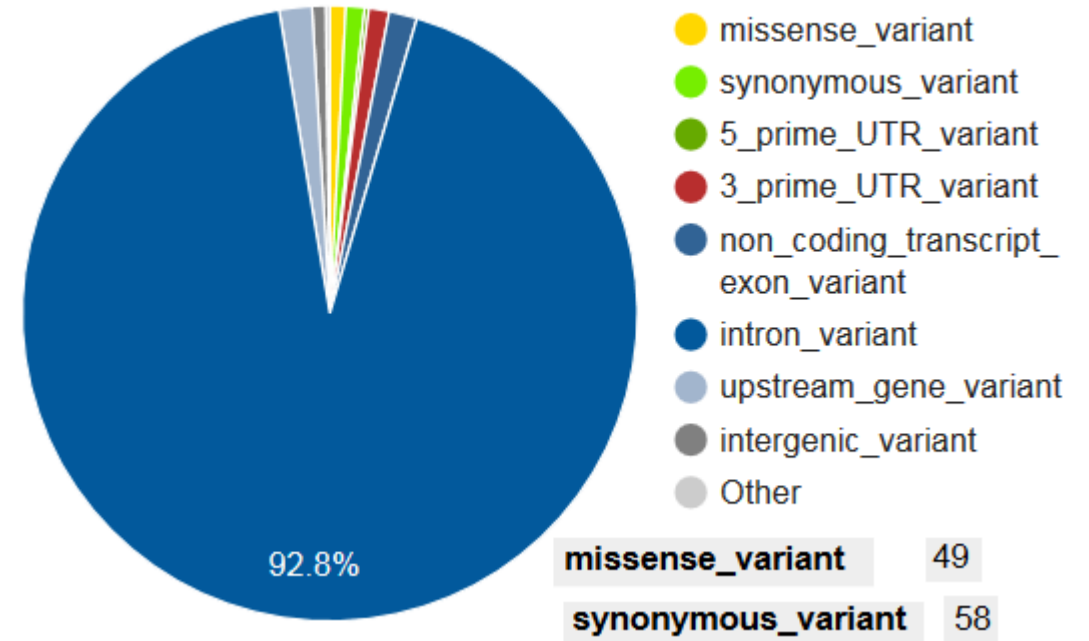
Novel / existing variants

454 (7.7%) / 5449 (92.3%)

Variant classes



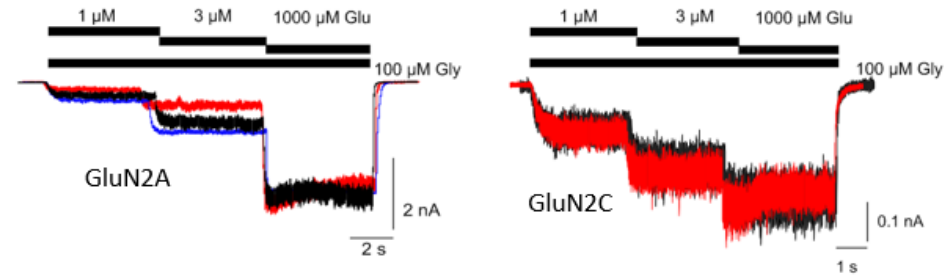
Consequences (most severe)



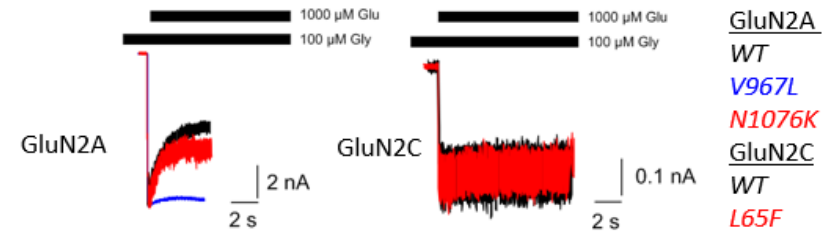
Genetické změny NMDAR u schizofrenie

Funkční analýza GLUN2A missense mutací
v oblasti C-konce receptoru

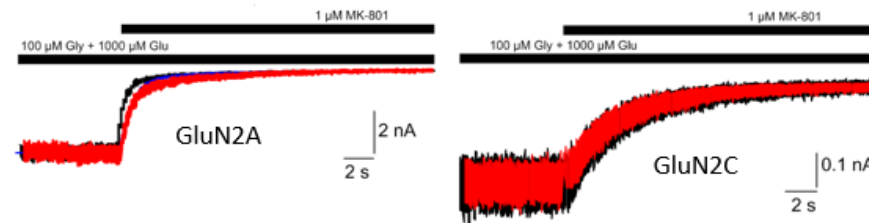
A/ Glutamate potency



B/ Desensitization



C/ MK-801 ion channel block



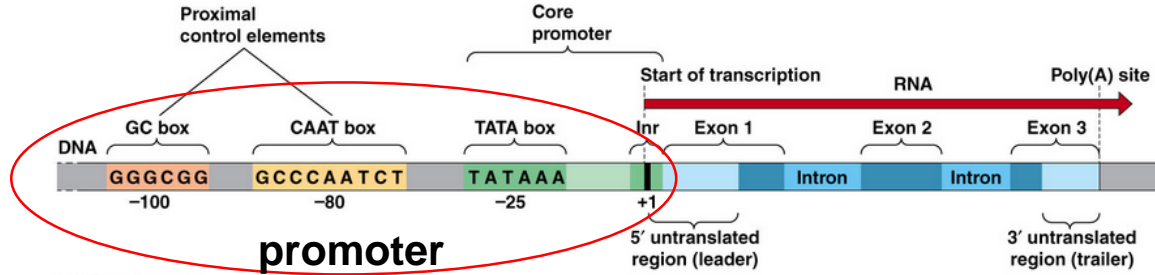
D/ Summary table

	Relative glutamate potency (%)		Desensitization (%)	Onset of MK-801 block Tau _{off} (ms)
	1uM to 1mM	3uM to 1mM		
GluN1+				
GluN2A_WT	13%	38%	50%	561
GluN2A_V967L	20%	51%	6%	709
GluN2A_N1076K	8%	23%	43%	1021
GluN2C_WT	38%	71%	5%	4614
GluN2C_L65F	44%	80%	14%	4807

Genetické změny NMDAR u schizofrenie

Funkční analýza promotorových oblastí NMDAR

Regulační oblast genu



Luciferázová esej

1. Determine promoter response element (RE) of interest.

2. Clone RE upstream of the firefly luciferase (*luc*) gene.

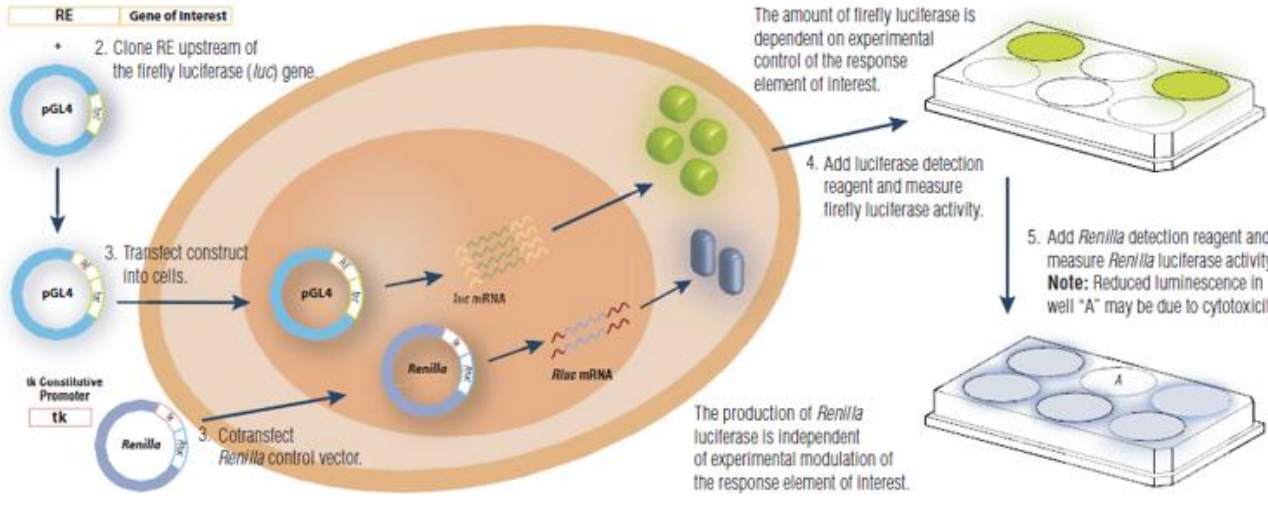
3. Transfect construct into cells.

3. Cotransfect *Renilla* control vector.

4. Add luciferase detection reagent and measure firefly luciferase activity.

5. Add *Renilla* detection reagent and measure *Renilla* luciferase activity. **Note:** Reduced luminescence in well "A" may be due to cytotoxicity.

The production of *Renilla* luciferase is independent of experimental modulation of the response element of interest.



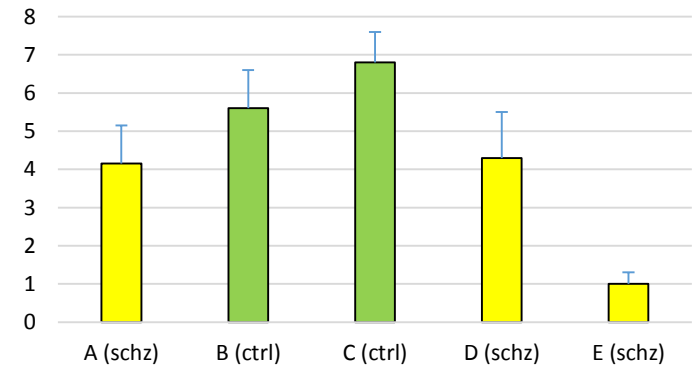
1
2
3
4



Varianty promotorů dle přítomných SNP

Gene	num. of SNPs	num. of promoter variants	num. of SCHZ "associated" prom.
Grin1	2	3	1
Grin2A	6	4	0
Grin2B	9	12	3
Grin2C	7	4	0
Grin2D	6	5	1
Grin3A	12	8	1
Grin3B	28	10	3

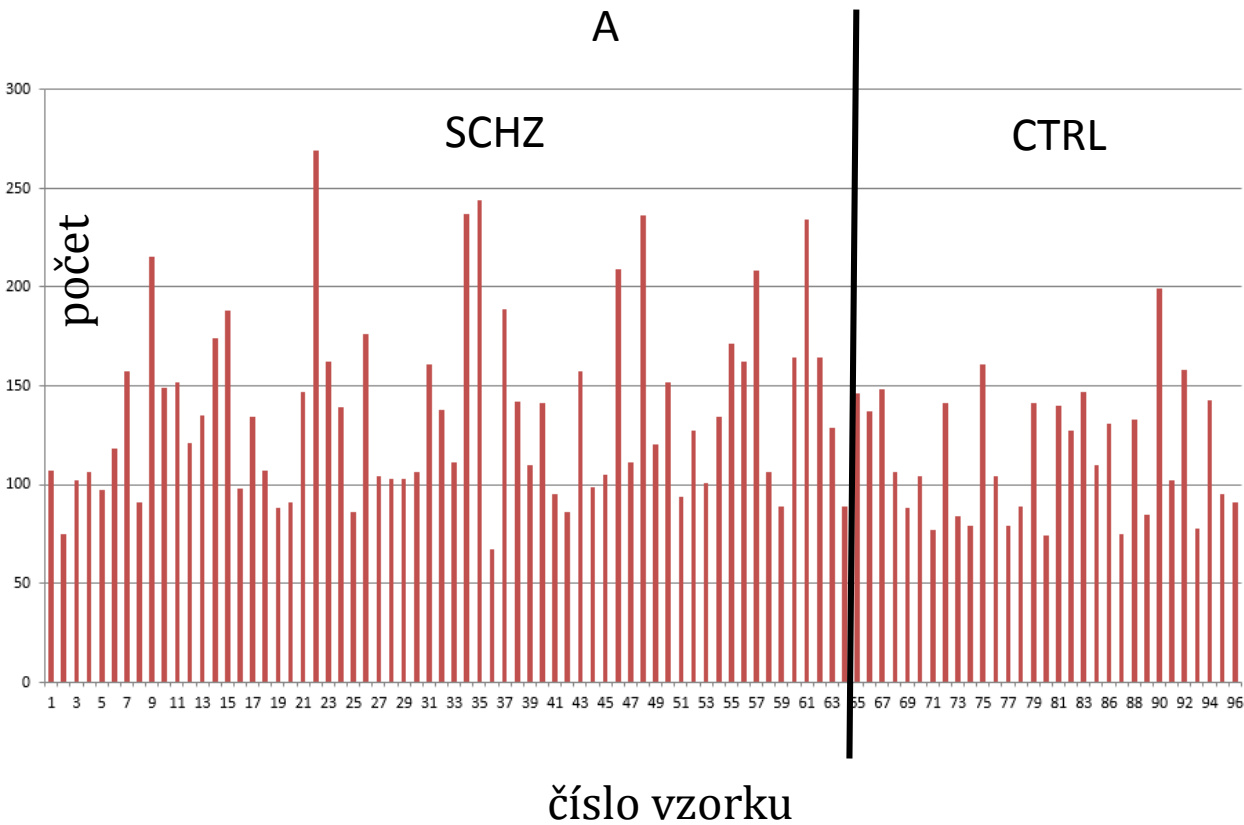
Aktivita některých promotorů Grin3A



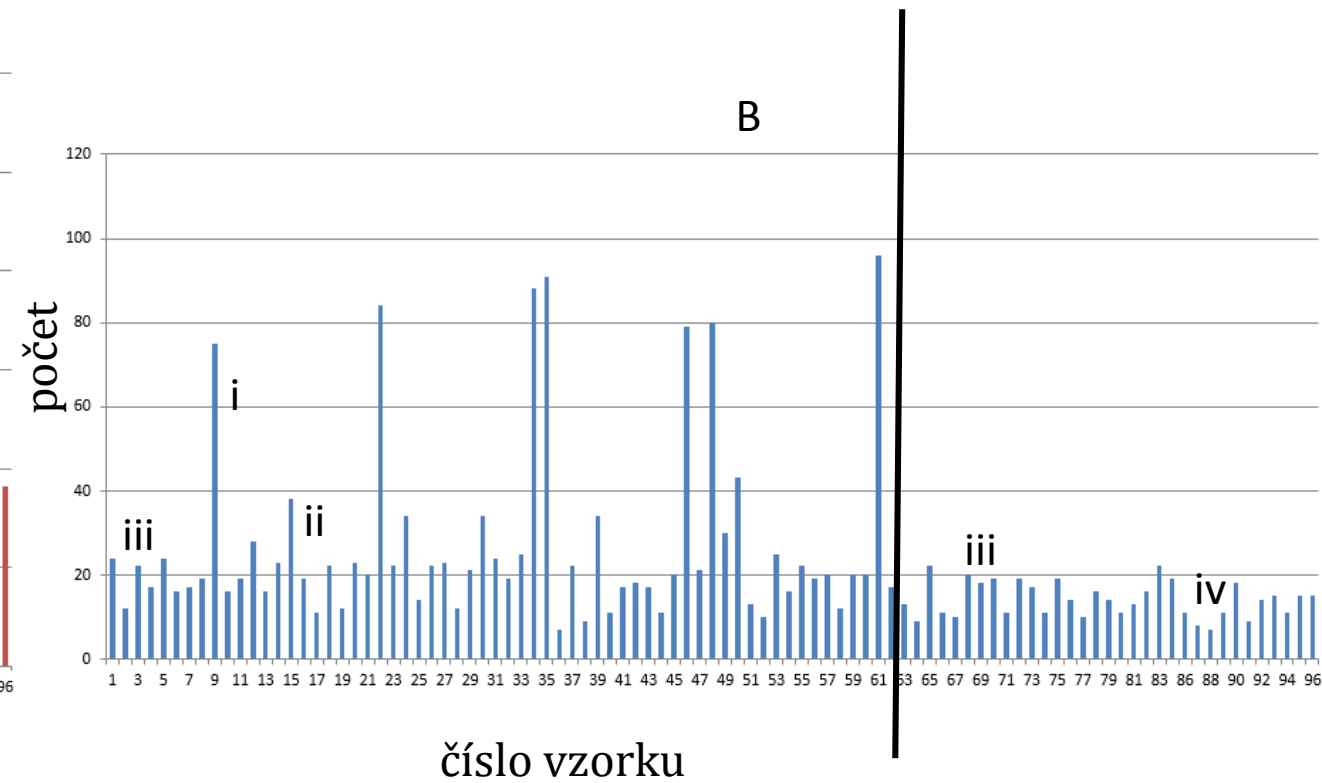
Genetické změny NMDAR u schizofrenie

Analýza všech NMDAR komplex genů a u nich nalezených variant s $p \text{ val} < 0,01$ ctrlxSCH

Zastoupení z 330 „asociovaných“ variant



celkový počet variant (z 330) přítomných v obou alelách genu



Děkuji za pozornost.