



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Inovace předmětu

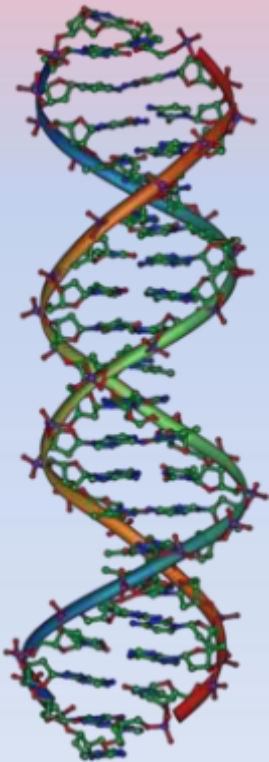
Genetika člověka GCPSB

„Propojení výuky oborů
Molekulární a buněčné biologie
a Ochrany a tvorby životního
prostředí.“

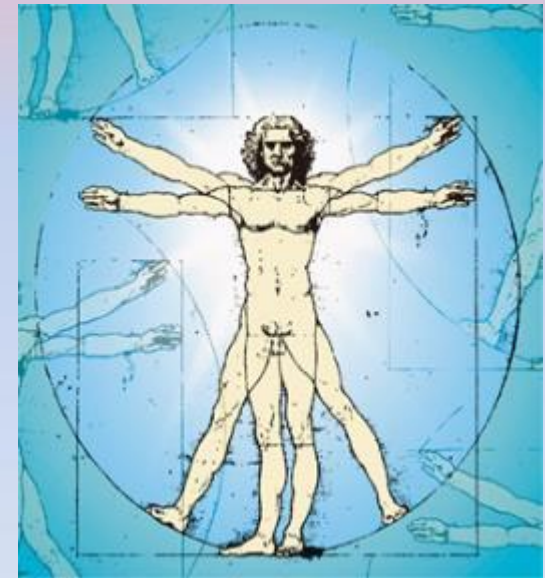
Reg. č.: CZ.1.07/2.2.00/28.0032

Genetika člověka / GCPSB

8. Molekulární genetika neurologických poruch

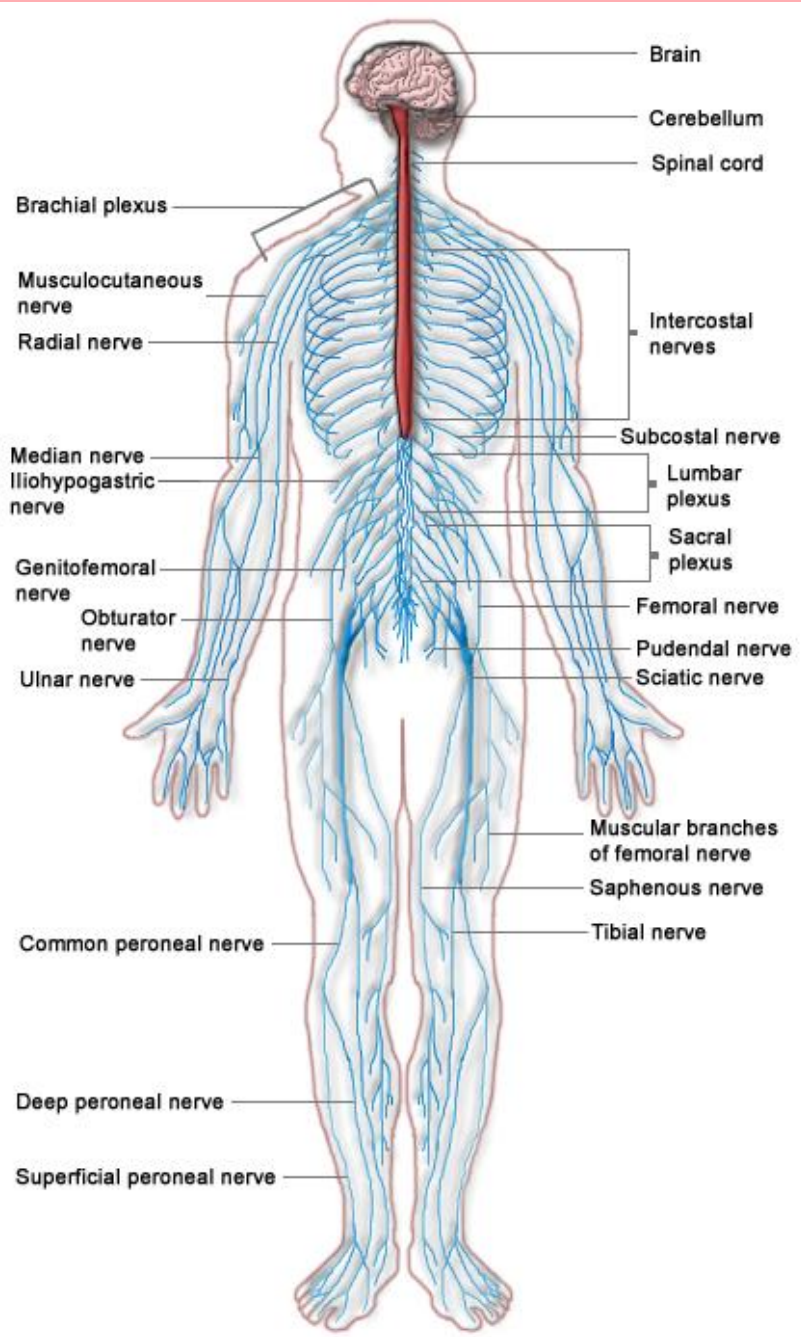


Radim Vrzal
2015



Molekulární genetika neurologických poruch





Centrální nervový systém (CNS)

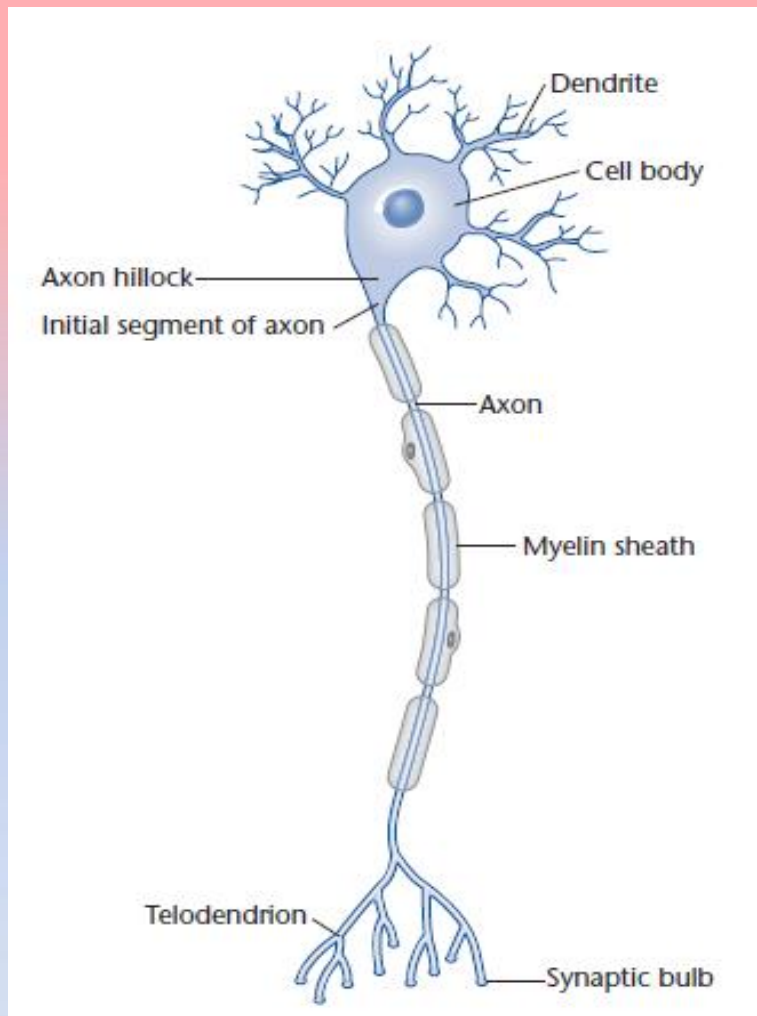
mozek
mícha

Periferní nervový systém (PNS)

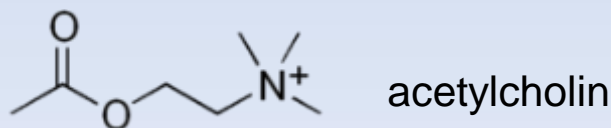
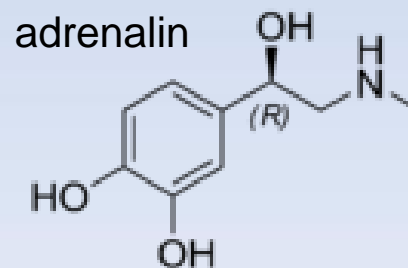
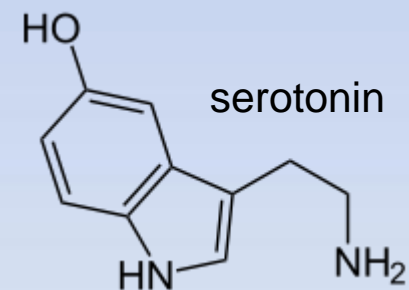
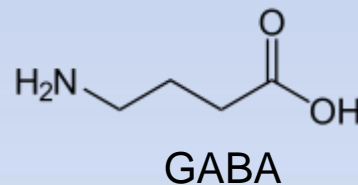
- Informace přenášeny impulsy podél nervů do CNS = interpretace

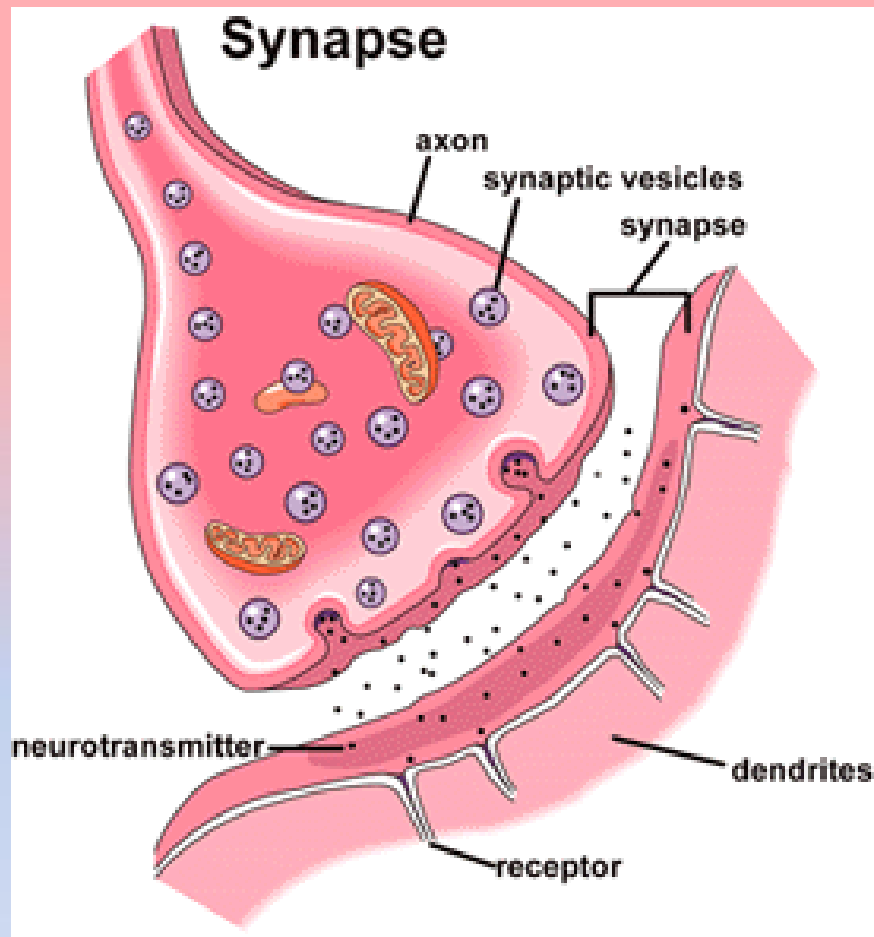
- Celý nervový systém cca 100 miliard neuronů

Neuron



- Přenos elektrických impulsů
- Biochemicky diferencované – acetylcholin, dopamin, serotonin, γ -aminomáselná kyselina (GABA)
- 3 části = tělo (soma), dendrity, axon
- Soma - biosyntéza, metabolismus
- Dendrity – přijímají signály a přenášejí je do těla neuronu
- Axon (neurit) – pouze 1, odvádí impuls od těla neuronu, milimetry až metr na délku, transport látek





- Konec axonu - synaptická cibulka
- Mezera mezi cibulkou a dalším neuronem = synapse (cca. 20 μm)

V každé synaptické cibulce - cca 500 membránově vázaných váčků obsahující jeden druh molekul – neurotransmitery

Transportovány na konec axonu, syntetizovány v těle neuronu

3 typy neuronů dle funkce:

Aferentní - transportují impulsy z periferií do CNS (senzorické)

Eferentní - vedou impulsy z CNS do svalů a žláz (motorické)

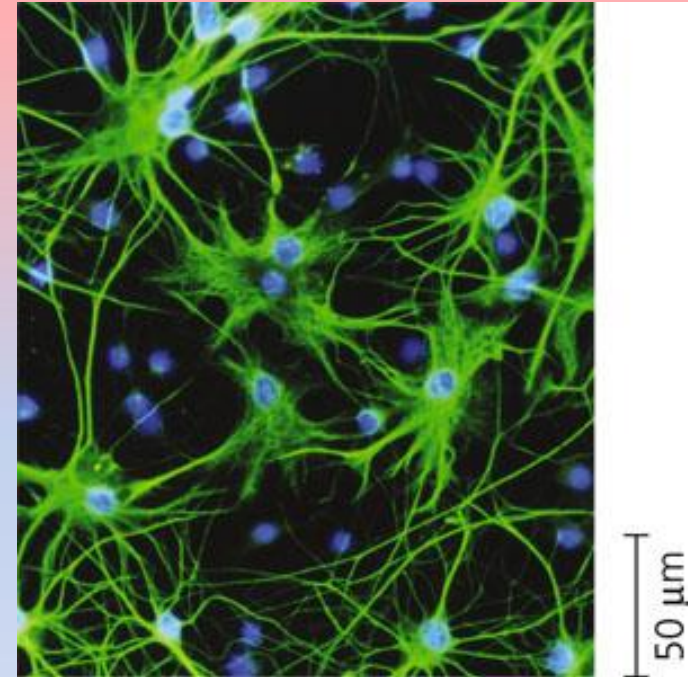
Interneurony - převážně v CNS, spojují neurony s neurony

Ostatní buňky nervového systému

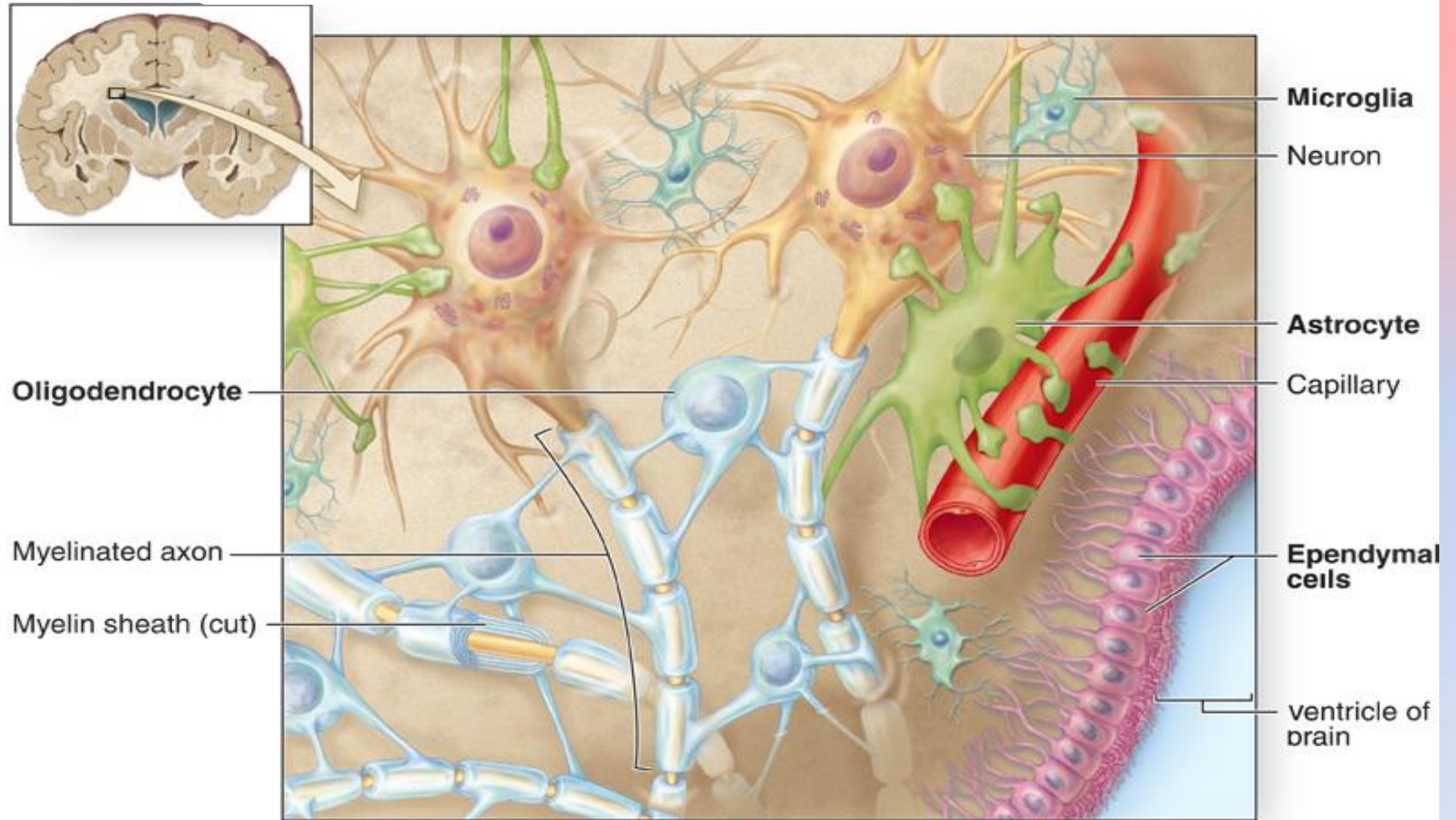
Neuroglie, glie – negenerují a nepřevádějí nervové impulsy.

V CNS jsou 4 typy:

- **astrocyty** – poskytují výživu a fyzickou podporu neuronům, tvoří mozkomíšní/hematoencefalickou bariéru (blood-brain barrier)
- **oligodendrocyty** – obklopují výběžky neuronů a vytvářejí myelinové pochvy axonů
- **mikroglie** – malé buňky schopny fagocytosy, účastní se obranných a úklidových reakcí
- **ependymové buňky** – tvoří výstelku dutin v CNS, usnadňují cirkulaci likvoru



Ostatní buňky nervového systému



Ostatní buňky nervového

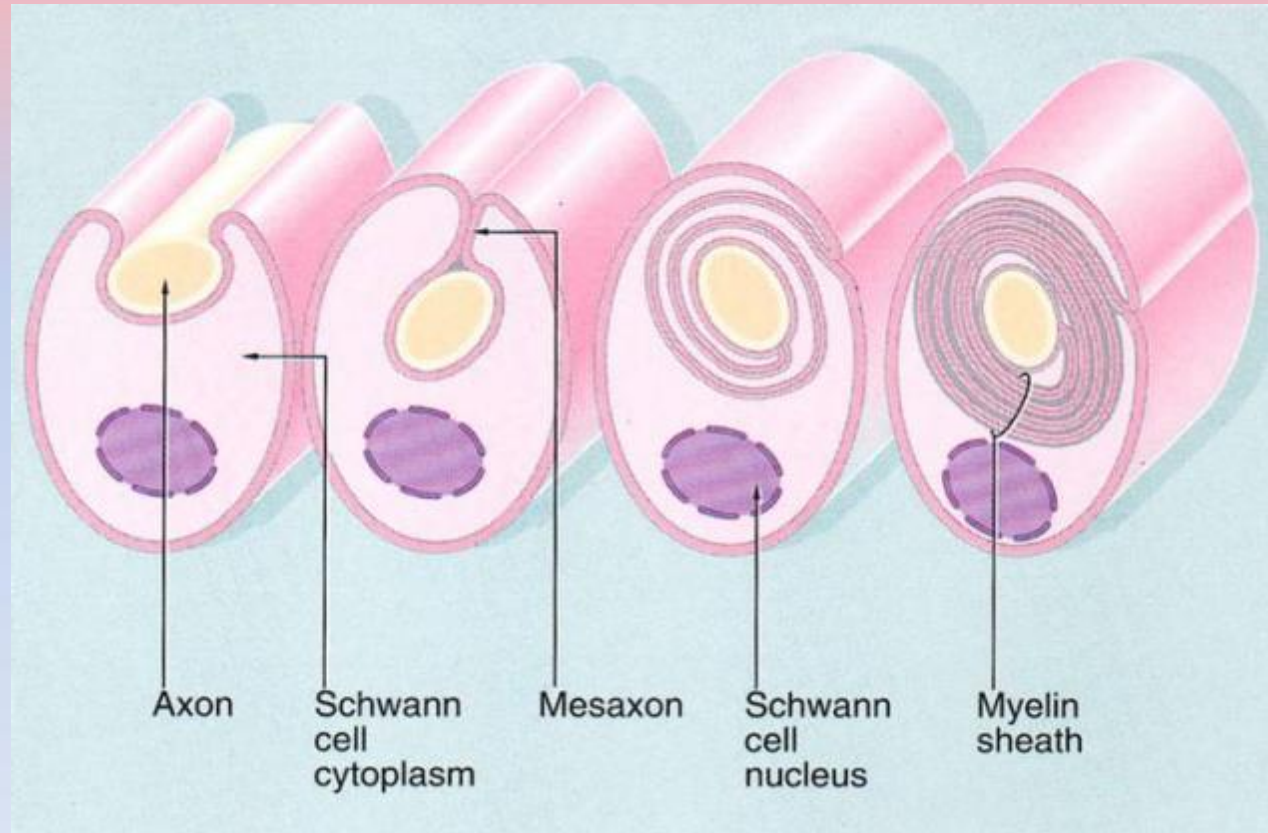
V PNS – 2 typy buněk:

- satelitní buňky (amficyty) - obklopují a ochraňují těla ganglií

- Schwannovy buňky
tvoří myelinovou
pochvu opakovaným
obklopením buněčné
membrány kolem
axonu

- metabolický
význam pro příslušný
axon

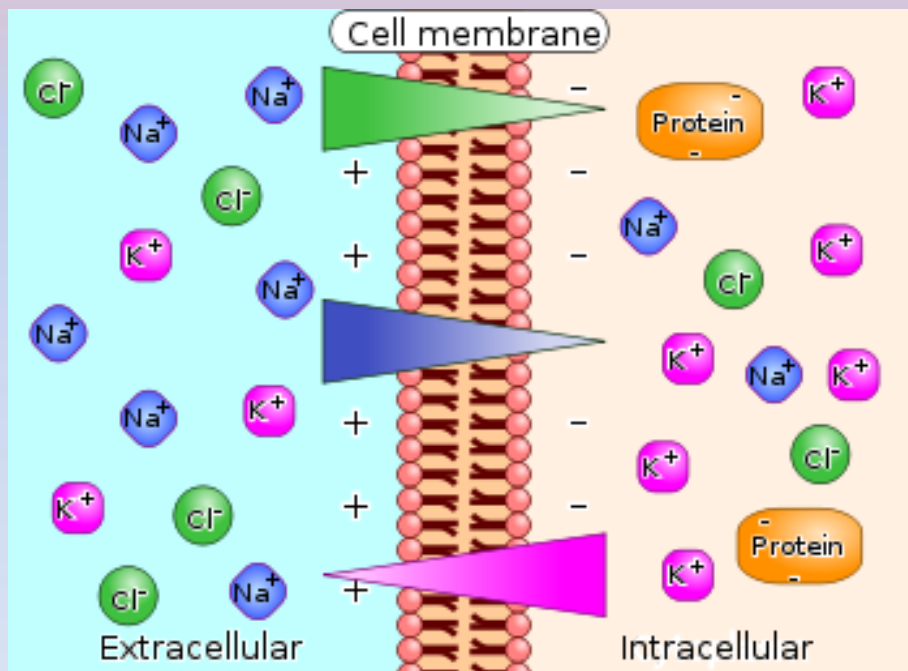
- za patologických
podmínek schopnost
fagocytosy



Klidový membránový potenciál

Neuron nešířící impuls – vnější povrch = pozitivně, vnitřní = negativně nabit
→ membrána je polarizovaná – rozdíl v nábojích se nazývá klidový membránový potenciál

- složen z koncentračních gradientů iontů, zejména Na^+ , Cl^- , K^+



Rozdíl udržován Na, K-ATPasou – 3 Na^+ ven a 2 K^+ dovnitř = iontový kanál

Negativní náboj uvnitř = převážně proteiny

Kanály - otevřeny kontinuálně

- otevírání/zavírání dle lokálních podmínek, např.:

- vazba nízkomolekulárních látek → gated channels

- změna náboje → voltage-gated (napětově řízené) channels

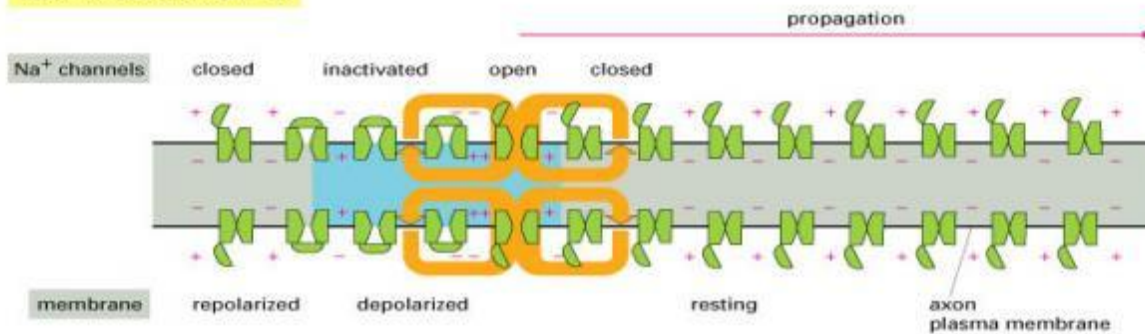
Přenos nervového vzruchu

Nervový impuls - depolarizace / obrácení klidového membránového potenciálu

→ přesun Na^+ dovnitř a K^+ ven → akční potenciál

Změna náboje se šíří do přilehlých segmentů buněčné membrány, což otevírá Na^+ a K^+ kanály a způsobuje další depolarizaci

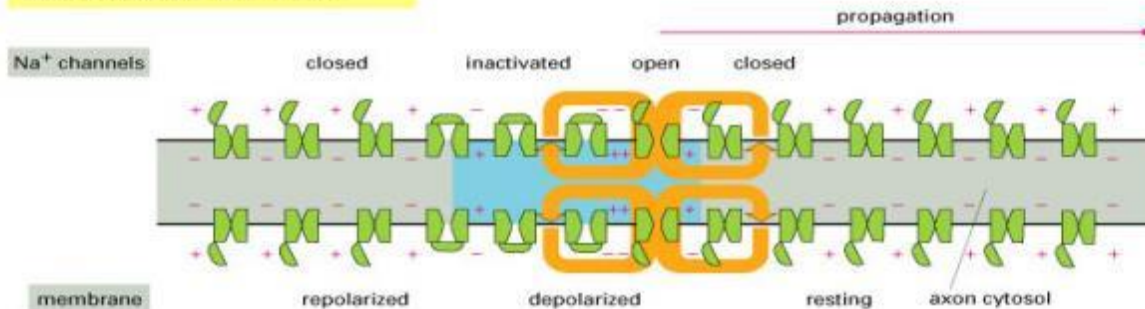
(B) instantaneous view at $t = 0$



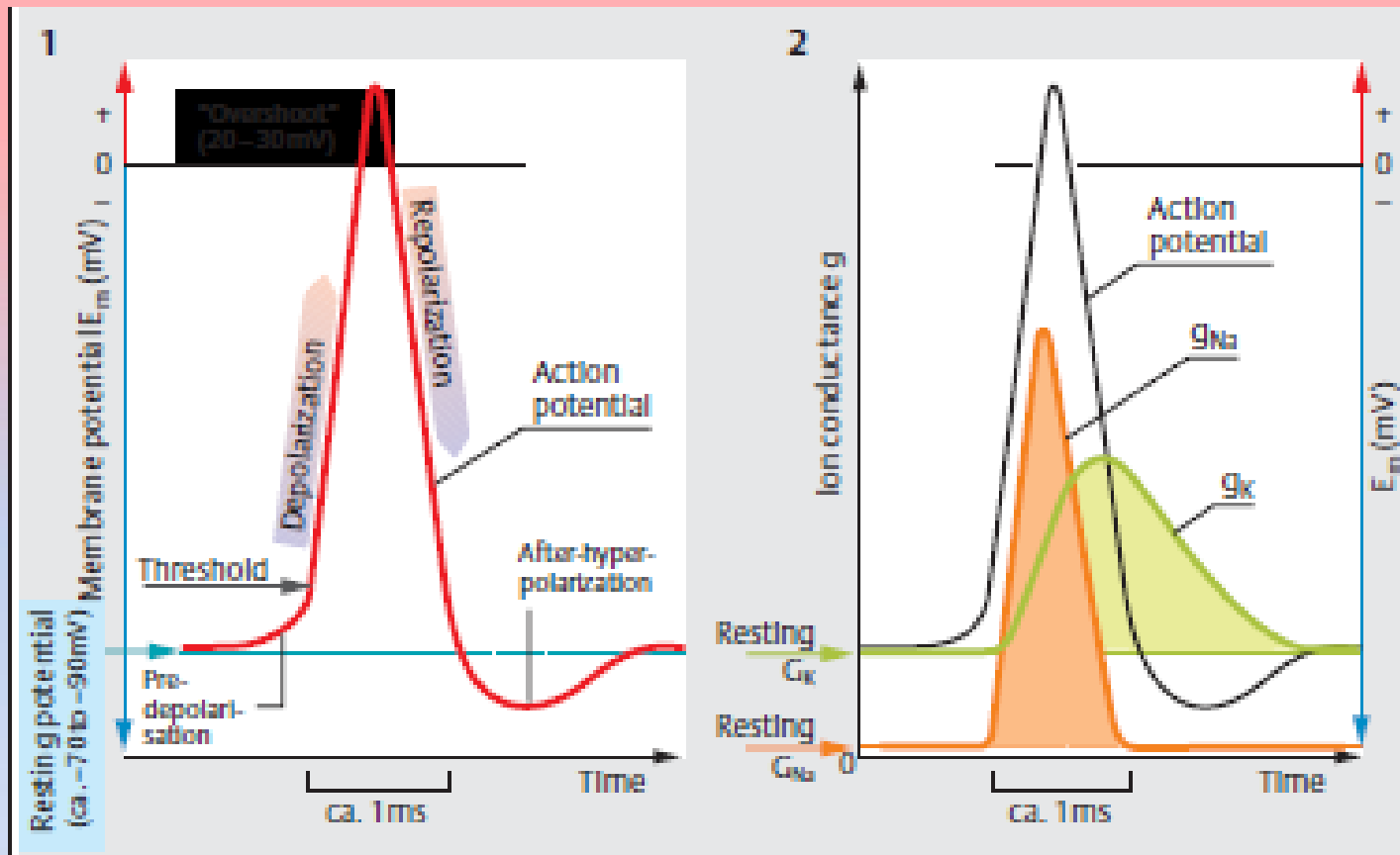
Po 1-2 ms se kanály předcházejícího segmentu uzavřou !!

Na,K-ATPasa začne pumpovat ionty tak že ustanoví klidový potenciál (repolarizace)

instantaneous view at $t = 1 \text{ msec}$



Přenos nervového vzruchu



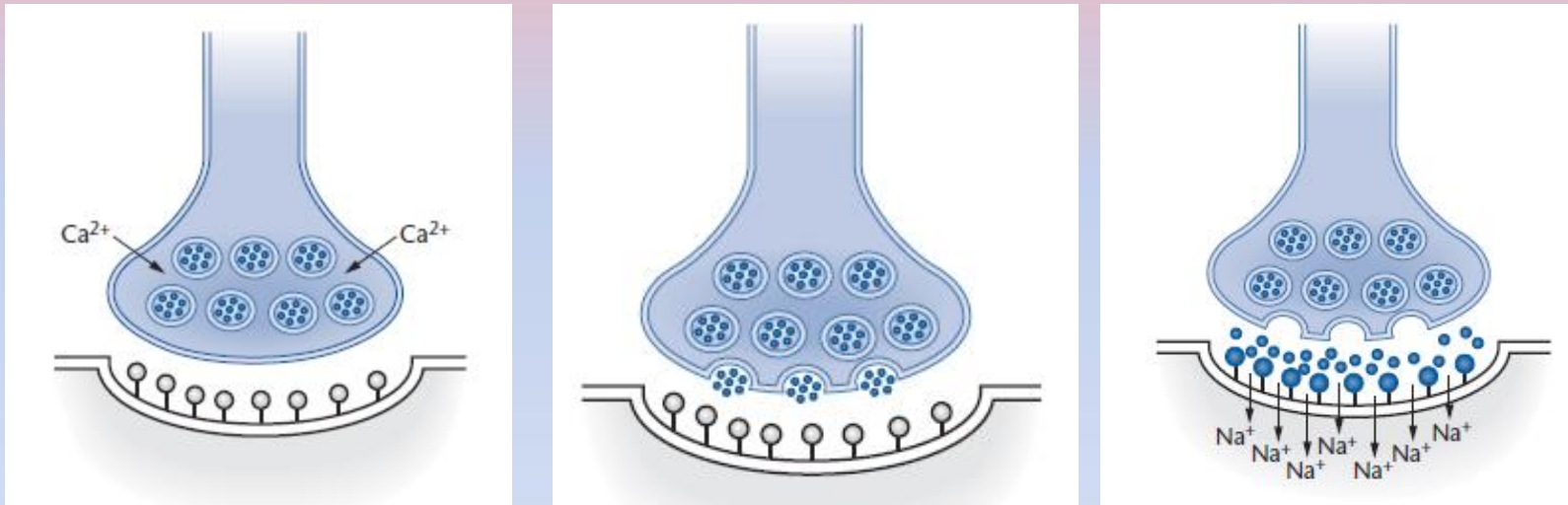
Akční potenciál = maximální odpověď na otevření voltage-gated kanálu

Je-li dosaženo prahové hodnoty, dojde k iniciaci akčního potenciálu. Jakmile se vytvoří, šíří se podél axonu.

Přenos nervového vzruchu

Jakmile akční potenciál dosáhne presynapse - depolarizace otevře napětím-řízené kanály pro Ca²⁺ ionty

Váčky fúzí s presynaptickou membránou a jejich obsah (neurotransmitery) se vylije do synaptické štěrbině.

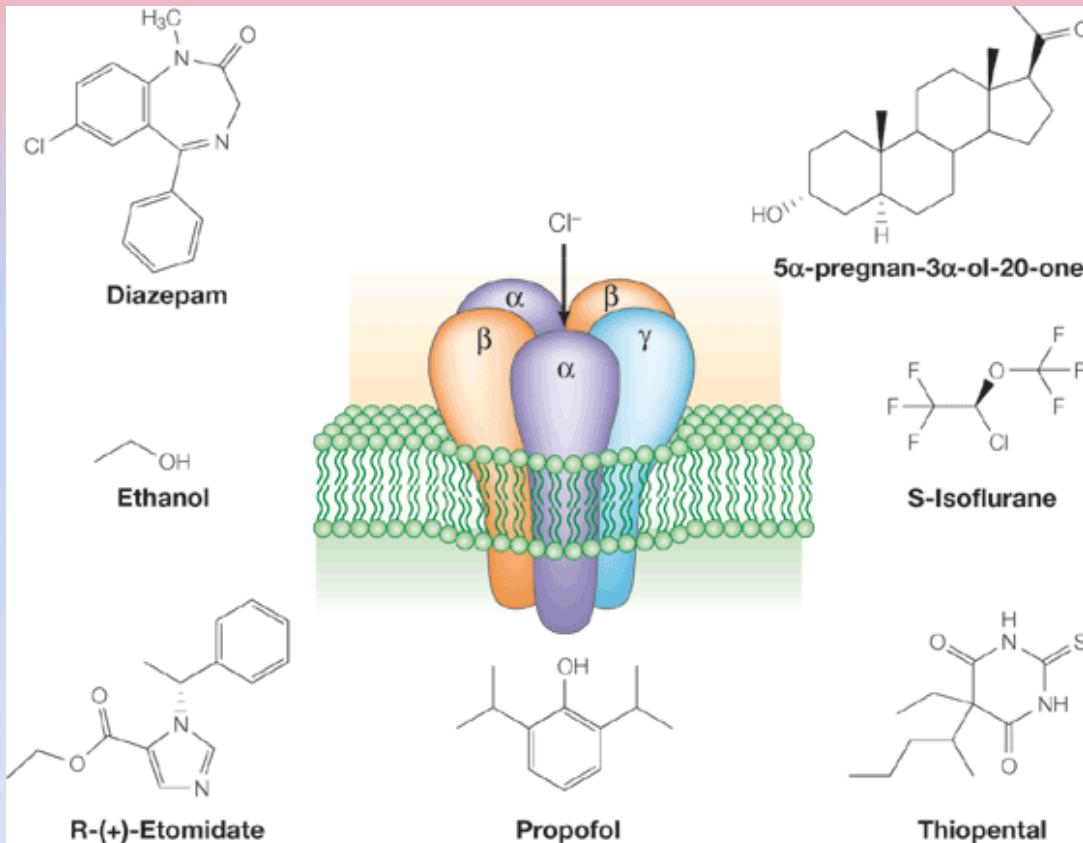


Neurotransmitter se naváže na receptor postsynaptického neuronu → otevření iontového kanálu → vstup Na⁺ → depolarizace membrány → akční potenciál

Gated channels

GABA_A

- neurotransmitter se váže na zavřený chloridový kanál
- po otevření vnikají Cl⁻ do buňky → zvětšení negativního náboje (hyperpolarizace) → brání tvorbě akčního potenciálu (GABA, glycin)



- hyperpolarizace vede k útlumu vzrušivosti -
potencována léky anxiolytické, analgetické, sedativní účinky

Thiopental – anestetikum, sérum pravdy

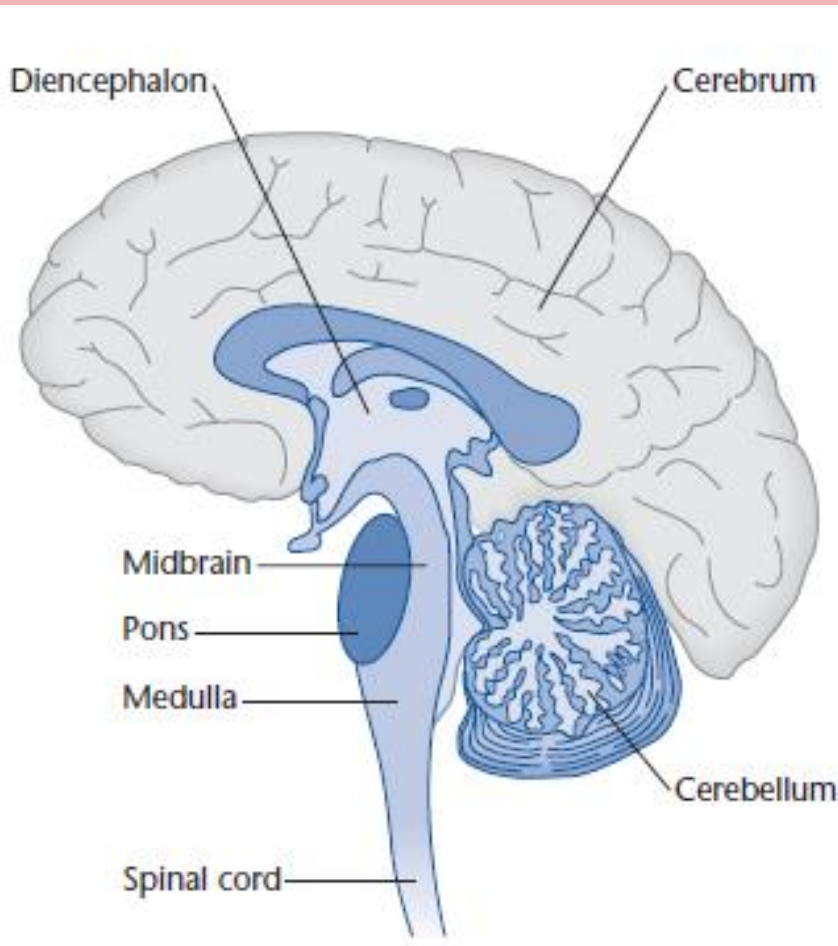
Valium (Diazepam) – sedativum, anxiolytikum

Propofol - hypnotikum

Anatomie mozku

6 oblastí

– mozek (cerebrum), mezimozek (diencephalon), střední mozek (midbrain), most (pons), prodloužená mícha (medulla), mozeček (cerebellum)



Střední mozek – kontrola svalové koordinace, držení těla

Most – pohyb očí, chuť, výrazy obličeje

Mozeček – držení těla, svalový tonus, kontrakce kosterních svalů

Mezimozek – thalamus – sluch, chuť, vidění

- hypothalamus – kontrola autonomního nervového systému (srdeční stahy, pohyb potravy ve střevech, agrese)

Mozek – lidské vědomí, řeč, uvažování

Neuronální kanálopatie

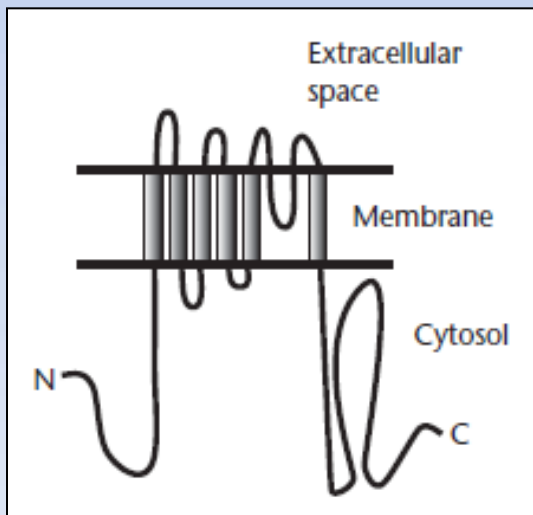
Kanálové proteiny – regulace toku iontů

Iontové kanály - vysoce specifické pro Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- - tvorba, potlačení, propagace akčního potenciálu

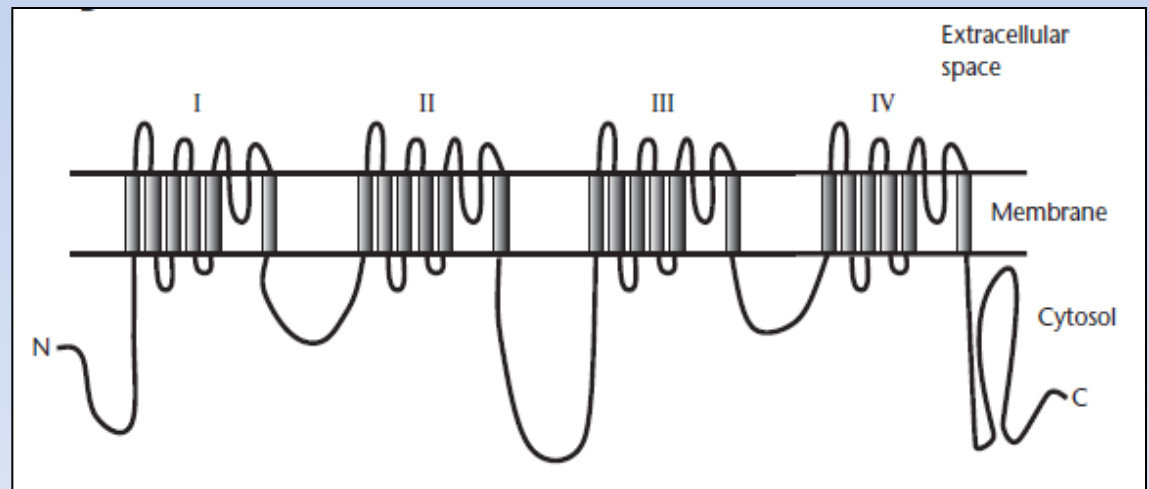
K^+ - kanály – 4 samostatné podjednotky (alfa podjednotky s 6 transmembránovými segmenty) (A)

Ostatní ionty – jednoduché polypeptidy s 4 membránově vázanými doménami, každá s 6 transmembránovými segmenty (B)

Mutace genů kódující kanály → **kanálopatie** – záchvaty, křeče, ataxie, bolesti hlavy se zvracením, migrény



A – K^+ kanál



B – kanál pro ostatní ionty

Neuronální kanálopatie

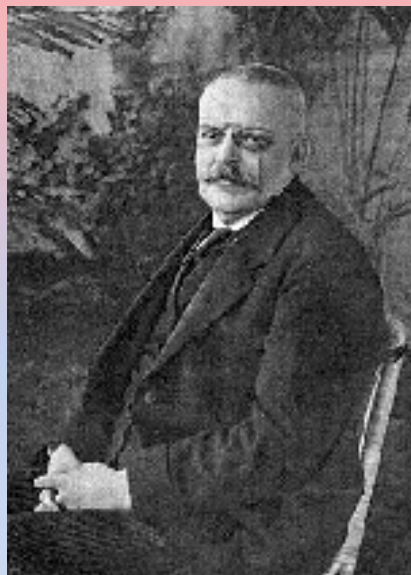
Channels	Locus	Location	Subunit	Function	Clinical features (ion current effect)
Voltage-gated					
Potassium	<i>KCNA1</i>	12p13	K _v 1.1α	Repolarization of axons	Episodic ataxia; neuromyotonia (decreased)
	<i>KCNQ2</i>	20q13.3	KCNQ2α	Low threshold current modulated by muscarinic receptors	Benign familial neonatal convulsions (decreased)
	<i>KCNQ3</i>	8q24	KCNQ3α	Low threshold current modulated by muscarinic receptors	Benign familial neonatal convulsions (decreased)
Calcium	<i>CACNA1A</i>	19p13	Ca _v 2.1α	Current in Purkinje and granule cells; presynaptic terminals	Unilateral migraine; episodic ataxia; spinocerebellar ataxia (decreased)
Sodium	<i>SCN1A</i>	2q24	Na _v 1.1α	Somatodendritic Na ⁺ influx	Seizures with high fever; infant epilepsy (increased)
	<i>SCN2A</i>	2q23–q24.3	Na _v 1.2α	Axonal fast Na ⁺ influx	Benign familial neonatal-infantile seizures (increased)
	<i>SCN1B</i>	19q13.1	Brain β ₁	Accessory protein	Seizures with high fever (increased)
Ligand-gated					
γ-Aminobutyric acid (GABA _A) receptors	<i>GABRG2</i>	5q31.1–q33.1	γ ₂	Fast inhibition	Seizures with high fever (decreased Cl ⁻)
Nicotinic acetylcholine (ACh) receptors	<i>CHRNA4</i>	20q13.2–q13.3	α ₄	Presynaptic transmitter release	Nocturnal frontal lobe epilepsy (increased Na ⁺)
	<i>CHRN2</i>	1p21	β ₂	Presynaptic transmitter release	Nocturnal frontal lobe epilepsy (increased Na ⁺)
Glycine receptors	<i>GLRA1</i>	5q32	α ₁	Fast inhibition	Extreme startle response, i.e., hyperekplexia (decreased Cl ⁻)

BFNC –
1 měsíc po narození záchvaty, po prvním roce ústup záchvatů

BFNIS –
nástup 6 měsíců po narození, po 12 měsících už žádné záchvaty

Alzheimerova choroba

Demence = poškození intelektuálních schopností, paměti, úsudku a osobnosti v rozsahu, že každodenní fungování a kvalita života jsou vážně narušeny.



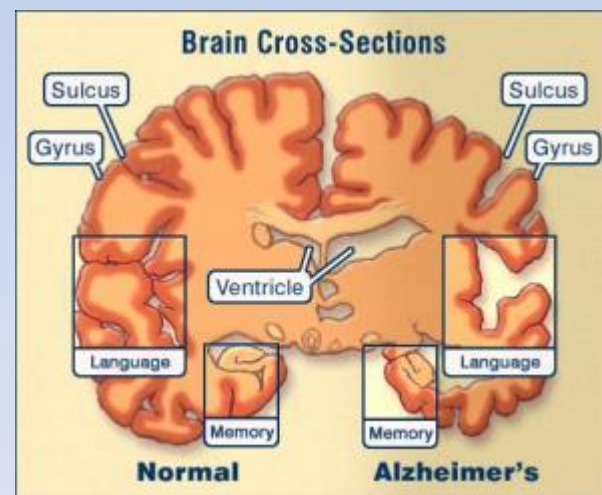
Alois Alzheimer
(1864 – 1915)

**Klinické příznaky – neschopnost tvorby nových vzpomínek, ztráta krátkodobé paměti, snížená schopnost koncentrace
Smrt často jako následek respiračního selhání.**

Histologie mozku – ztráta synapsí a neuronů v hipokampu

1) Degenerace neuronů v cerebrálním kortexu

2) Převládající tvorba senilních plaků (husté kulovité struktury) vně neuronů hipokampu



Tvorba neuritických plaků = senilní plaky obklopené buněčnými zbytky

3) Agregáty fibril se akumulují uvnitř buněk

Alzheimerova choroba: Biochemie senilních plaků

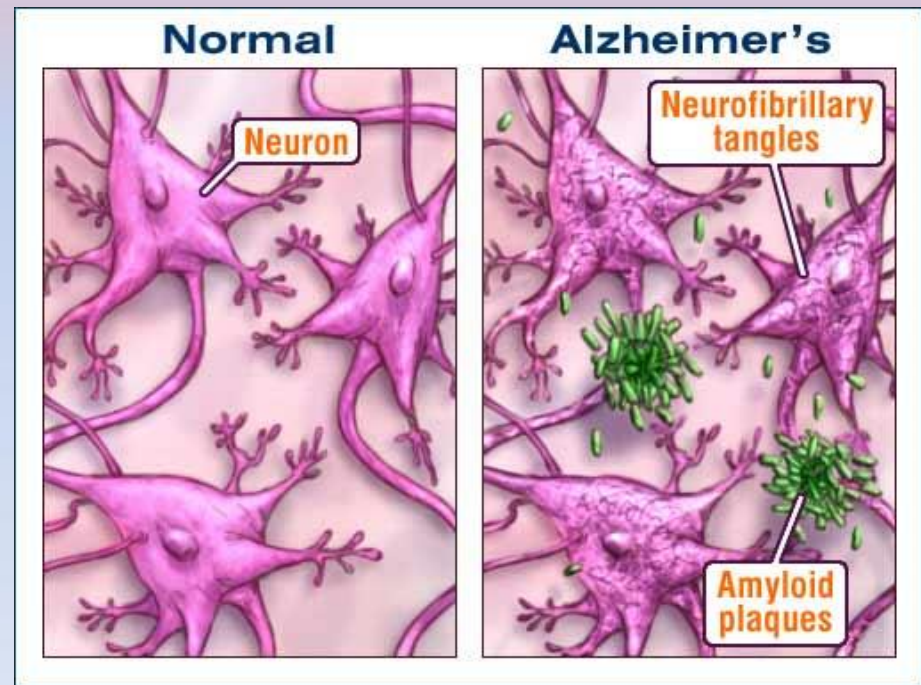
Jádro senilních plaků – amyloid <== amyloidóza

Hlavní součást - amyloid beta (4 kDa, A β) – tvořen isoformami s obsahem AK 39-43 (dva hlavní – A β 1-40, A β 1-42)

Proteiny amyloidových tělísek = abnormální degradační produkty či zmutovaná verze prekurzorových proteinů

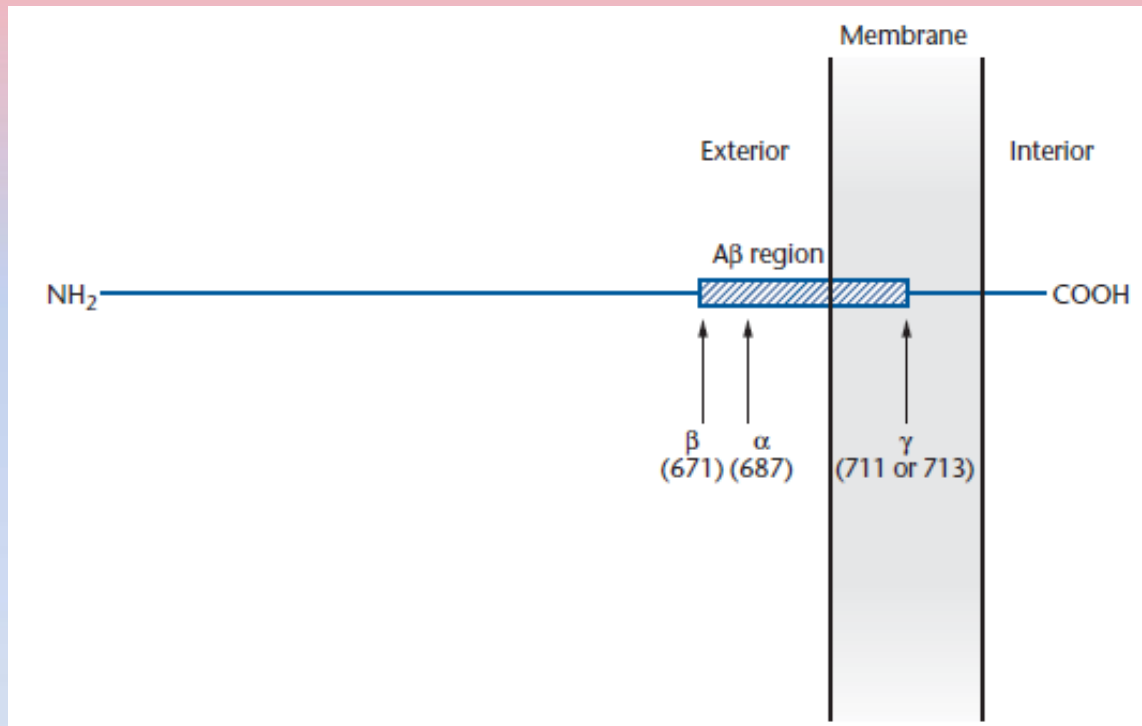
- **Amyloidová vlákna** jsou rovná, hladká a mají cca 10 nm v průměru – husté shluky se barví kongo červení

- **Amyloidové shluky** obsahují i nefibrilární peptidy – ApoE, alfa-anti-chymotrypsin



Alzheimerova choroba: Biochemie senilních plaků

- Isoformy Amyloidu beta – odvozeny z proteolytického štěpení – amyloid precursor protein (APP) – 21q21.2
- APP – transmembránový protein, 3 isoformy, 695 AK isoforma v celé CNS, 751 a 770 AK formy jsou produkovány gliálními buňkami



AK číslování je založeno na 770 AK isoformě

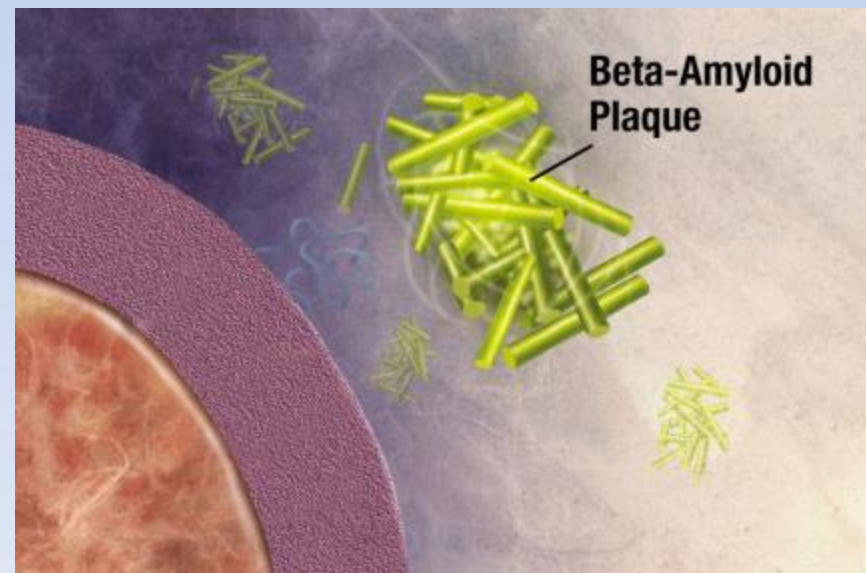
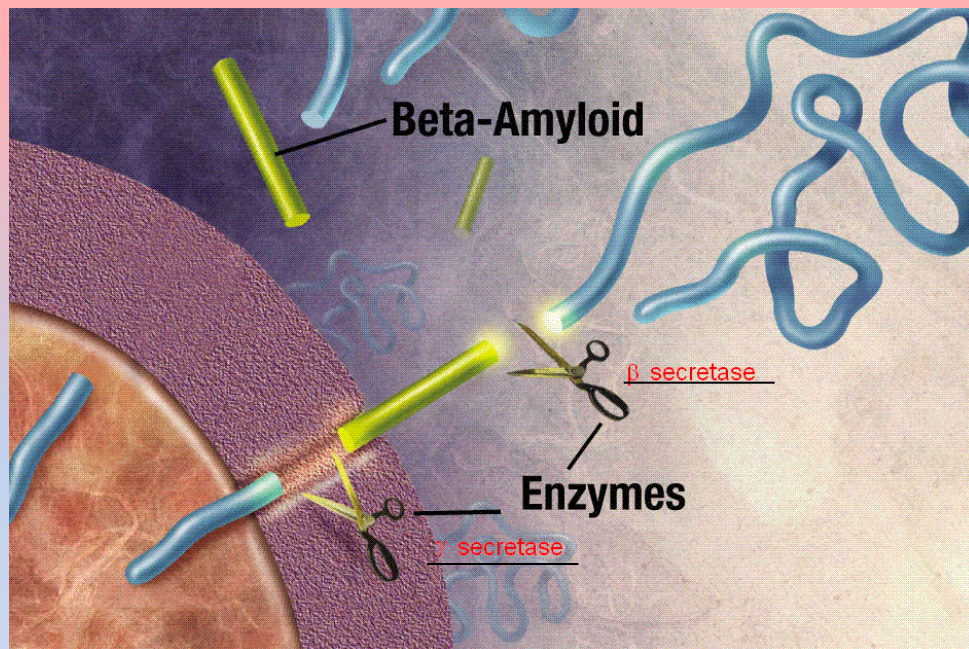
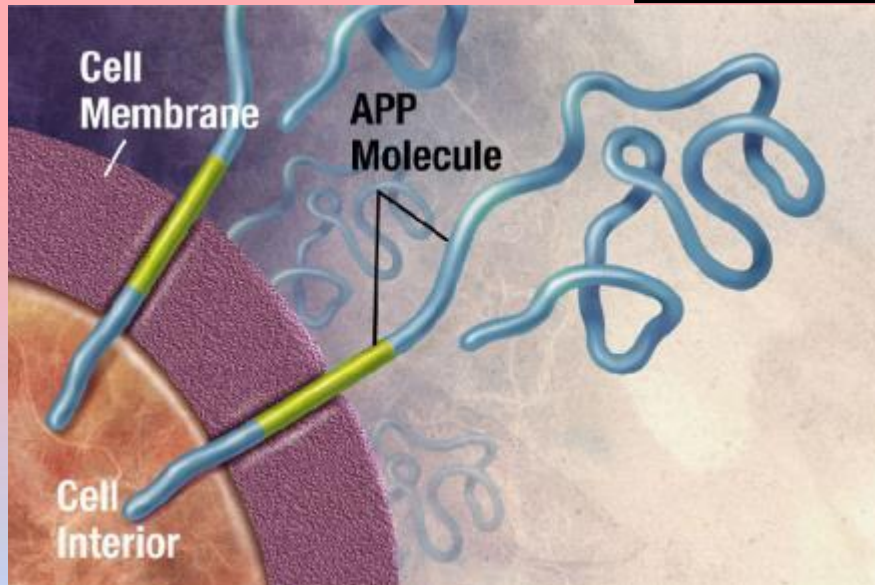
Aβ43 isoforma zahrnuje oblast od 672-714

Za normálních podmínek – APP štěpena α/β-sekretasou za 687/671 AK → NEamyloidogenní fragmenty

Štěpení β- a γ- sekretasou → AMYLOIDOGENNÍ FRAGMENTY (Aβ40, Aβ42)

Štěpení α- a γ- sekretasou → NEamyloidogenní fragment

Alzheimerova choroba: Biochemie senilních plaků

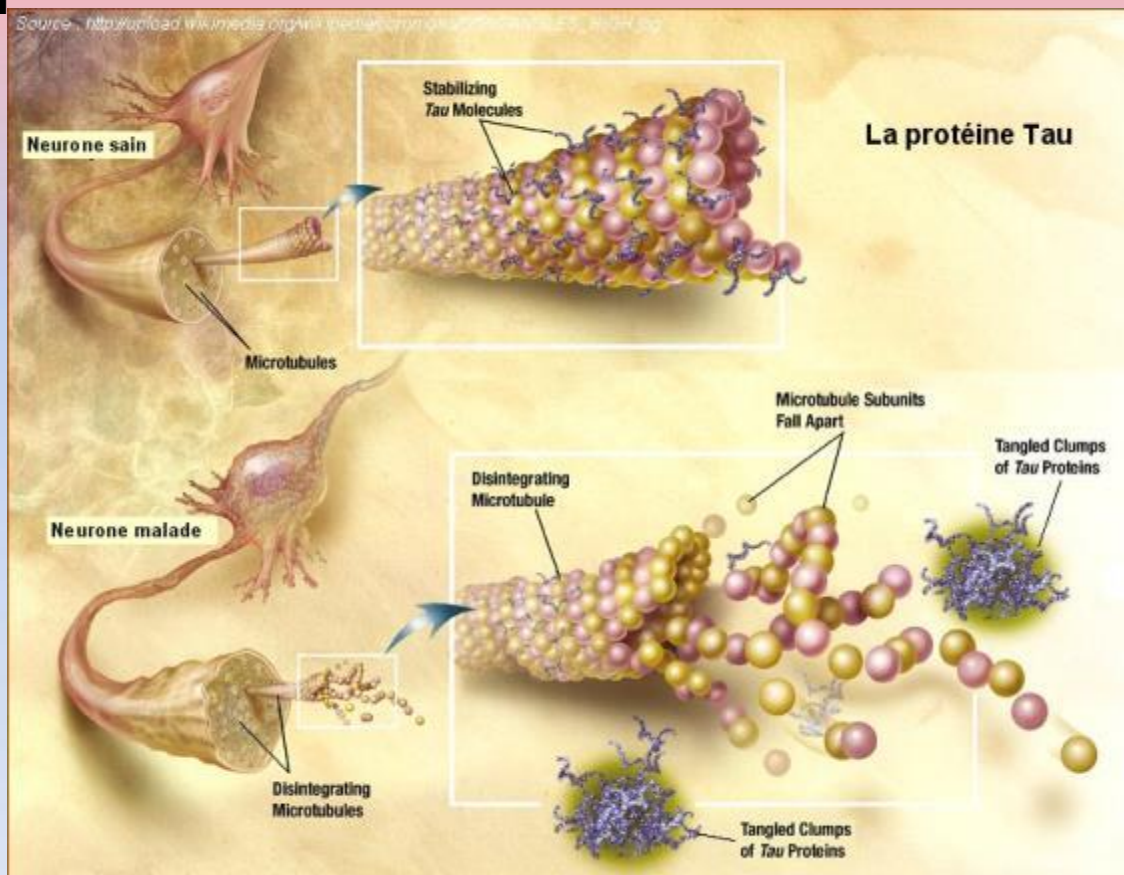


Funkce APP a fragmentů není zcela pochopena – 695 AK isoforma může usnadňovat mezibuněčný kontakt, synaptickou stabilitu, adhesi na extraneuronální matrix.

Alzheimerova choroba: Biochemie senilních plaků

Hlavní vláknité jednotky neurofibril jsou spárovaná helikální filamenta. Skládají se ze dvou propletených vláken s připojeným proteinem τ (tau). τ kódován MAPT genem (17q21) – váže se na tubulin a usnadňuje uspořádávání do mikrotubul

τ tvořící plaky = hyperfosforylovaný (HP-tau) – neváže se na tubulin, blokuje vznik mikrotubul
- zřejmě funguje jako agregační centrum



Genetika Alzheimerovy choroby (AD)

Komplikované onemocnění

- cca 10 % AD s úplnou penetrací – nástup nemoci mezi 55-60 rokem (EOAD – Early Onset Alzheimer Disease)
- cca 90 % pozdní nástup > 65 letech – 25 - 40 % má příbuzného – není zřejmý způsob dědičnosti → genetická heterogenita

Časný nástup (EOAD) – mezi 55 - 60 lety

- missense mutace měnící AK v 717 (V717I) APP
- dvojitá mutace v APP (K670N) a (M671L) – přilehlá k straně štěpení γ -sekretasou
- kromě nástupu onemocnění – jedinci vykazují stejný fenotyp

Biochemické následky APP mutací vedoucí k fenotypu choroby

- transfekce expresního vektoru pro mutovaný APP *in vitro*
- buňky a plasma jedinců s APP mutací byly sledovány na relativní výskyt A β 40 a A β 42/43
- byla sledována přítomnost A β 40 a A β 42/43 v transgenních myších nesoucích mutantní APP gen



Větší produkce A β 40 a A β 42/43 než u zdravých jedinců

Genetika Alzheimerovy choroby (AD)

Zajímavá mutace – APP (E693Q) – tvoří se amyloidová tělíska, ale žádný ze znaků choroby není přítomen

Typickým fenotypem jsou vážná prasknutí malých krevních kapilár (krvácení) – v kortexu a mozečku - jako následek difuzních A β tělísek

= **cerebrální amyloidní angiopatie (CAA)**

- děděna jako AD, nástup mezi 45 - 55 lety

Studie identifikovaly lokus nemoci s EOAD do oblasti 14q24.3 → **gen presenilin-1 (PSEN1)** – mutace přispívají k cca 40 % všech rodinných případů choroby s EOAD mezi 30 - 55 rokem života

Brzy na to identifikace **presenilinu-2** na 1q32-q42 (PSEN2)



Participují v štěpení γ -sekretasou → mutace zvyšují produkci A β 42

- Mutace APP, PSEN1, PSEN2 = cca 50 % EOAD

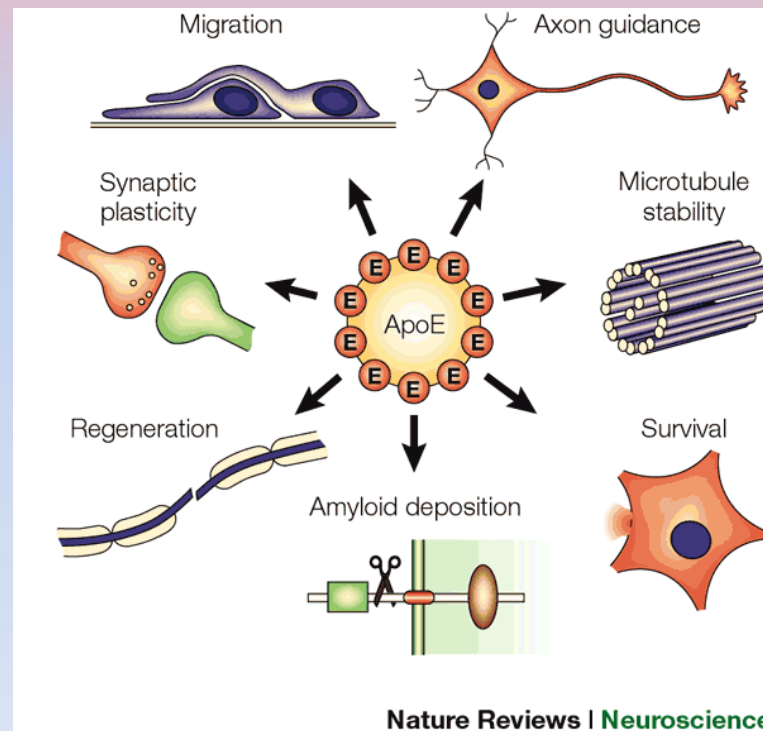
Genetické rizikové faktory AD

Spojení mezi LOAD a 19q13.2 - v oblasti gen *APOE* pro apolipoprotein E

- Je polymorfní – 3 allele – **APOE*2**, **APOE*3**, **APOE*4** - s frekvencemi 8, 78 a 14 % v běžné populaci
- Syntetizován primárně v mozku astrocyty
- Vychytává TAG a cholesterol

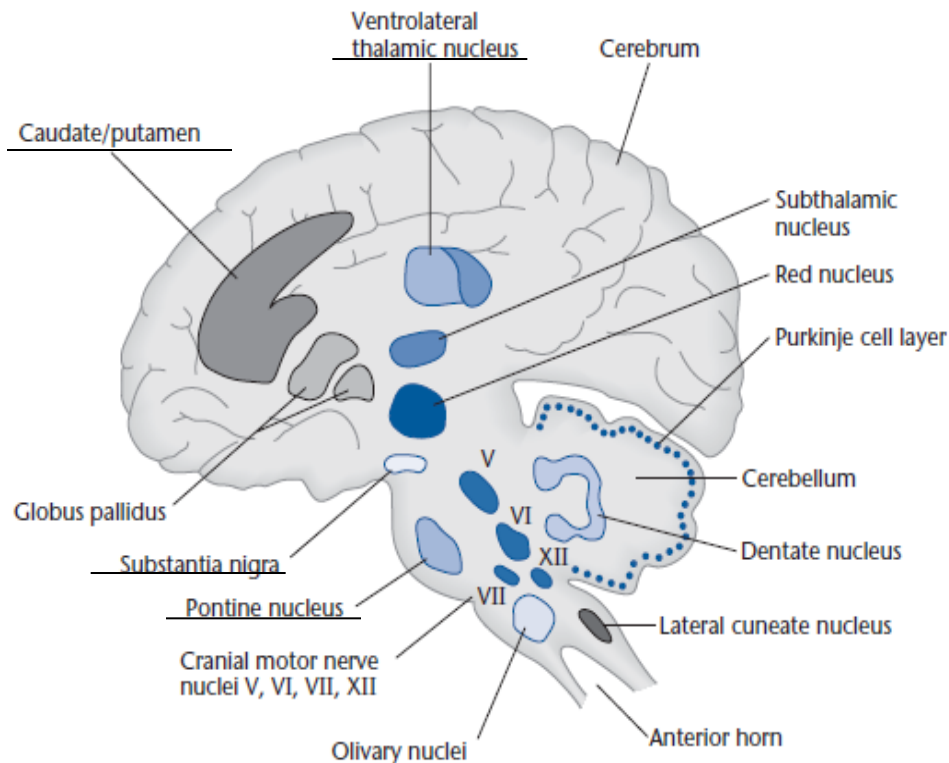
APOE*4

- významně asociován s AD
- přítomnost není nutná ani postačující
- rizikový faktor
- příspěvek k AD není znám – „snad“ poškozené neurony v přítomnosti ApoE4 mohou vyvolávat nadprodukcii HP- τ nebo A β



Huntingtonova nemoc (HD)

- Postihuje 1 : 10 000 na celém světě
- První známky kolem 35. roku života
- Zhoršená svalová koordinace, zapomětivost, změny osobnosti, deprese, paranoidní deziluze, nekontrolovatelná zuřivost



Senilní či neuritické plaky typické pro AD nejsou přítomny.

Dochází k akumulaci granulárního a filamentozního materiálu v neuronech. Na konci HD ztrácí mozek 25 % původní hmotnosti.

AD, geneticky homogenní, 4p16.3
HD gen – izolován 1993

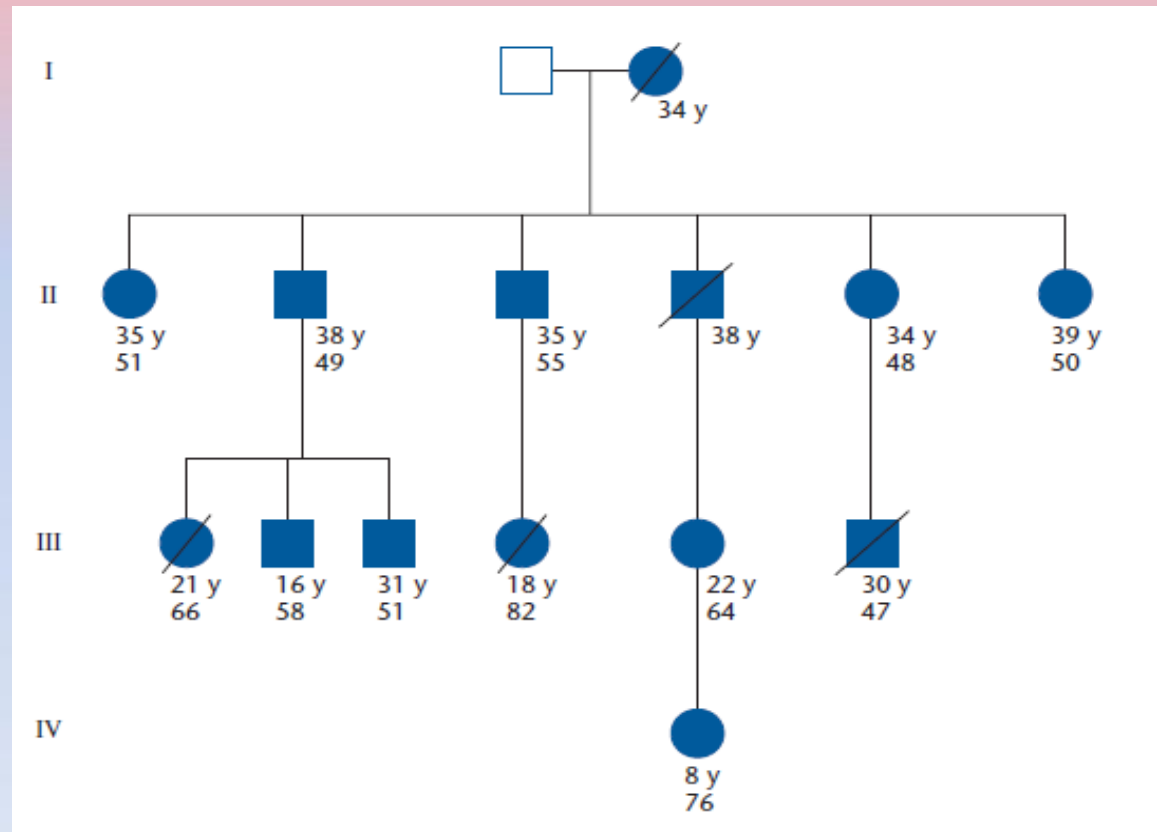
**Nepřerušené rozmnožení
CAG/GTC repetitív HD genu
v prvním exonu !!!**

Huntingtonova nemoc

- CAG je kodon pro Gln (Q)
- HD mutace je výsledek nárůstu délky trinukleotidové repetice
- Huntingtin (produkt HD genu) se nachází v cytoplasmě neuronů – asociován s membránou, cytoskeletem

- Trinukleotidové repetice jsou nestabilní !!!

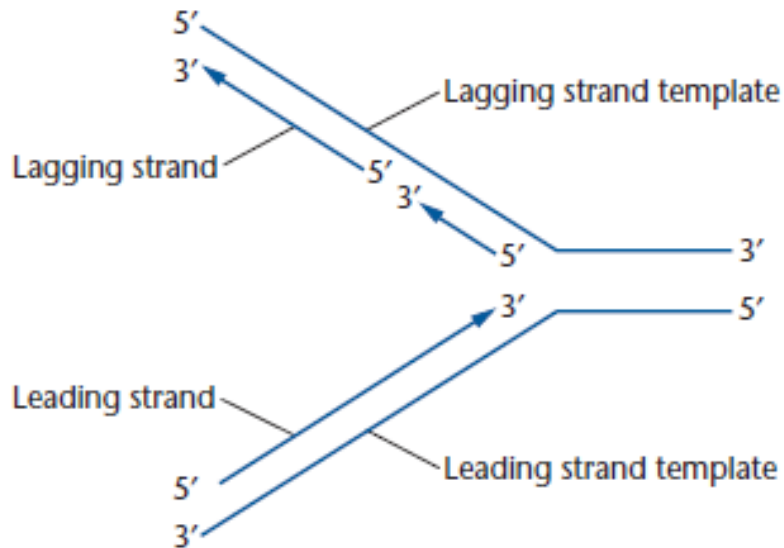
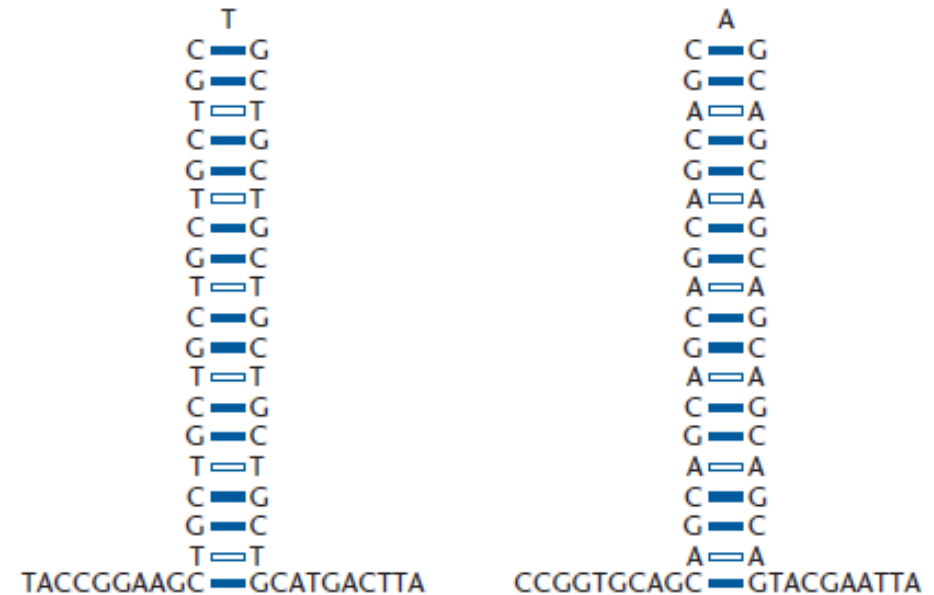
- Genetická anticipace
/ Shermanův paradox
– některé nemoci (HD) jsou vážnější v následujících generacích



Huntingtonova nemoc

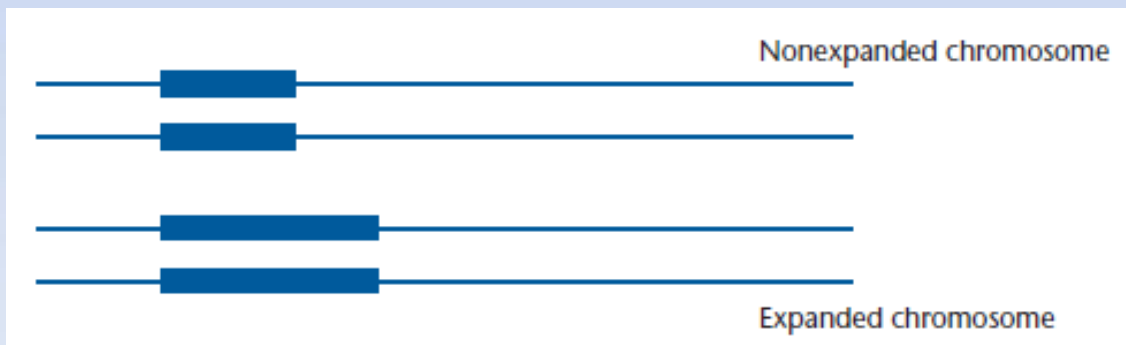
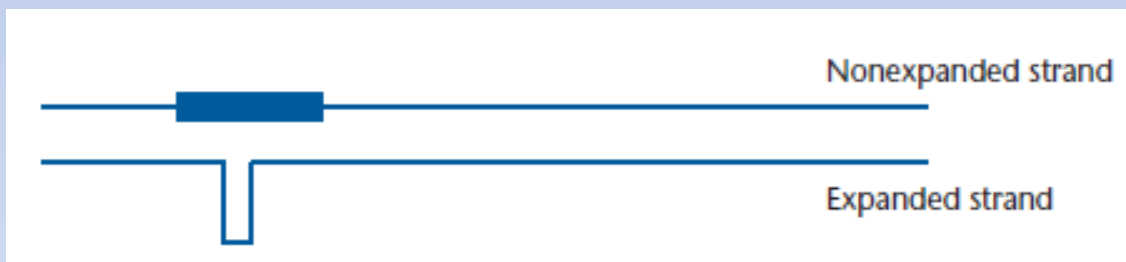
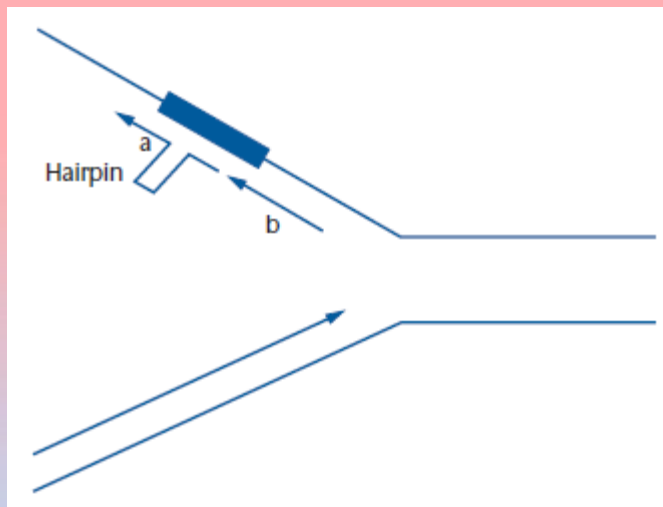
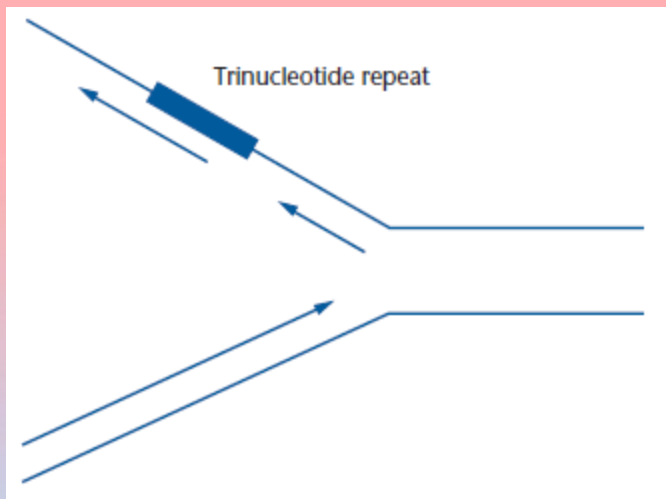
Nestabilita repeticí není plně pochopena

Pravděpodobně odráží vznik vlásenkových smyček (hairpin)



1. vlákno syntetizováno kontinuálně
2. vlákno diskontinuálně

Huntingtonova nemoc



Vlásenka posune začátek opožďujícího se fragmentu (a) → fragment (b) se může replikovat až do míst s repeticí

PolyQ řetězec se nesprávně složí → tvorba agregátů – neurotoxické !!!

Huntingtonova nemoc

Alternativní teorie – produkce polyQ vyplývá neuronální zásoby Gln → snížená syntéza Glu z Gln → inaktivace a ztráta neuronů v CNS používající Glu jako neurotransmitter

Proč některé neurony uniknou poškození i přes syntézu mutantu ?

- specifické proteiny v některých neuronech se váží s huntingtinem
 - huntingtin-associated protein 1 (HAP1)
 - huntingtin-interacting protein 1 (HIP-1)
 - cystathione β -synthase
- HAP1 a HIP-1 – asociovány s cytoskeletem a transportem váčků
- Expanze polyQ může odstranit tyto proteiny z místa účinku



Rozpad cytoskeletu a neuronální degenerace

Závěr

**At' funkční synapse
vám způsobují jen
úsměv !!!**

