

Η σημειακή αλλαγή Ser445Ala στο
γονίδιο GLUD2 της γλουταμικής
αφυδρογονάσης ειδικής για το
νευρικό σύστημα:

Διερεύνηση του πιθανού ρόλου της
στην παθογένεια της Νόσου
Parkinson

Κωνσταντίνος Καναβούρας M.D.
ΜΠΣ Νευροεπιστημών, Ιατρική Σχολή Παν. Κρήτης
MSc Thesis

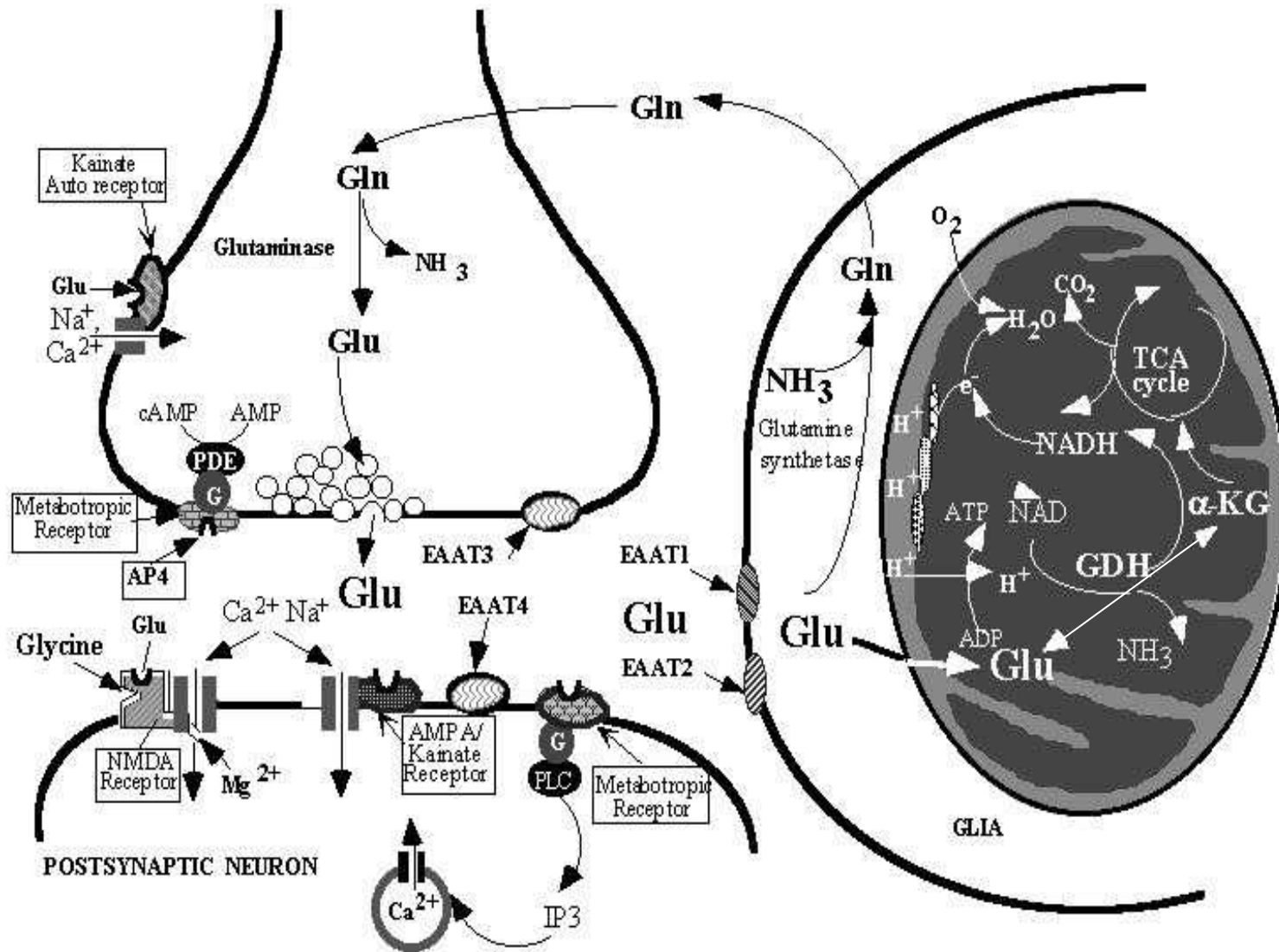
Η νόσος του Parkinson (PD)

- Έχει αναγνωρισμένα γενετικά αίτια σε ποσοστό <10% των ασθενών, αίτια σχετιζόμενα κυρίως με το σύστημα ουμπικιτίνης – πρωτεασώματος. Αυτό αφορά συνήθως την οικογενή PD
- Στη συντριπτική πλειοψηφία των σποραδικών κρουσμάτων, η νόσος θεωρείται πολυπαραγοντικής αιτιολογίας
- Στους αιτιολογικούς παράγοντες πιθανόν να συγκαταλέγονται και διαταραχές της γλουταμεργικής νευροδιαβίβασης και του μεταβολισμού του γλουταμικού οξέος.

Το γλουταμικό οξύ:

- Είναι ο κυριότερος διεγερτικός ΝΔΒ στο ΚΝΣ
- Έχει σημαντικό ρόλο και στις ενεργειακές - μεταβολικές λειτουργίες των κυττάρων
- Ενέχεται στη νευροεκφύλιση μέσω μηχανισμών διεγερτοτοξικότητας, όταν η συγκέντρωσή του στη συναπτική σχισμή είναι υπερβολικά αυξημένη ή/και παρατεταμένης διάρκειας

GLUTAMATERGIC NERVE TERMINAL



(Plaitakis & Shashidharan, 2000)

Οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες της μέλαινας ουσίας (SNpc)

- Δέχονται γλουταματεργική εννεύρωση από το φλοιό και τον υποθαλαμικό πυρήνα (εκφράζουν NMDA, AMPA και mGluR μετασυναπτικούς υποδοχείς)
- Εκφράζουν μετασυναπτικούς EAAT3
- Οι ώριμοι ντοπαμινεργικοί νευρώνες της SNpc εκφράζουν Γλουταμική Αφυδρογονάση (GDH) (Plaitakis & Shashidharan, 2000)

Διαταραχές Γλουταμικού και βλάβες DA-εργικών νευρώνων:

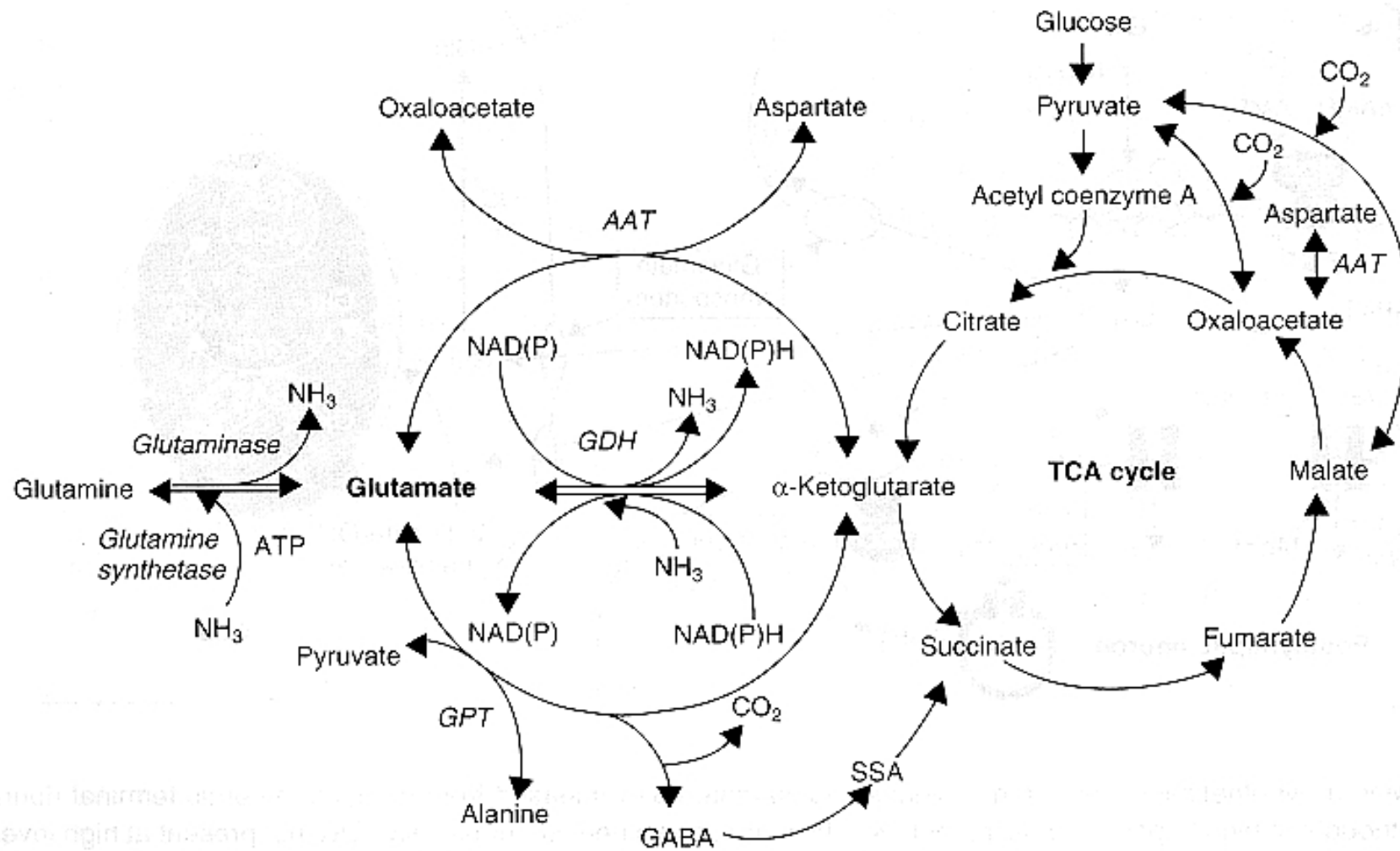
- Σε πειραματικά μοντέλα, η αυξημένη γλουταματεργική νευροδιαβίβαση προς την SNpc προκαλεί εκφυλιστικές αλλοιώσεις στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες (Wright et al., 2004)
- Η αναστολή έκφρασης της GDH σε καλλιέργειες DA-νευρώνων προκαλεί μορφολογικές και λειτουργικές βλάβες (Plaitakis & Shashidharan, 2000)
- Μειωμένη ενζυμική δραστηριότητα της GDH ή/και αυξημένη ποσότητα γλουταμικού στο αίμα παρατηρείται σε διάφορα νευροεκφυλιστικά νοσήματα, μεταξύ αυτών και σε ελαιογεφυροπαρεγκεφαλιδικές ατροφίες με συμμετοχή του μεσεγκεφάλου και παρκινσονική σημειολογία (Plaitakis & Berl 1983, Plaitakis 1984) , αλλά και σε PD (Aubby et al. 1988)

Η γλουταμική αφυδρογονάση (GDH)

- Καταλύει την αναστρέψιμη οξειδωτική απαμίνωση του L-γλουταμικού σε α-κετογλουταρικό οξύ με συνένζυμο το NADH και/ή το NADPH:



- Η φορά της αντίδρασης στις συνήθεις συνθήκες του κυττάρου είναι προς τα δεξιά, μπορεί όμως να αντιστραφεί ανάλογα με τις μεταβολικές ανάγκες του κυττάρου.
- Η ενζυμική δραστηριότητα ρυθμίζεται αλλοστερικά:
 - > ενισχύεται από το ADP, την L-λευκίνη
 - > αναστέλλεται από το GTP



(from Plaitakis et al. 1996)

Η Γλουταμική Αφυδρογονάση:

- Αποτελείται από 6 όμοιες υπομονάδες 505 αμινοξέων
- Υπάρχουν περισσότερα από ένα ισοένζυμα της GDH, που διαφέρουν ως προς τη θερμοαντοχή τους, τις κινητικές-αλλοστερικές τους ιδιότητες και την εντόπισή (Plaitakis et al. 1984, Hussain et al. 1989)
- Έχουν αναγνωριστεί δύο γονίδια: GLUD1 και GLUD2, που διαφέρουν μόνο ως προς 15 αμινοξέα του ενζύμου (Shashidharan et al. 1994)

Τα δύο ισοένζυμα

Glud1 (housekeeping GDH)

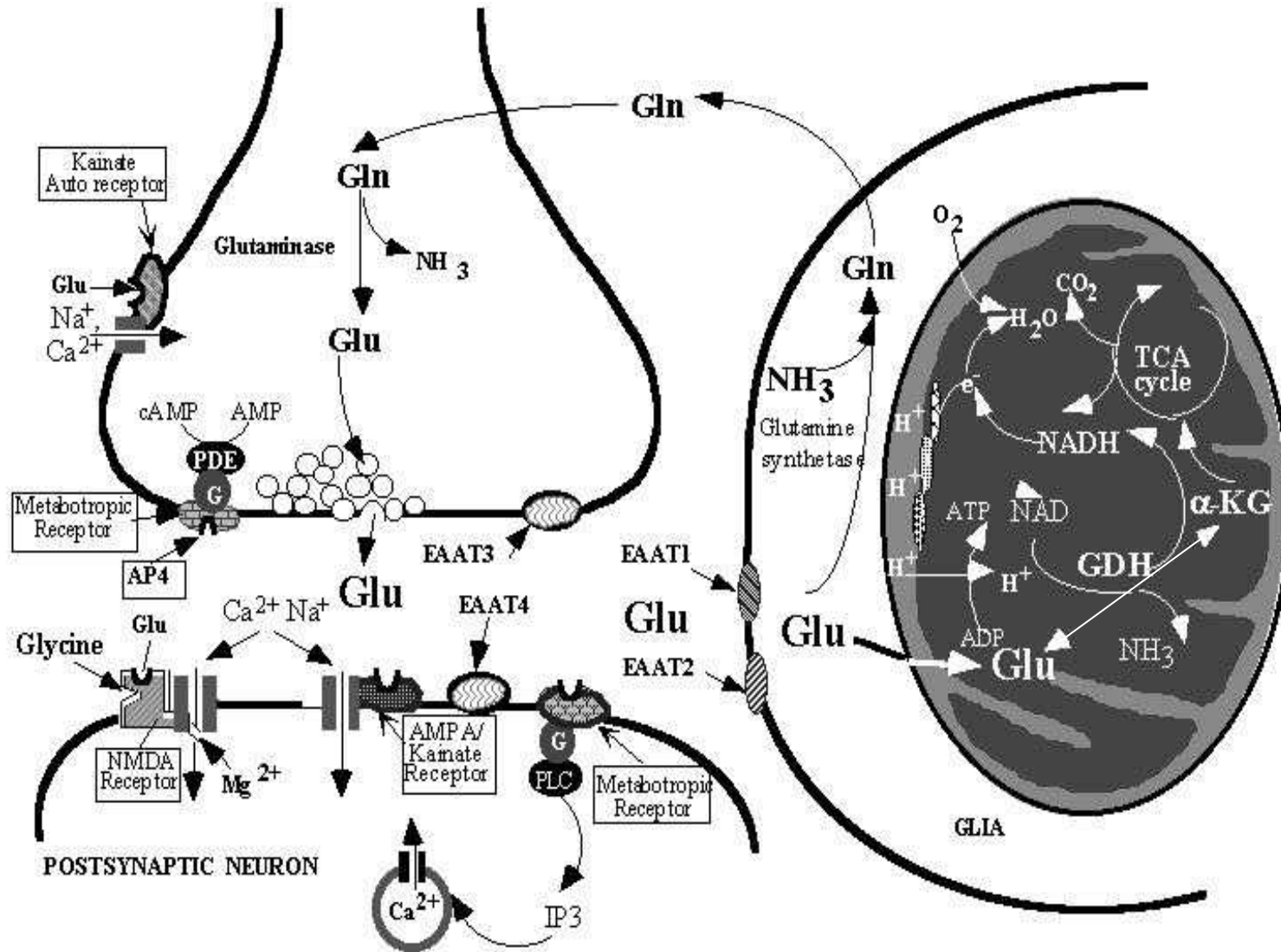
- Γονίδιο με 13 εξόνια, αυτοσωμικό (χρωμ. 10q23)
- Εντοπίζεται σε όλους σχεδόν τους ιστούς
- Θερμοανθεκτικό
- Υψηλή βασική δραστηριότητα σε απουσία αλλοστ. ενεργοποιητών
- Ήπια ενεργοποίηση από το ADP
- Ασθενής συνεργική δράση ADP και L-λευκίνης
- Ισχυρή αναστολή από GTP

Glud2 (ειδική για το Ν.Σ.)

- Γονίδιο χωρίς ιντρόνια, φυλοσύνδετο (χρωμ. Χq25)
- Εντοπίζεται στο νευρικό σύστημα και στους όρχεις
- Θερμοευαίσθητο
- Χαμηλή βασική δραστηριότητα απουσία αλλοστ. ενεργοποιητών
- Ισχυρή ενεργοποίηση από το ADP
- Ισχυρή συνεργική δράση ADP και L-λευκίνης
- Ασθενής αναστολή από GTP

(Plaitakis et al. 2000, Plaitakis & Zaganas 2001)

GLUTAMATERGIC NERVE TERMINAL

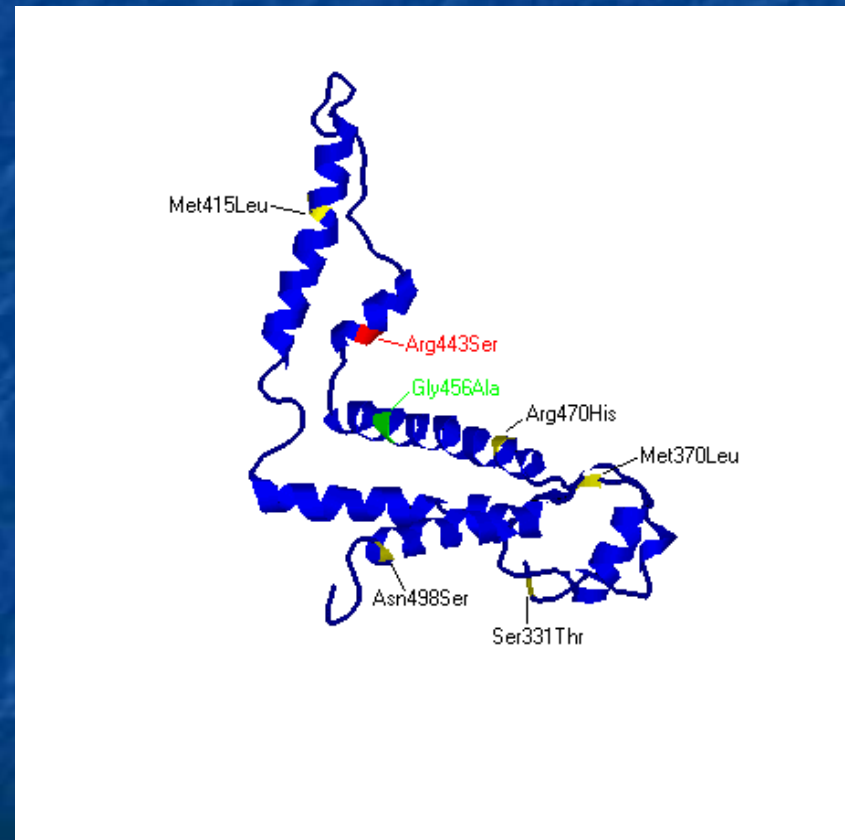
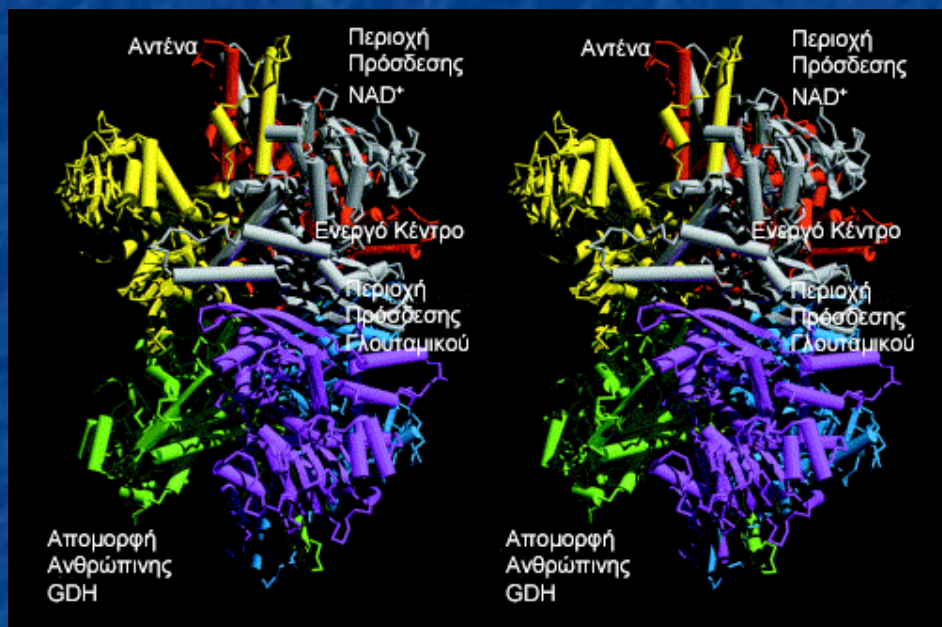


(Plaitakis & Shashidharan, 2000)

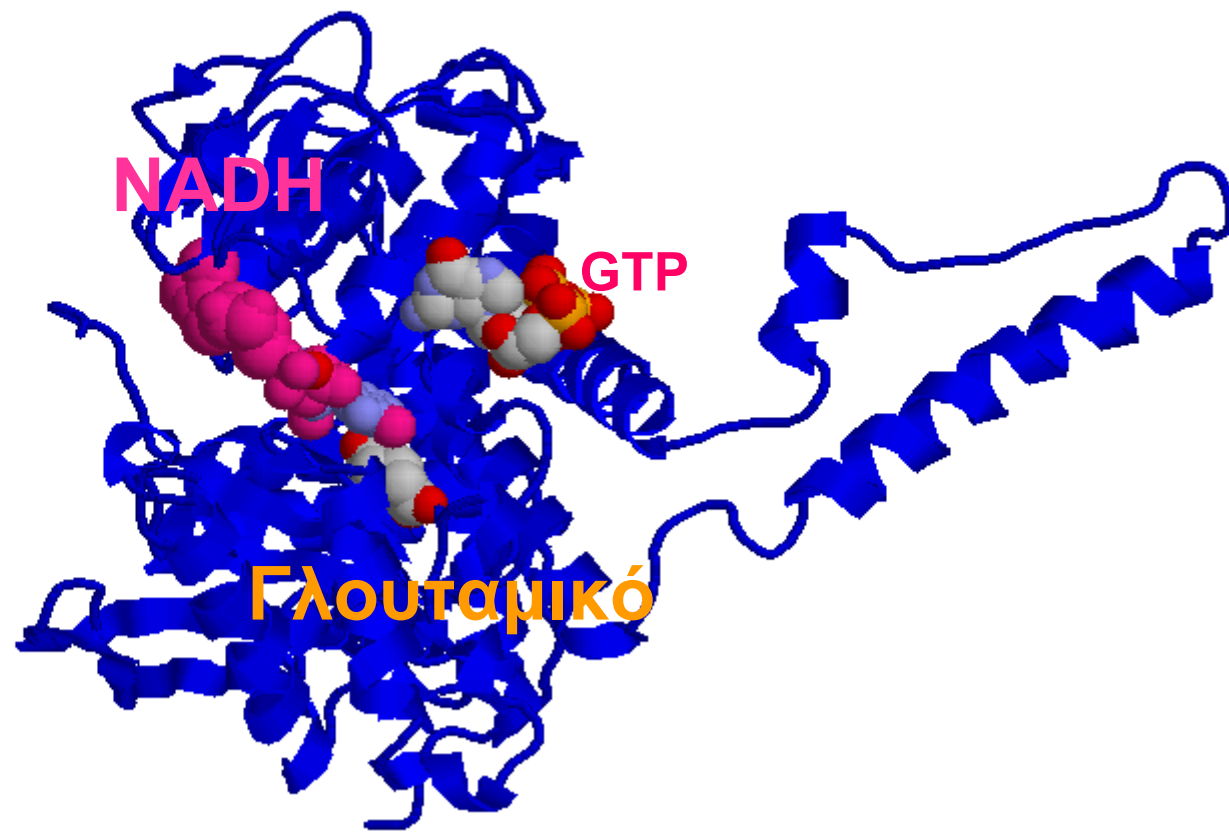
Σημειακές αλλαγές στις αλλοστερικές περιοχές της GDH τροποποιούν σημαντικά τις ιδιότητες του ενζύμου

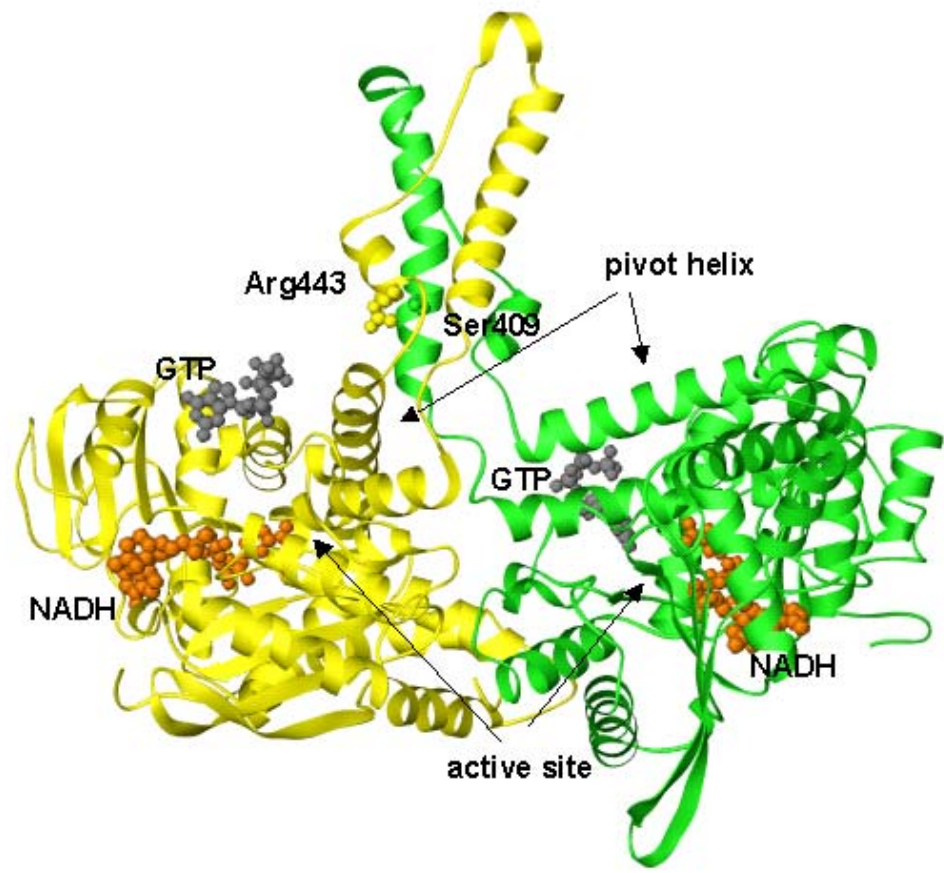
- Η αλλαγή Arg443Ser ευθύνεται για τη χαμηλή βασική δραστηριότητα και την ισχυρή ενεργοποίηση από το ADP της Glud2-GDH (Zaganas et al. 2002)
- Η αλλαγή Gly456Ala ευθύνεται για την μειωμένη αναστολή από το GTP της Glud2-GDH (Zaganas & Plaitakis 2002)
- Σημειακές μεταλλάξεις σε αμινοξέα της αλλοστερικής περιοχής της Glud1-GDH (Phe440, Gln441, Ser445, Gly446, Ser448, Lys450, His454) ευθύνονται για το σύνδρομο Υπερινσουλαιμίας-Υπεραμμωνιαμίας (Kelly & Stanley 2001)

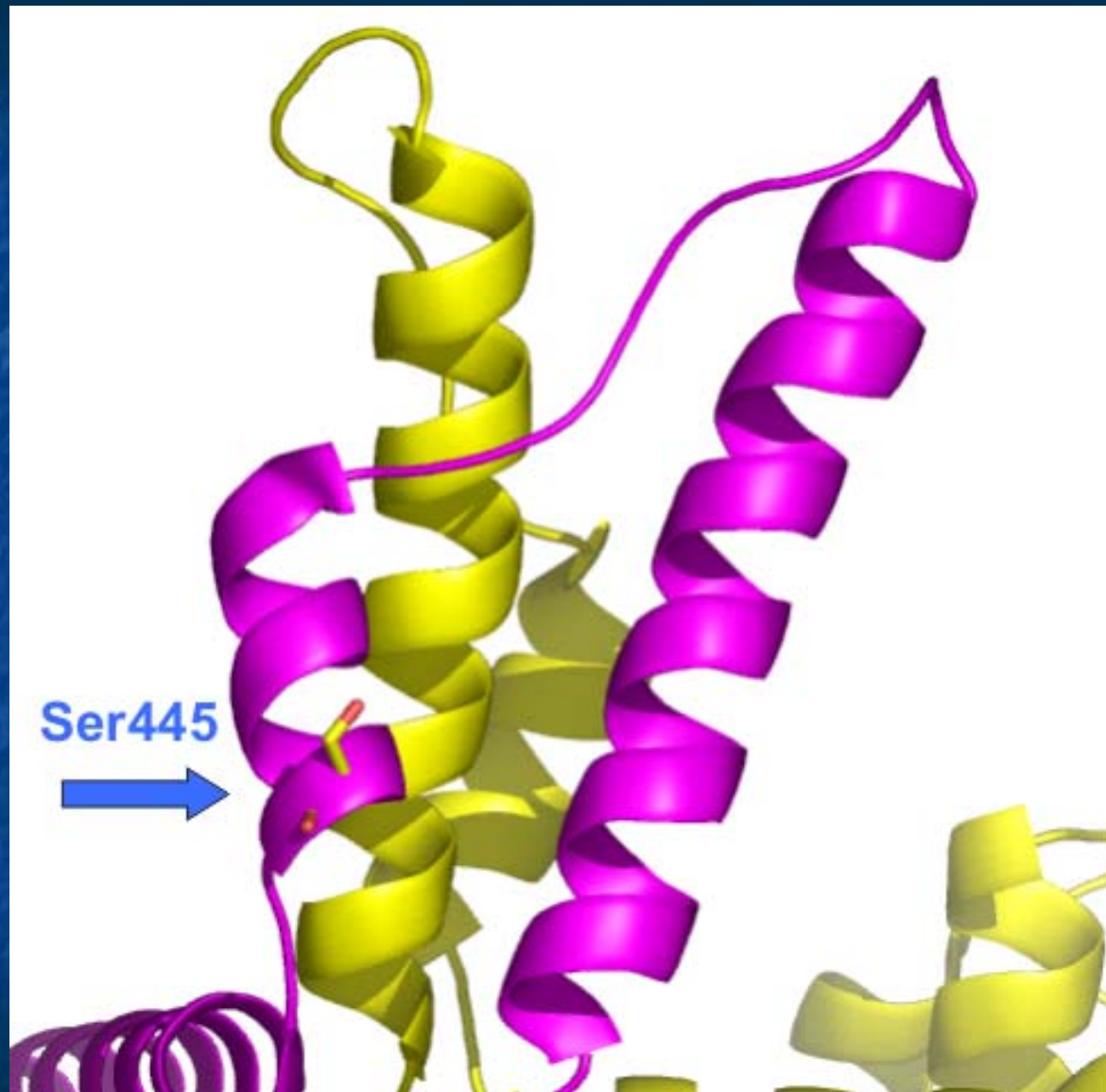
Η αλλοστερική περιοχή της GDH (antenna - pivot helix, εξόνια 11-12 του Glud1)



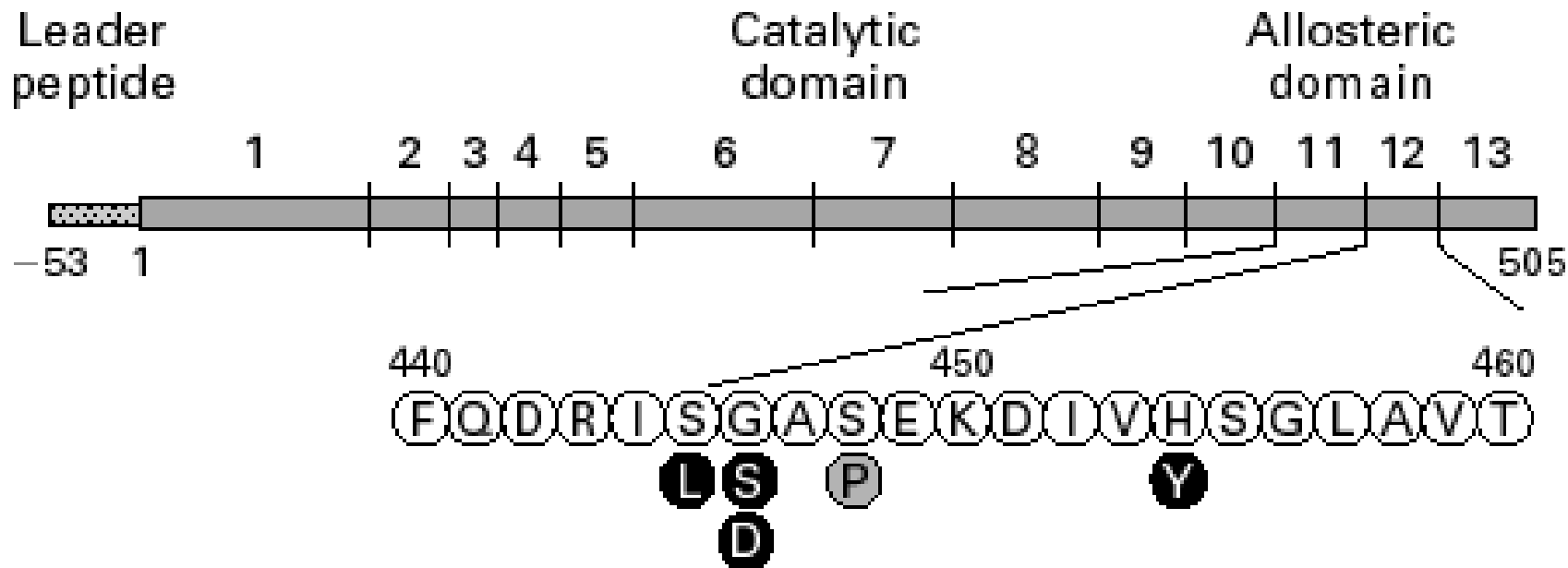
(Βάσει μοντέλου επί της βοείου GDH υπό Peterson & Smith, 1999)







Η μετάλλαξη Ser445Leu στο Glud1 προκαλεί σύνδρομο HI/HA μειώνοντας την ευαισθησία της Housekeeping GDH στην ανασταλτική δράση του GTP και αυξάνοντας τη βασική δραστηριότητα



(Stanley et al. 1998, Kelly & Stanley 2001)

Σημειακή αλλαγή: GLUD2 445 Σερίνη→Αλανίνη

ATATCGGGTGCA



IleSerGlyAla

444 445 446 447

ATAGCGGGTGCA



IleAlaGlyAla

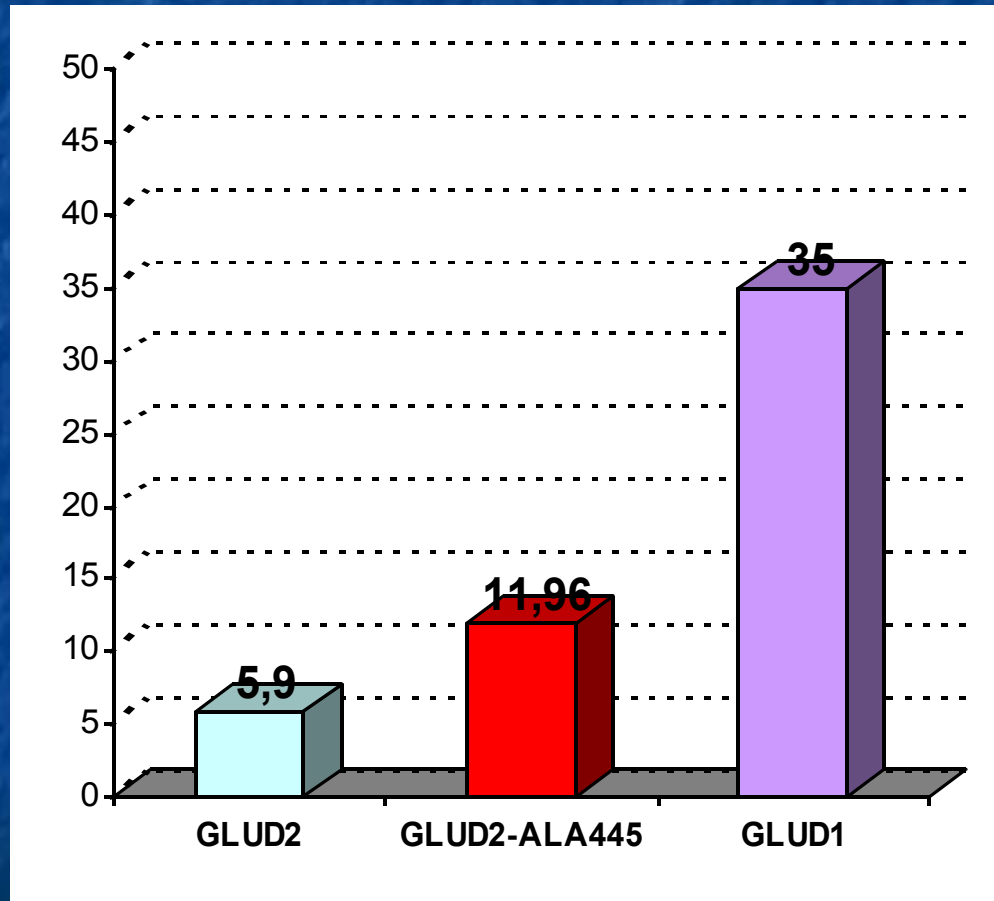
444 445 446 446

Στο Εργαστήριο Μοριακής Γενετικής Νευρολογικών Νοσημάτων :

- Ανιχνεύθηκε αυξημένη συχνότητα της σημειακής αλλαγής GLUD2 Ser445Ala σε ασθενείς με ALS (3 από 70 ασθενείς, έναντι 0 από 150 στην ομάδα ελέγχου)
- Σε πρώτες ενζυμικές μελέτες διαπιστώθηκε αύξηση βασικής δραστηριότητας σε Glud2-GDH πρωτεΐνη με τη μετάλλαξη Ser445Ala

(αδημοσίευτες παρατηρήσεις του εργαστηρίου)

Κινητικές μελέτες: Βασική δραστηριότητα ισοενζύμων ως ποσοστό επί της μέγιστης δραστηριότητας



(αδημοσίευτες παρατηρήσεις του εργαστηρίου)

Στόχος:

- Να ελεγχθούν ως προς την παρουσία της σημειακής αλλαγής ala445ser ομάδα ασθενών με Νόσο του Πάρκινσον και ομάδα ελέγχου υγιών ατόμων αντίστοιχης ηλικίας και προέλευσης
- Ακολούθως, να αναζητηθεί πιθανή στατιστική συσχέτιση της σημειακής αλλαγής με τη Νόσο του Πάρκινσον

Υλικό:

- 224 κρητικής καταγωγής ασθενείς με Ν. Πάρκινσον
- 227 άτομα κρητικής καταγωγής με ιστορικό ελεύθερο νευρολογικών νοσημάτων

- Από ολικό αίμα διαχωρίστηκαν τα λευκά αιμοσφαίρια και απομονώθηκε το DNA με το kit ενζύμων της Qiagen™
- Με τη βοήθεια του φασματοφωτομέτρου έγιναν αραιώσεις του DNA σε συγκεντρώσεις 50-60 ng/λ
- Έγινε PCR-amplification της περιοχής του γονιδίου γύρω από τη θέση της σημειακής αλλαγής.

Η περιοχή του GLUD2 που πολλαπλασιάστηκε με PCR επελέγη με κριτήρια:

- Να αφορά >1 εξόνια του γονιδίου GLUD1
- Να αποφευχθεί η PCR-amplification όλων των γνωστών ψευδογονιδίων (κυρίως του GLUDP4)
- Να υπερκαλύπτει την encoding region των GLUD1 & GLUD2, για να αποφευχθεί ο κίνδυνος επιμόλυνσης με πλασμιδιακό υλικό.

Primers: 5'-TGAATGCTGGAGGAGTGACA-3' (sense)

5'-TGGATTGACTTGAGAATGG-3' (antisense)

283 Ser Ile Trp Asn Pro Asp Gly Ile Asp Pro Lys Glu Leu Glu Asp Phe Lys Leu Gln His
 AGT ATA TGG AAT CCA GAT GGT ATT GAC CCA AAG GAA CTG GAA GAC TTC AAA TTG CAA CAT
 303 Gly Ser Ile Leu Gly Phe Pro Lys Ala Lys Pro Tyr Glu Gly Ser Ile Leu Glu Val Asp
 GGG TCC ATT CTG GGC TTC CCC AAG GCA AAG CCC TAT GAA GGA AGC ATC TTG GAG GTC GAC
 323 Cys Asp Ile Leu Ile Pro Ala Ala Thr Glu Lys Gln Leu Thr Lys Ser Asn Ala Pro Arg
 TGT GAC ATA CTG ATC CCA GCT GCC ACT GAG AAG CAG TTG ACC AAA TCC AAC GCA CCC AGA
 343 Val Lys Ala Lys Ile Ile Ala Glu Gly Ala Asn Gly Pro Thr Thr Pro Glu Ala Asp Lys
 GTC AAA GCC AAG ATC ATT GCT GAA GGT GCC AAT GGG CCA ACA ACT CCA GAA GCT GAT AAG
 363 Ile Phe Leu Glu Arg Asn Ile Leu Val Ile Pro Asp Leu Tyr Leu Asn Ala Gly Gly Val
 ATC TTC CTG GAG AGA AAC ATT TTG GTT ATT CCA GAT CTC TAC **TTG AAT GCT GGA GGA GTG**
 383 Thr Val Ser Tyr Phe Glu Trp Leu Lys Asn Leu Asn His Val Ser Tyr Gly Arg Leu Thr
ACA GTA TCT TAC TTT GAG TGG CTG AAG AAT CTA AAT CAT GTC AGC TAT GGC CGT TTG ACC
 403 Phe Lys Tyr Glu Arg Asp Ser Asn Tyr His Leu Leu Leu Ser Val Gln Glu Ser Leu Glu
 TTC AAA TAT GAA AGG GAT TCT AAC TAC CAC TTG CTC CTG TCT GTT CAA GAG AGT TTA GAA
 423 Arg Lys Phe Gly Lys His Gly Gly Thr Ile Pro Ile Val Pro Thr Ala Glu Phe Gln Asp
 AGA AAA TTT GGAAAG CAT GGT GGA ACT ATT CCC ATT GTA CCC ACG GCA GAG TTC CAA GAC
 443 Ser Ile Ser * Gly Ala Ser Glu Lys Asp Ile Val His Ser Ala Leu Ala Tyr Thr Met Glu
 AGT ATA **TCG** GGT GCA TCT GAG AAA GAC ATT GTG CAC TCT GCC TTG GCA TAC ACA ATG GAG
 463 Arg Ser Ala Arg * Gln Ile Met His Thr Ala Met Lys Tyr Asn Leu Gly Leu Asp Leu Arg
 CGT TCT GCC AGG CAA ATT ATG CAC ACA GCC ATG AAG TAT AAC CTG GGA TTG GAC CTG AGA
 483 Thr Ala Ala Tyr Val Asn Ala Ile Glu Lys Val Phe Lys Val Tyr Ser Glu Ala Gly Val
 ACA GCT GCC TAT GTC AAT GCC ATT GAA AAA GTC TTC AAA GTG TAC AGT GAA GCT GGT GTG
 503 Thr Phe Thr -----
 ACC TTC ACA TAG ATG GAT CAT GGC TGA CTT CCT CAC TAA CCT CTT CAC GTG TAA CTT CTG

 CAGACCTACCACAAGTTTACATGTAACCACAGAAATCCCTTTCTCTCCTGACTCATTACT

 AATGGATA**CCATTCTCAACAAGTCAATCCA**AATCAGCCCGTTAAGGAGAAAGAAATTAAT

 ATACAAGCTGAGTGTGAAAGTAGAAATCACCTACACCAGAGAGCTATTTTGGTATTTTGC

Digestion:

- Σε παρουσία της σημειακής αλλαγής T→G, το προϊόν της PCR (μήκους 527bp) μπορεί να κοπεί ακριβώς πάνω στο σημείο της μετάλλαξης σε δύο τμήματα (μήκους 204bp και 323bp αντίστοιχα) από τη νουκλεάση **Aci I**

(recognition site 5'...GCGG...3')

283 Ser Ile Trp Asn Pro Asp Gly Ile Asp Pro Lys Glu Leu Glu Asp Phe Lys Leu Gln His
AGT ATA TGG AAT CCA GAT GGT ATT GAC CCAAAG GAA CTG GAA GAC TTC AAA TTG CAA CAT

303 Gly Ser Ile Leu Gly Phe Pro Lys Ala Lys Pro Tyr Glu Gly Ser Ile Leu Glu Val Asp
GGG TCC ATT CTG GGC TTC CCC AAG GCAAAG CCC TAT GAA GGA AGC ATC TTG GAG GTC GAC

323 Cys Asp Ile Leu Ile Pro Ala Ala Thr Glu Lys Gln Leu Thr Lys Ser Asn Ala Pro Arg
TGT GAC ATA CTG ATC CCA GCT GCC ACT GAG AAG CAG TTG ACC AAA TCC AAC GCA CCC AGA

343 Val Lys Ala Lys Ile Ile Ala Glu Gly Ala Asn Gly Pro Thr Thr Pro Glu Ala Asp Lys
GTC AAA GCC AAG ATC ATT GCT GAA GGT GCC AAT GGG CCA ACA ACT CCA GAA GCT GAT AAG

363 Ile Phe Leu Glu Arg Asn Ile Leu Val Ile Pro Asp Leu Tyr Leu Asn Ala Gly Gly Val
ATC TTC CTG GAG AGA AAC ATT TTG GTT ATT CCA GAT CTC TAC **TG AAT GCT GGA GGA GTG**

383 Thr Val Ser Tyr Phe Glu Trp Leu Lys Asn Leu Asn His Val Ser Tyr Gly Arg Leu Thr
ACA GTA TCT TAC TTT GAG TGG CTG AAG AAT CTA AAT CAT GTC AGC TAT GGC CGT TTG ACC

403 Phe Lys Tyr Glu Arg Asp Ser Asn Tyr His Leu Leu Leu Ser Val Gln Glu Ser Leu Glu
TTC AAA TAT GAA AGG GAT TCT AAC TAC CAC TTG CTC CTG TCT GTT CAA GAG AGT TTA GAA

423 Arg Lys Phe Gly Lys His Gly Gly Thr Ile Pro Ile Val Pro Thr Ala Glu Phe Gln Asp
AGA AAA TTT GGA AAG CAT GGT GGA ACT ATT CCC ATT GTA CCC ACG GCA GAG TTC CAA GAC

443 Ser Ile Ser Gly Ala Ser Glu Lys Asp Ile Val His Ser Ala Leu Ala Tyr Thr Met Glu
AGT ATA GCG GGT GCA TCT GAG AAA GAC ATT GTG CAC TCT GCC TTG GCA TAC ACA ATG GAG

463 Arg Ser Ala Arg Gln Ile Met His Thr Ala Met Lys Tyr Asn Leu Gly Leu Asp Leu Arg
CGT TCT GCC AGG CAA ATT ATG CAC ACA GCC ATG AAG TAT AAC CTG GGA TTG GAC CTG AGA

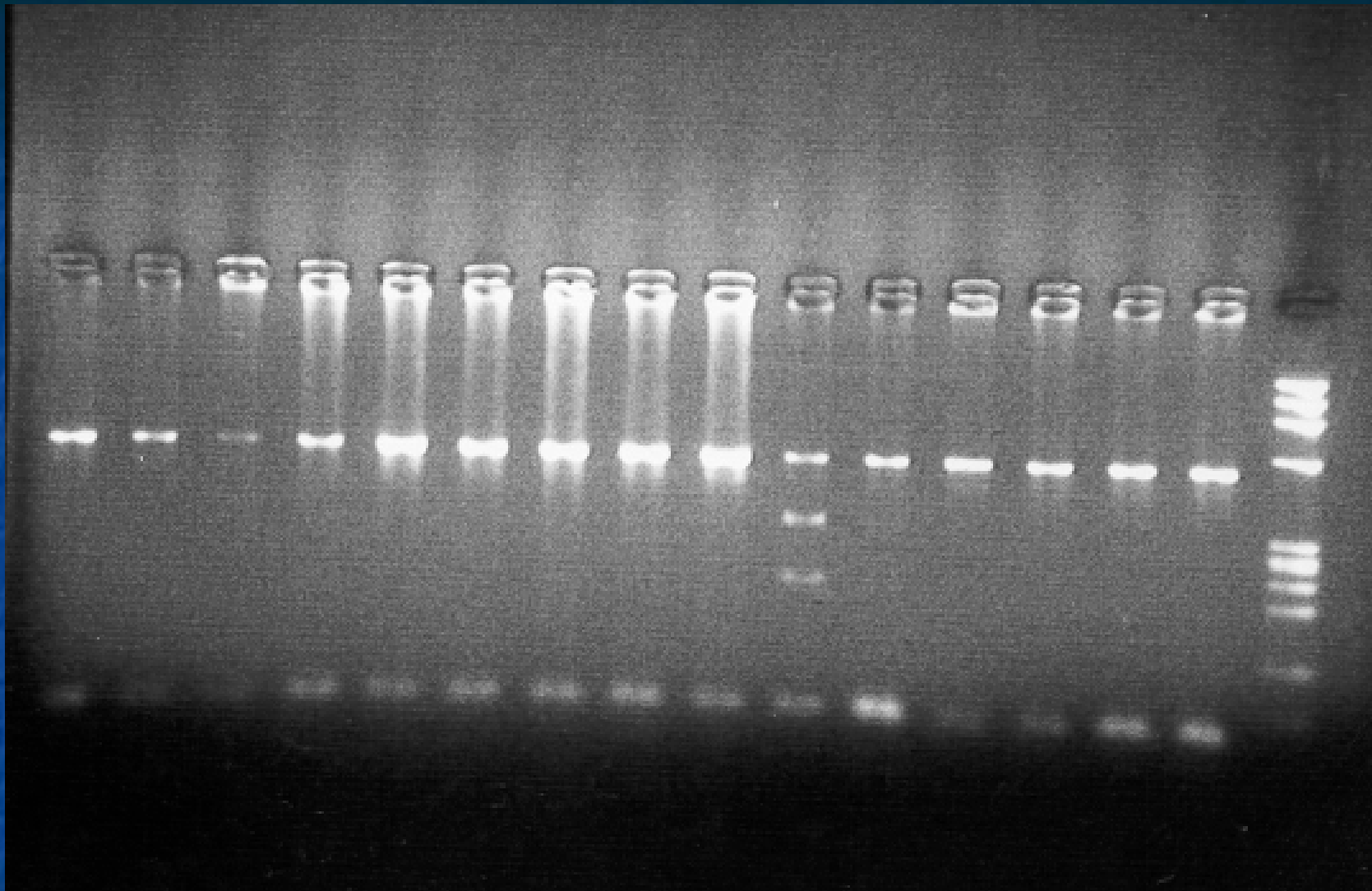
483 Thr Ala Ala Tyr Val Asn Ala Ile Glu Lys Val Phe Lys Val Tyr Ser Glu Ala Gly Val
ACA GCT GCC TAT GTC AAT GCC ATT GAA AAA GTC TTC AAA GTG TAC AGT GAA GCT GGT GTG

503 Thr Phe Thr -----
ACC TTC ACA TAG ATG GAT CAT GGC TGA CTT CCT CAC TAA CCT CTT CAC GTG TAA CTT CTG

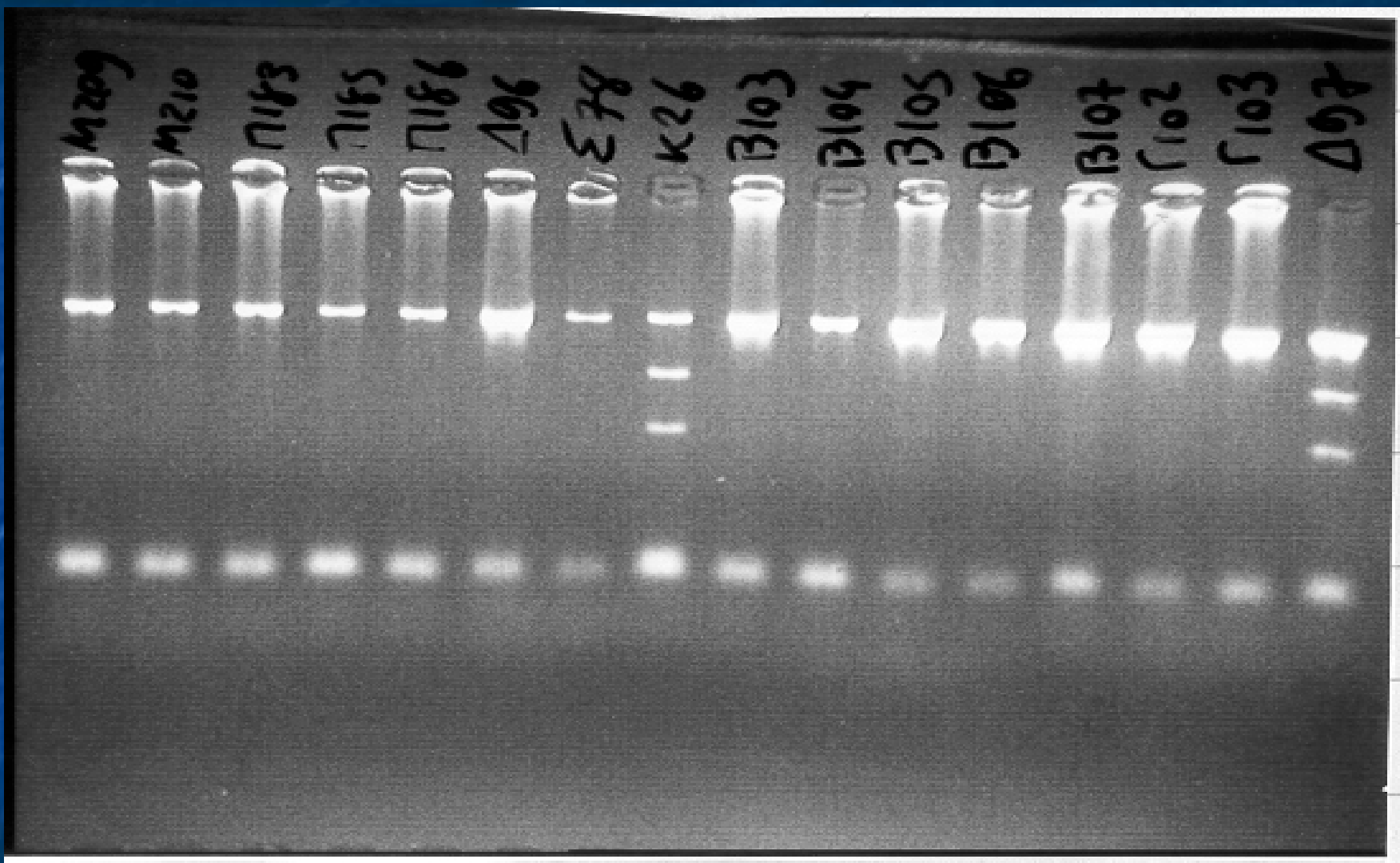
CAGACCTACCACAAGTTTACATGTAACCACAGAAATCCCTTTCTCTCCTGACTCATTACT

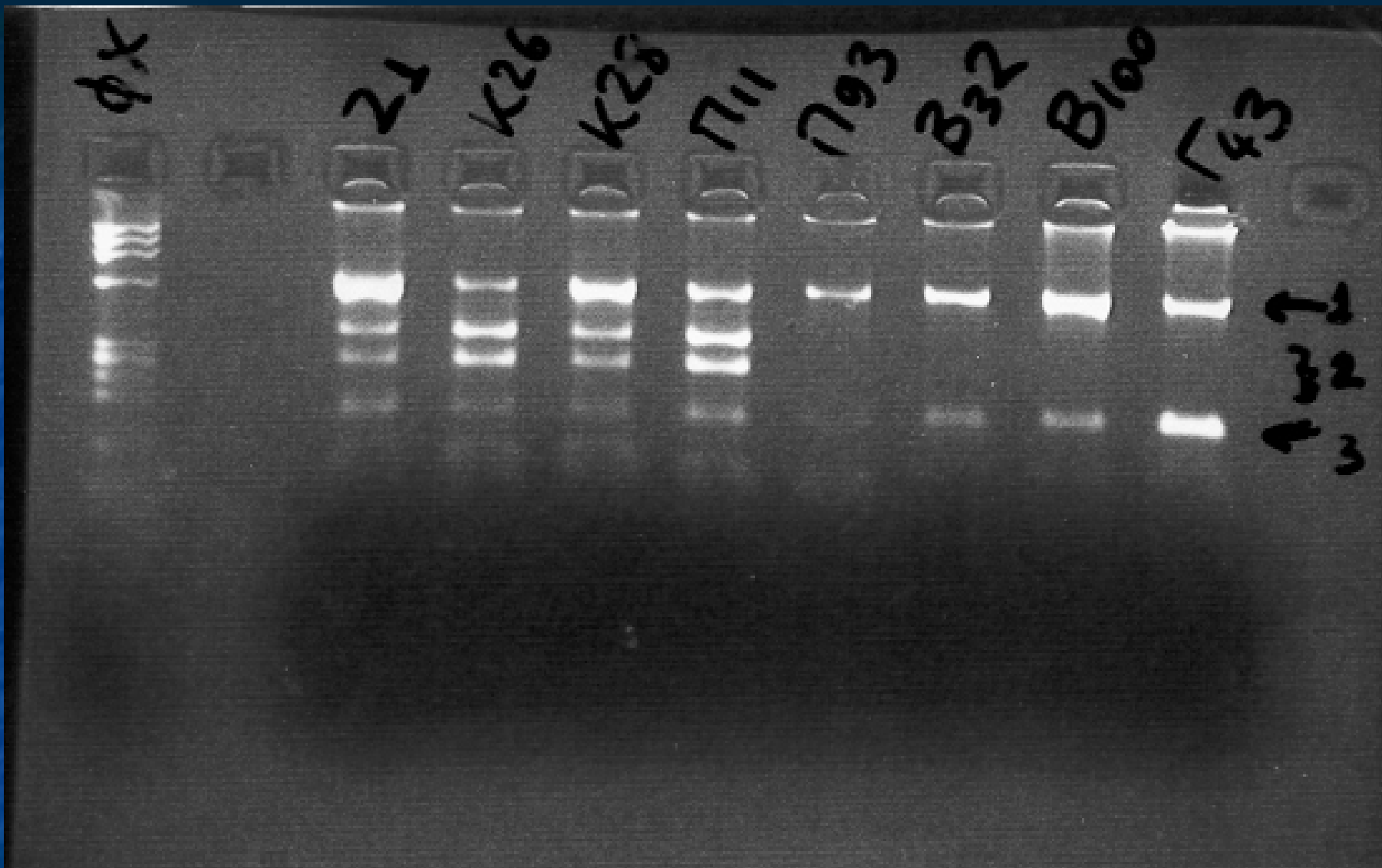
AATGGATACCATTCTCAACAAGTCAATCCAAATCAGCCCGTTAAGGAGAAAGAAATTAAT

ATACAAGCTGAGTGTGAAAGTAGAAATCACCTACACCAGAGAGCTATTTTGGTATTTTGC



Λόγω της διαφοράς (~120bp) στο μέγεθός τους, τα προϊόντα της ενζυμικής πέψης διαχωρίζονται εύκολα με ηλεκτροφόρηση σε πυκνή γέλη αγαρόζης

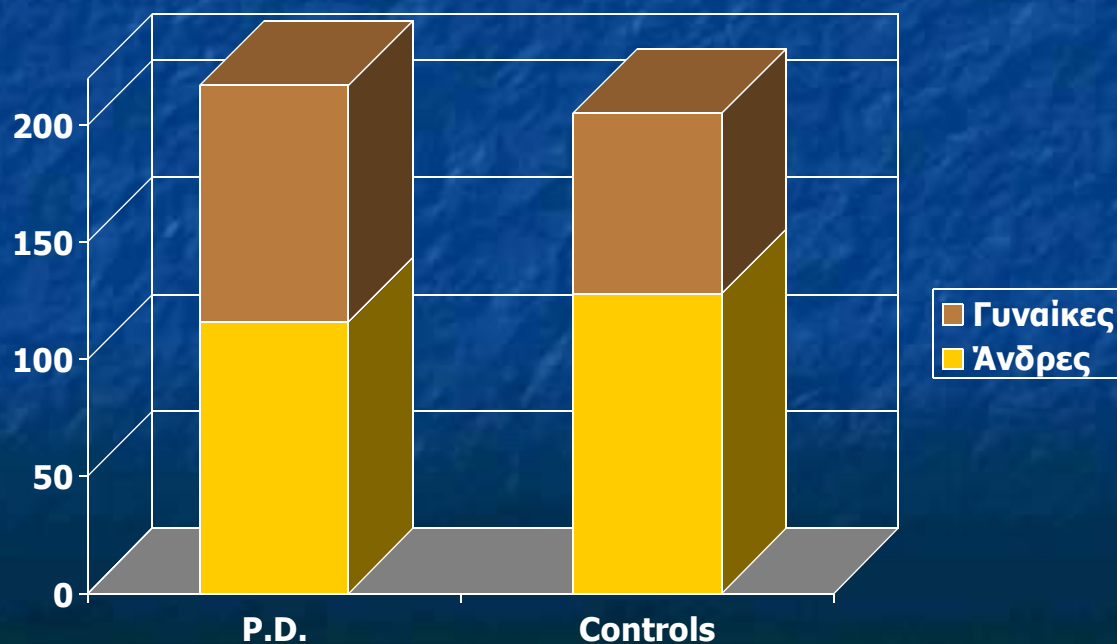




Η αξιοπιστία της μεθόδου ελέγχθηκε συγκρίνοντας τα αποτελέσματά με αυτά της αλληλούχισης (sequencing) που είχε ήδη διενεργηθεί σε μερικά θετικά και αρνητικά δείγματα.

Ολοκλήρωσαν τη μελέτη:

- 217 ασθενείς με PD (101 γυναίκες, 116 άνδρες) μέσης ηλικίας 73,2 ($\pm 10,9$) ετών
- 205 άτομα δίχως ιστορικό νευρολογικών νοσημάτων (77 γυναίκες, 128 άνδρες) μέσης ηλικίας 71,1 ($\pm 8,5$) ετών



Βρήκαμε για την αλλαγή Ser445Ala:

- **7 θετικά δείγματα (4 γυναίκες, 3 άνδρες) στους PD-ασθενείς**
(Συχνότητα πολυμορφισμού 2,2%)
- **11 θετικά δείγματα (7 γυναίκες, 4 άνδρες) στην ομάδα ελέγχου**
(Συχνότητα πολυμορφισμού 3,9%)

Σημ: Όλες οι γυναίκες βρέθηκαν ετερόζυγες για τη μετάλλαξη

- Οι παραπάνω συχνότητες δείχνουν να μην έχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές:

Uncorrected χ^2 [(+)/(-)] [PD/controls] ανεξαρτήτως φύλου: $p=0.276$

Uncorrected χ^2 [(+)/(-)] [PD/controls] ανδρών: $p=0.8$

- Παρατηρήσαμε ωστόσο ότι η ηλικία έναρξης της νόσου και στους 3 θετικούς για την σημειακή αλλαγή παρκινσονικούς άνδρες ήταν μικρή ($47 \pm 4,4$ έτη) σε σχέση:

- με το σύνολο των ασθενών ανεξαρτήτως φύλου ($64 \pm 10,1$ έτη)
- με το σύνολο των γυναικών (65 ± 10 έτη) και των ανδρών ($64,1 \pm 10$ έτη)
- με τις 4 θετικές γυναίκες ασθενείς ($68,3 \pm 8,5$ έτη)
- με τους 113 αρνητικούς άνδρες ασθενείς ($63,9 \pm 10,5$ έτη)

Ελέγξαμε λοιπόν στους τη συσχέτιση για την ηλικία έναρξης:

student's t-test ηλικίας έναρξης (+)/(-) ανδρών: $p=0.00364$

student's t-test ηλικίας έναρξης (+)/(-) γυναικών: $p=0.268$

student's t-test ηλικίας έναρξης (+)ανδρών/(+)γυναικών: $p=0.00563$

Συμπεράσματα της μελέτης :

- Η σημειακή αλλαγή Ser445Ala στο γονίδιο της Glud2 δεν δείχνει να σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για Ν. Πάρκινσον, ούτε σε ετερόζυγες γυναίκες, ούτε σε ημίζυγους άνδρες.
- Στους άνδρες ημίζυγους για τη αλλαγή Ser445Ala (δεν έχουμε στοιχεία για ομόζυγες γυναίκες), φαίνεται η αλλαγή να σχετίζεται με μικρότερη ηλικία έναρξης
- Περαιτέρω έρευνες τόσο πάνω στην επιδημιολογία της αλλαγής Ser445Ala, όσο και στους μοριακούς μηχανισμούς ρύθμισης της ειδικής για το νευρικό σύστημα GDH και του πιθανού επηρεασμού αυτών από τη σημειακή αλλαγή, αναμένεται να αποσαφηνίσουν το πώς τροποποιεί την ηλικία έναρξης της Ν. Πάρκινσον ή και άλλων νευροεκφυλιστικών νοσημάτων.