

Mechanismen funktioneller Varianten: die Liste wächst

Martin Hersberger

**Abteilung für Klinische Chemie und Biochemie
Universitäts-Kinderspital Zürich**

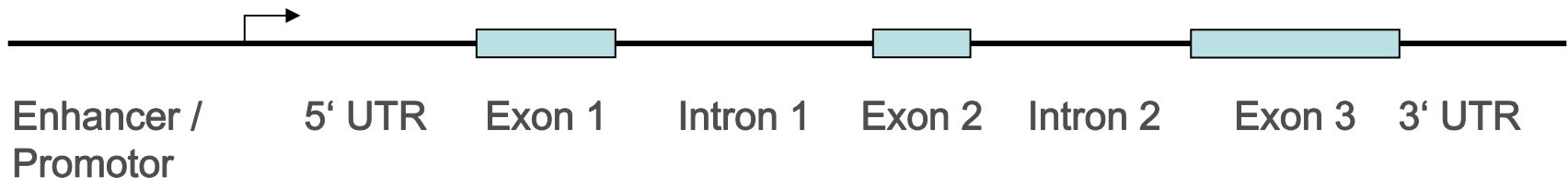
Genetische Varianten gestern

Funktionelle Varianten mit Auswirkung:

- in regulatorischen oder codierenden Regionen

Varianten „ohne“ Auswirkung:

- synonyme Variationen
- in Intronsequenzen oder ...
- in restlichen 97 - 99% des nicht codierenden Genoms



Die Liste der funktionellen Varianten wächst

Nicht synonyme Varianten

<u>Variation</u>	<u>DNA</u>	<u>Protein</u>
Faktor V Leiden (Thrombophilie)	G1691A	Arg506Gly R506G
ApoB 43.7 (Fam. Hypobetalip.)	C6162T	R1986X

Nicht synonyme Varianten

(PLoS Genet. 2008 Aug 15;4(8):e1000160)

Es sind 10'000 nicht synonyme SNPs in Dr. Venter's und Dr. Watson's Exomes vorhanden

700 - 1'500 dieser nsSNP sind unbekannt

14 - 20% dieser nsSNPs verändern voraussichtlich die Proteinfunktion



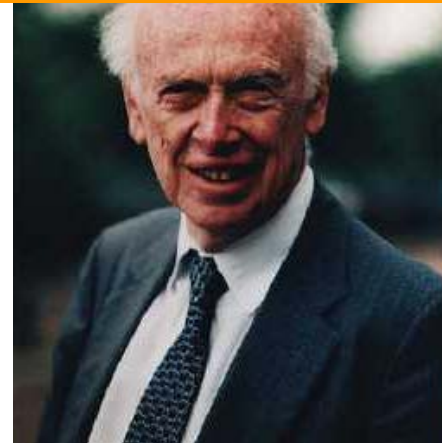
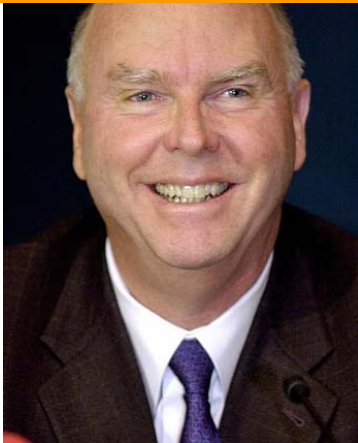
Nicht synonyme Varianten

(PLoS Genet. 2008 Aug 15;4(8):e1000160)

Es sind 10'000 nicht synonyme SNPs in Dr. Venter's und Dr. Watson's Exomes vorhanden

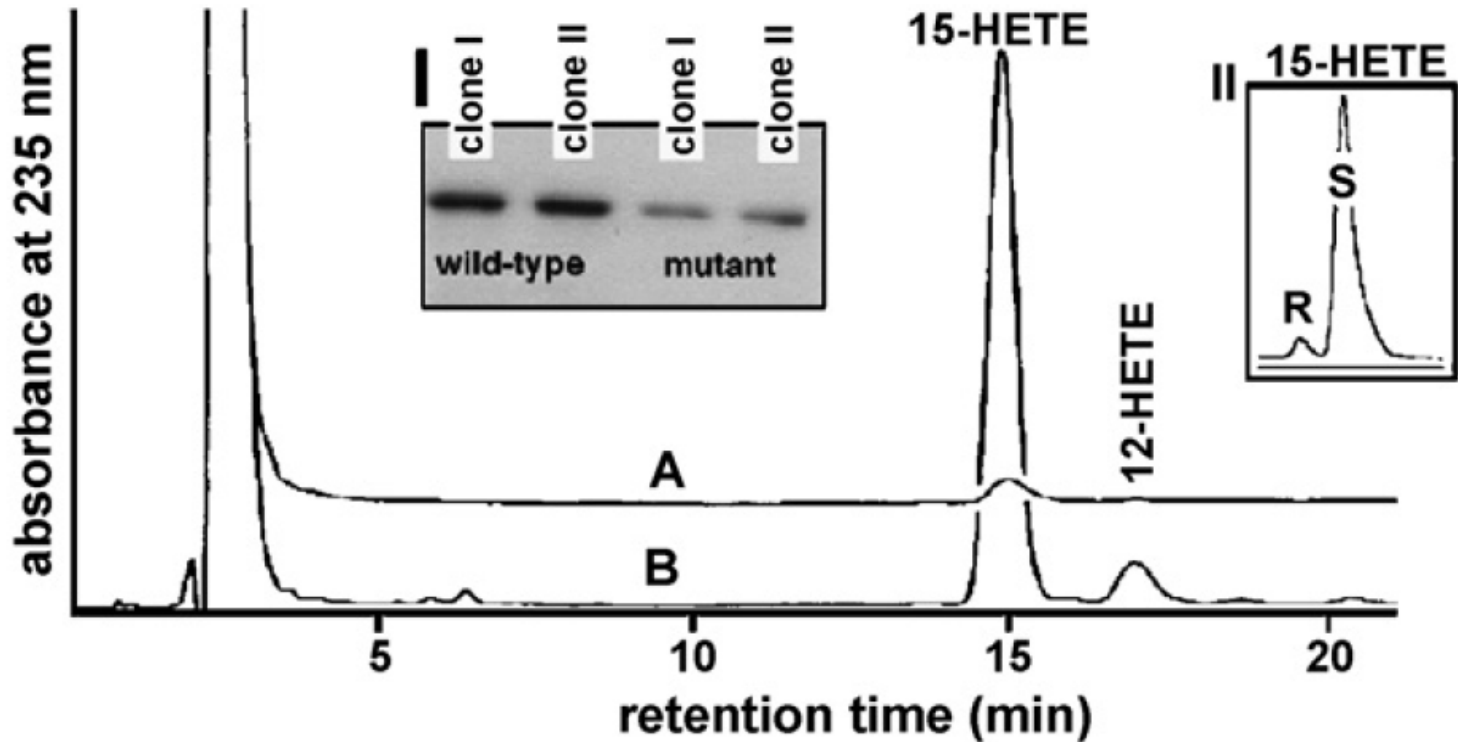
Welche Risikoprädiktion können wir für Dr. Venter abgeben?

Er hat ein erhöhtes Risiko für Essstörungen (BDNF), ein 1.5-fach vermindertes Risiko für ein Multiples Myelom (LIG4), ein erhöhtes Risiko für Prostatakrebs, das durch Vitamin E Gabe ausgeglichen werden kann (SOD2) und eine Tendenz für Allergien (SPINK5)



Met560Thr führt zum Verlust der ALOX15 Aktivität

(Atherosclerosis. 2008 May;198(1):136-44)



Aktivität von rekombinantem Protein aus E. coli

Assoziation von Met560Thr im ALOX15 Gen mit koronarer Herzkrankheit

(Atherosclerosis. 2008 May;198(1):136-44 / Atherosclerosis. 2009 Jul;205(1):192-6)

ADVANCE (n = 3169) OR (95% CI) p-value

ALOX15 Met560Thr	1.62	0.02
------------------	------	------

Case-Control Studie: symptomatische frühe koronare Herzkrankheit, ältere Patienten mit stabiler Angina oder nach Herzinfarkt

ARIC (n = 12974) OR (95% CI) p-value

ALOX15 Met560Thr	1.31	0.06
------------------	------	------

Prospektive Studie: Herzinfarkt, koronare Bypassoperation, un stabile Angina, oder Tod durch koronares Ereignis

KORA (n = 2629) OR (95% CI) p-value

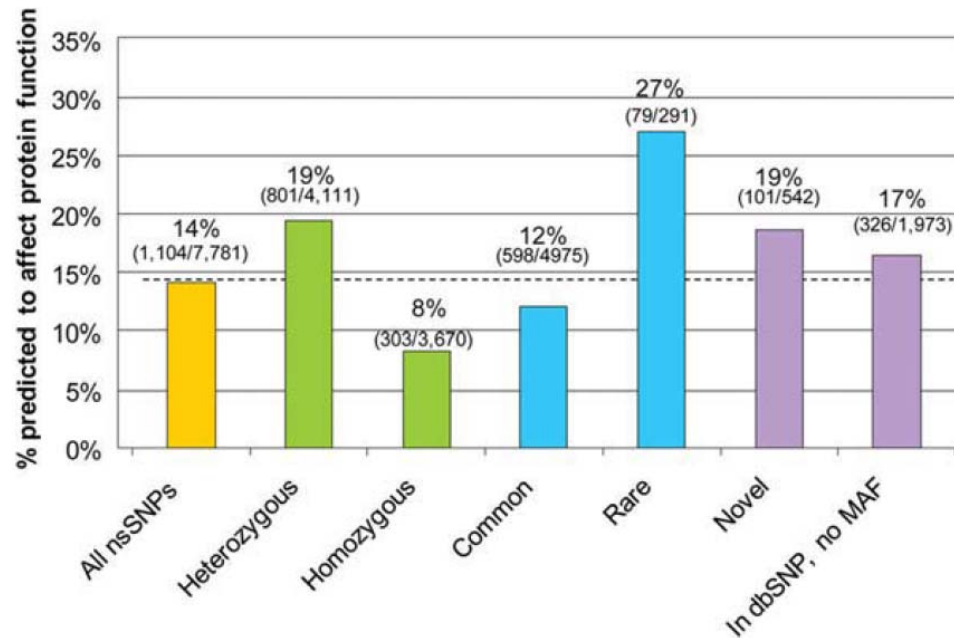
ALOX15 Met560Thr	1.73 (0.43–2.30)	0.06
------------------	------------------	------

Case-Control Studie: Herzinfarkt

MAF: 8 % in Lateinamerikanern, 1.2 % in Kaukasiern und 0 in Asiaten

Neue, seltene und heterozygote SNPs verändern wahrscheinlich die Proteinfunktion

(PLoS Genet. 2008 Aug 15;4(8):e1000160)



Andere genomweite Studien unterstützen, dass seltene SNPs einen schädlicheren Einfluss auf die Proteinfunktion haben, als häufige SNPs

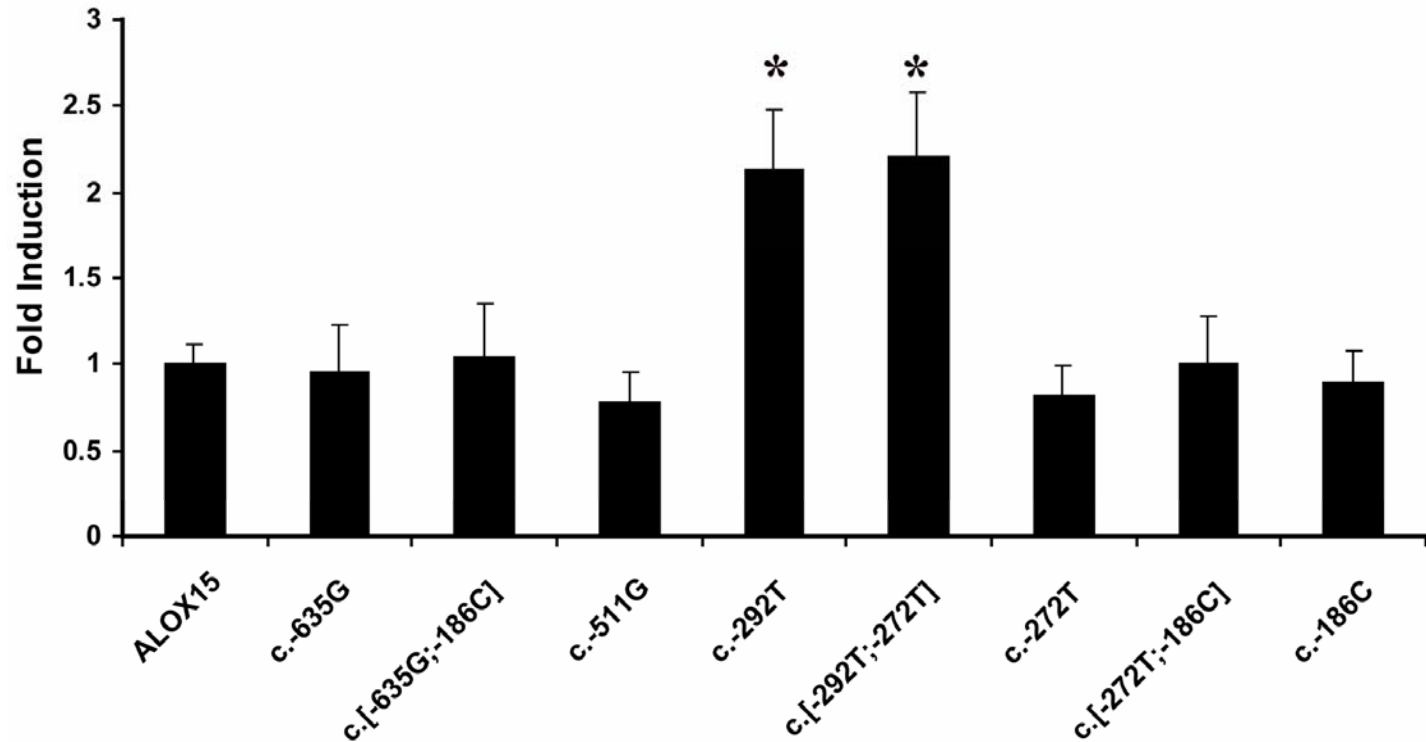
Varianten in Regulatorischen Regionen

Es wird geschätzt, dass 5 - 10% der menschlichen Gene mindestens eine Region enthalten in der stille Mutationen schädlich sein können

- Durch veränderte Regulation der Transkription
- Durch alternatives Splicing
- Durch veränderte Polyadenylierung der mRNA
- Durch Interferenz mit micro RNAs
- Durch Modifizieren der mRNA Stabilität

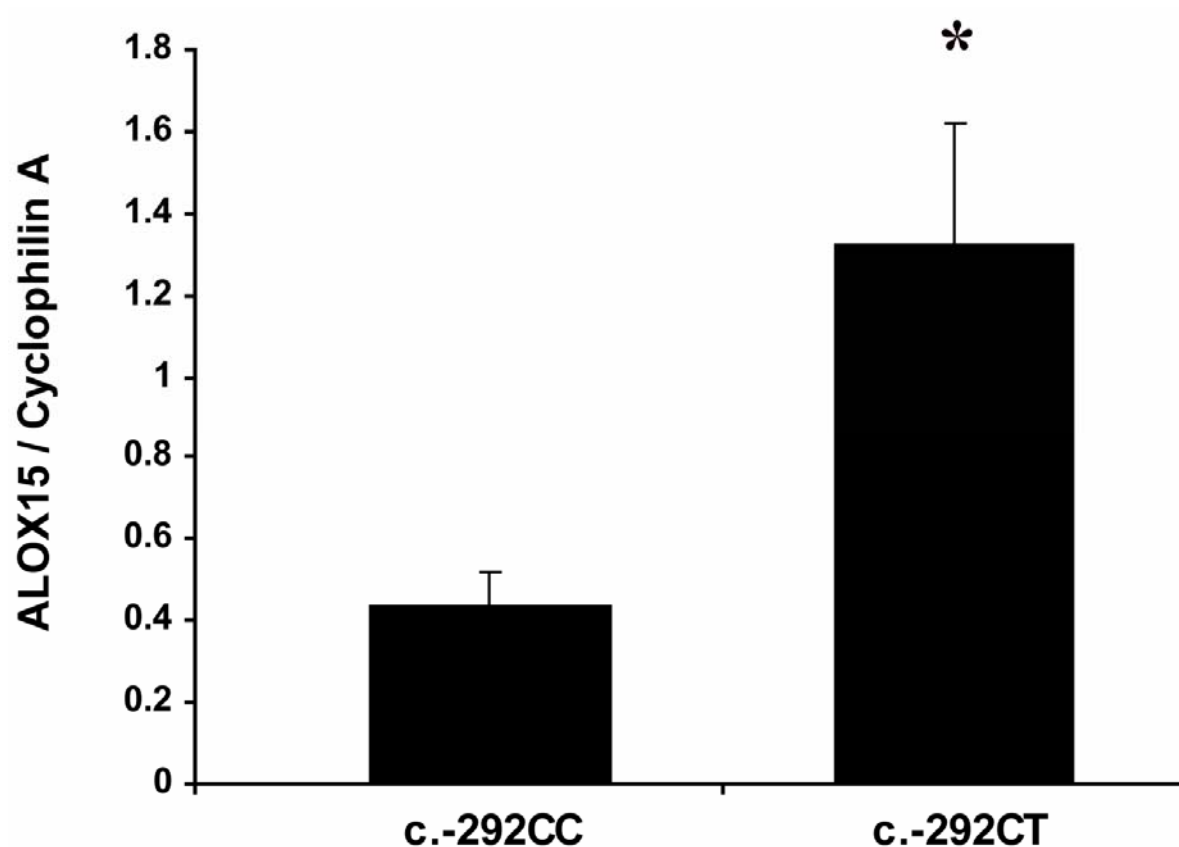
Der c.-292C>T Polymorphismus im *ALOX15* Promoter steigert die Transkription

(Hum Mutat. 2006 Jan;27(1):78-87)



Heterozygote Träger des c.-292T Allels haben höhere ALOX15 mRNA Spiegel in Makrophagen

(Hum Mutat. 2006 Jan;27(1):78-87)

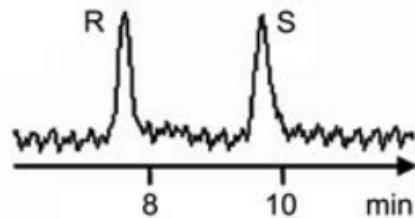


Makrophagen von heterozygoten c.-292CT Trägern produzieren mehr 15(S)-HETE

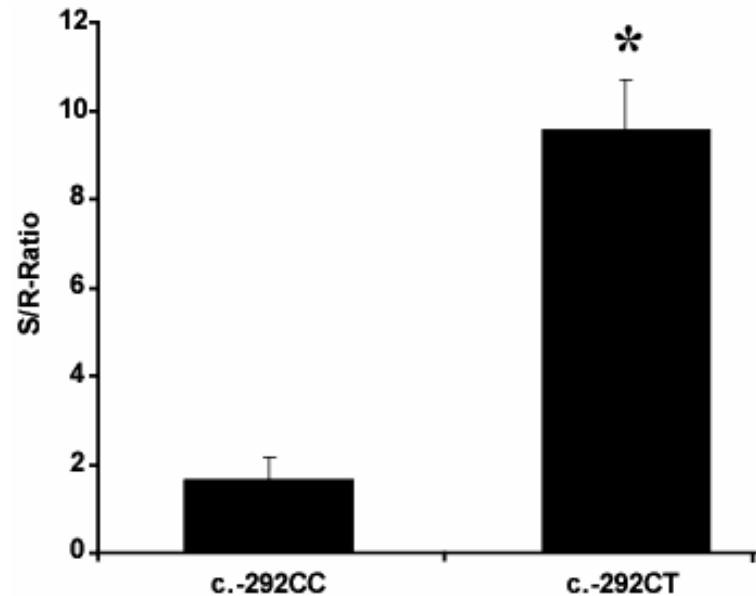
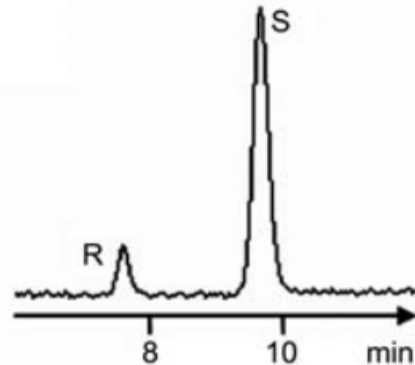
(Clin Chem Lab Med. 2007;45(4):487-92)

Chirale Säule – Chiralpak AD

c.-292CC

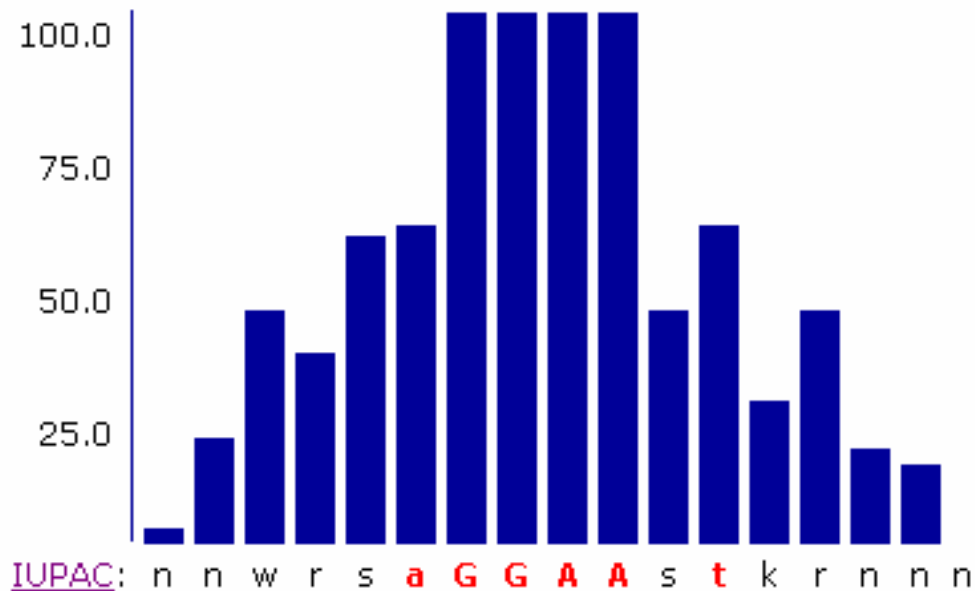


c.-292CT



Bindungsstelle für Transkriptionsfaktor

SPI1

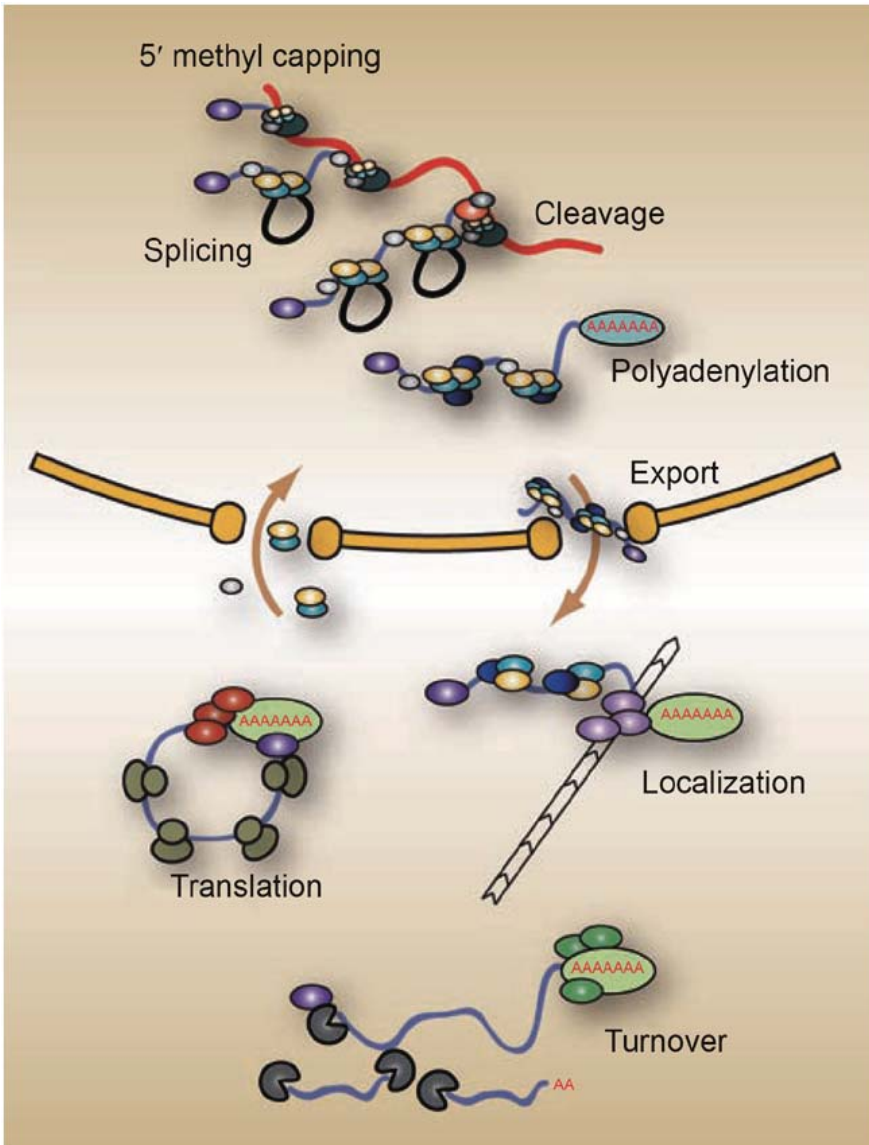


W: A oder T
Y: C oder T
R: A oder G
S: C oder G
M: C oder A
K: T oder G

Grossgeschriebene Basen in rot zeigen die Core der Matrix mit den vier am besten konservierten Basen (meist 100% Identität)

Kleingeschriebene Basen in rot sind ebenfalls konserviert (> 60% Identität)

Veränderung der mRNA Prozessierung



Durch alternatives Splicing

Durch veränderte Polyadenylierung der mRNA

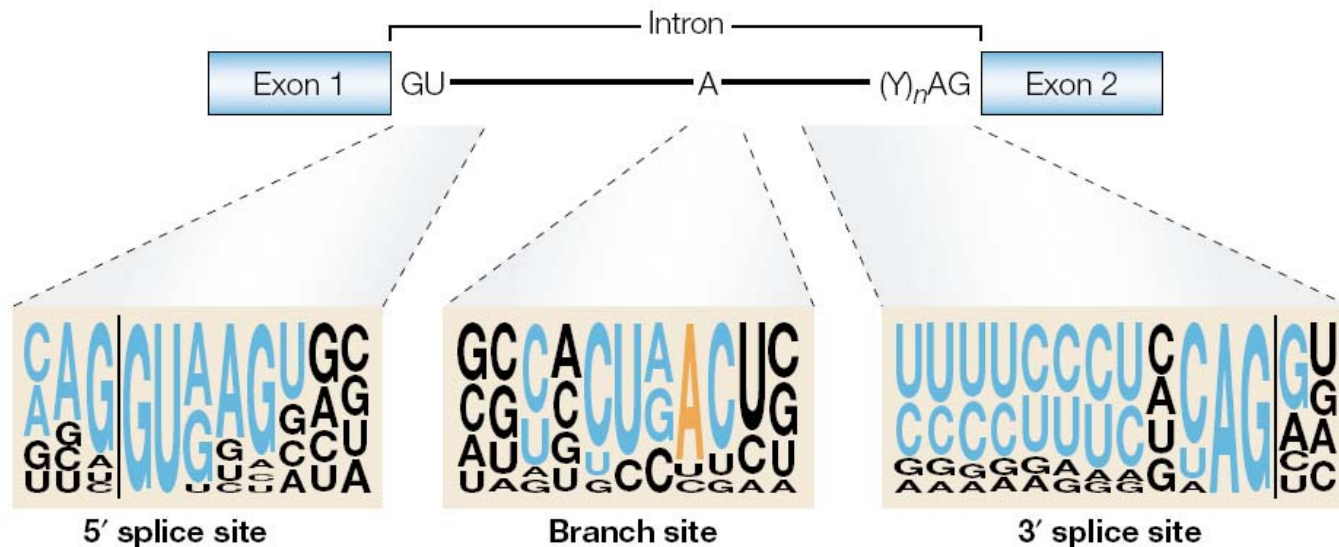
Durch Interferenz mit micro RNAs

Durch Modifizieren der mRNA Stabilität

Alternatives mRNA Splicing

(Nat Rev Genet. 2002 Apr;3(4):285-98)

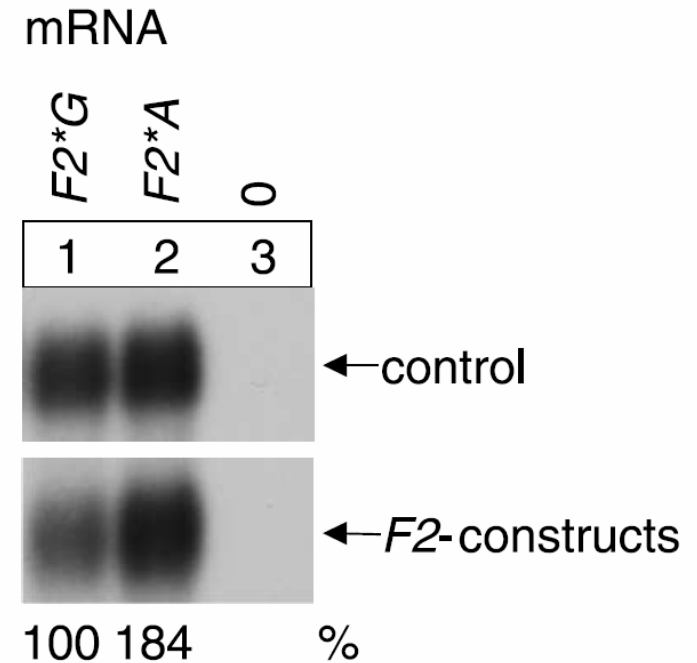
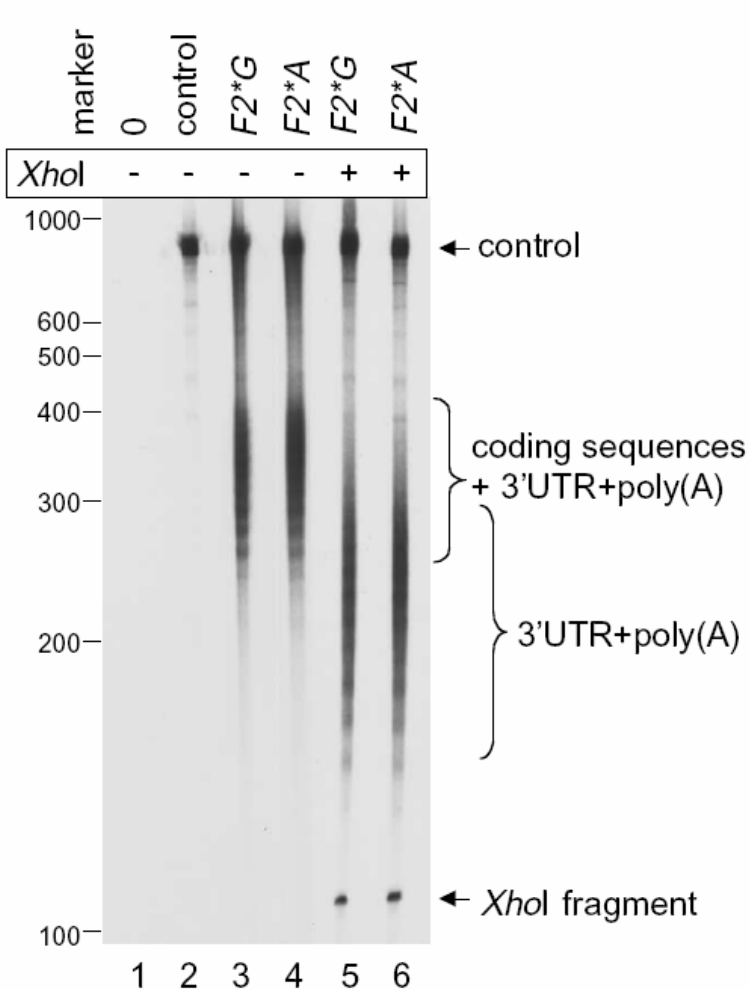
- Durch Exon Skipping
- Durch Aktivieren von kryptischen Exons



Es wird geschätzt, dass unter den Punktmutationen alternatives Spleissen für bis zu 50% der genetischen Erkrankungen verantwortlich ist

Der Prothrombin SNP 20210G>A verstärkt die mRNA Polyadenylierung

(Nat Genet. 2001 Aug;28(4):389-92 / J Thromb Haemost. 2004 Jan;2(1):119-27)

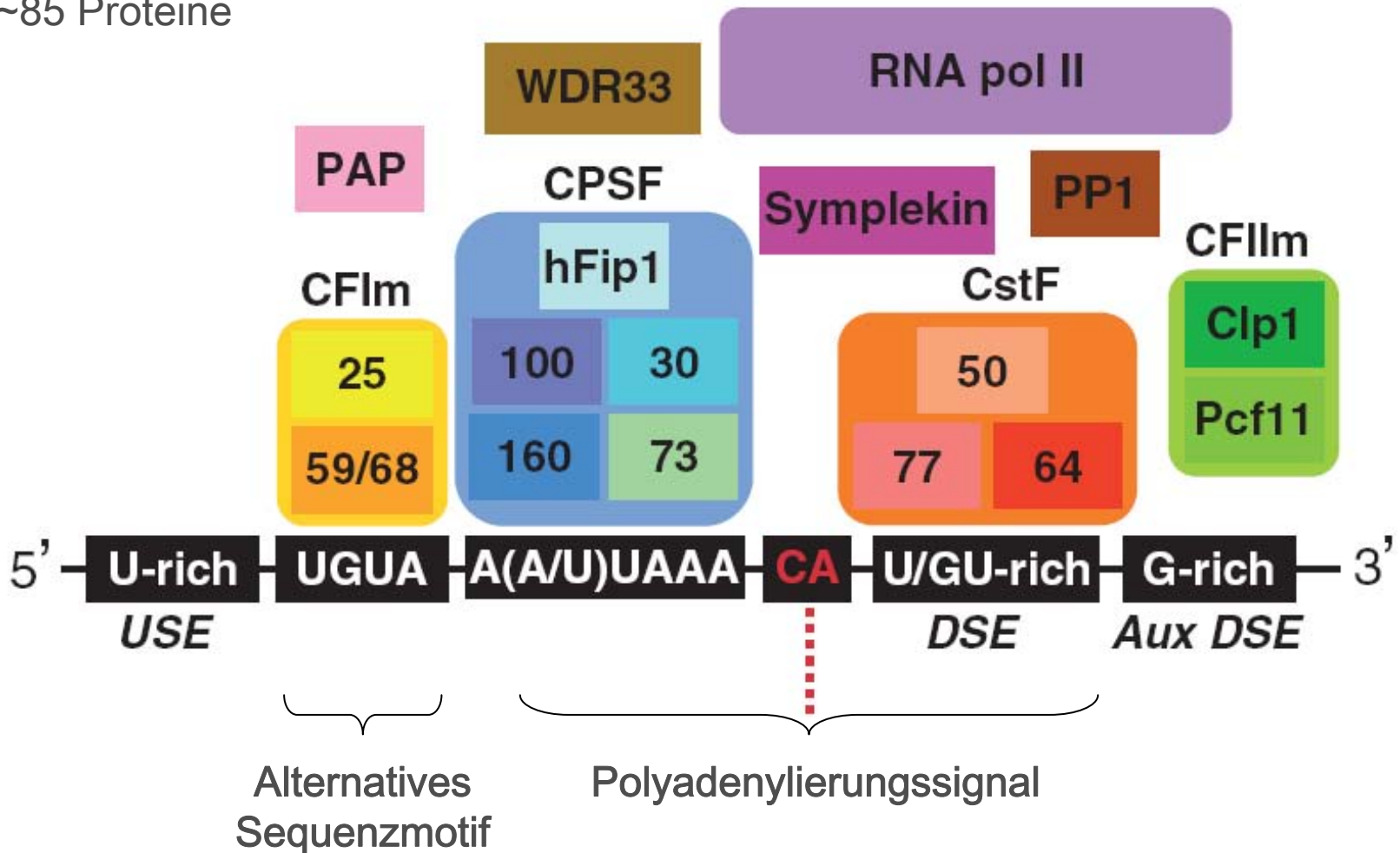


Die Variante erhöht die Plasma Prothrombinspiegel und das Risiko für thrombotische Ereignisse

Regulatorische Elemente für die Polyadenylierung in der 3' Region der mRNA

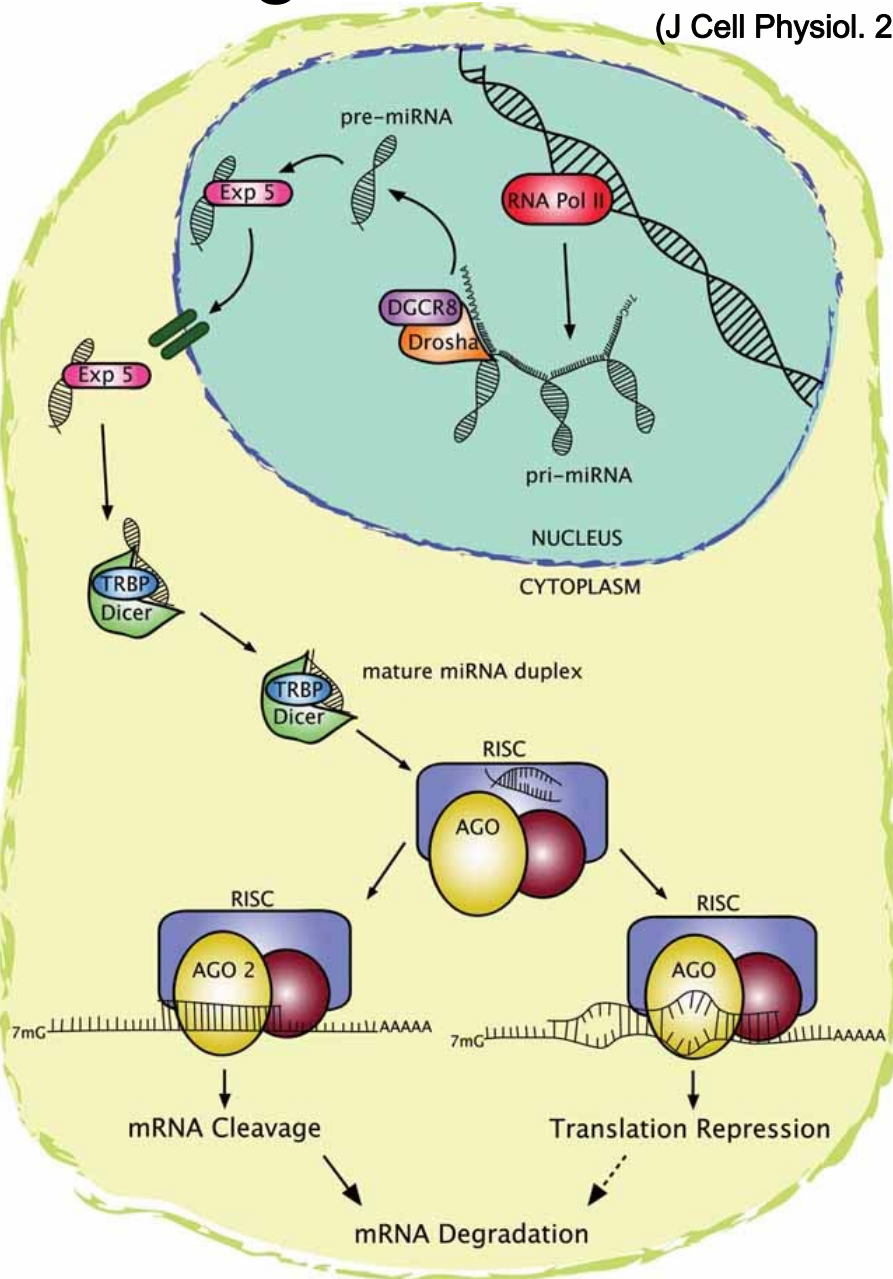
(Nucleic Acids Res. 2009 Dec 30)

~85 Proteine



Regulation der Translation durch miRNAs

(J Cell Physiol. 2010 Mar;222(3):540-5)



Pri-miRNA wird transkribiert

Hairpin Strukturen werden in ~70 nt lange dsRNA pre-miRNA Moleküle geschnitten

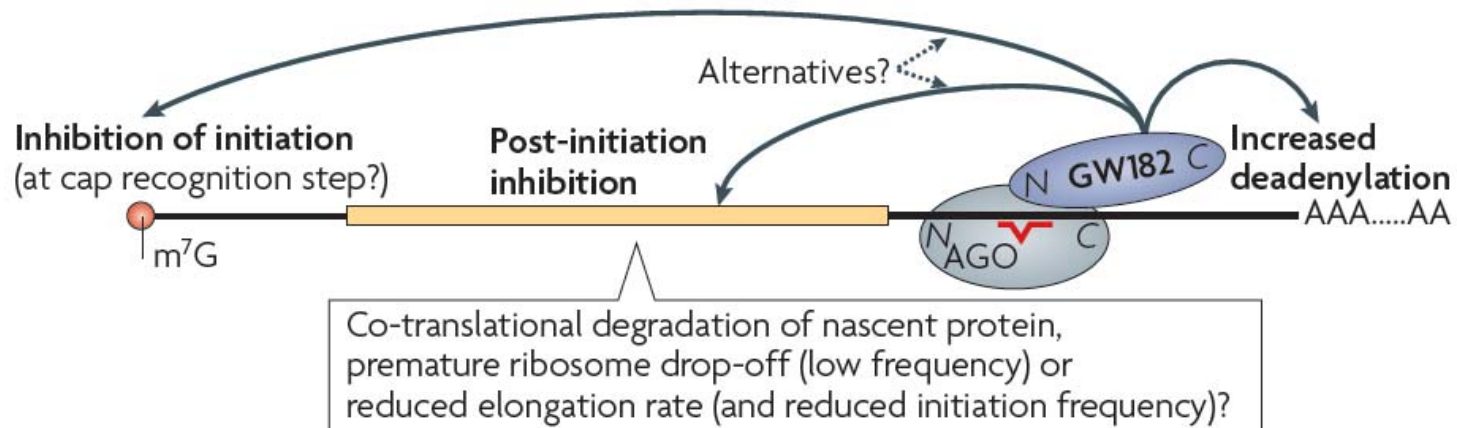
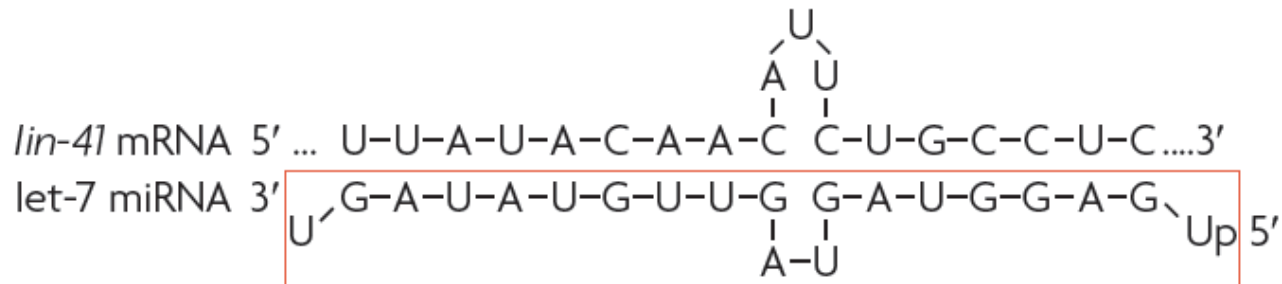
Export aus dem Zellkern via GTP-abhängiges Exportin 5

Dicer schneidet die pre-miRNA in 21-23 nt lange reife dsRNA Moleküle

Ein Strang der dsRNA wird in den RISC Komplex gepackt und lenkt diesen zur Ziel mRNA, während der andere Strang degradiert wird

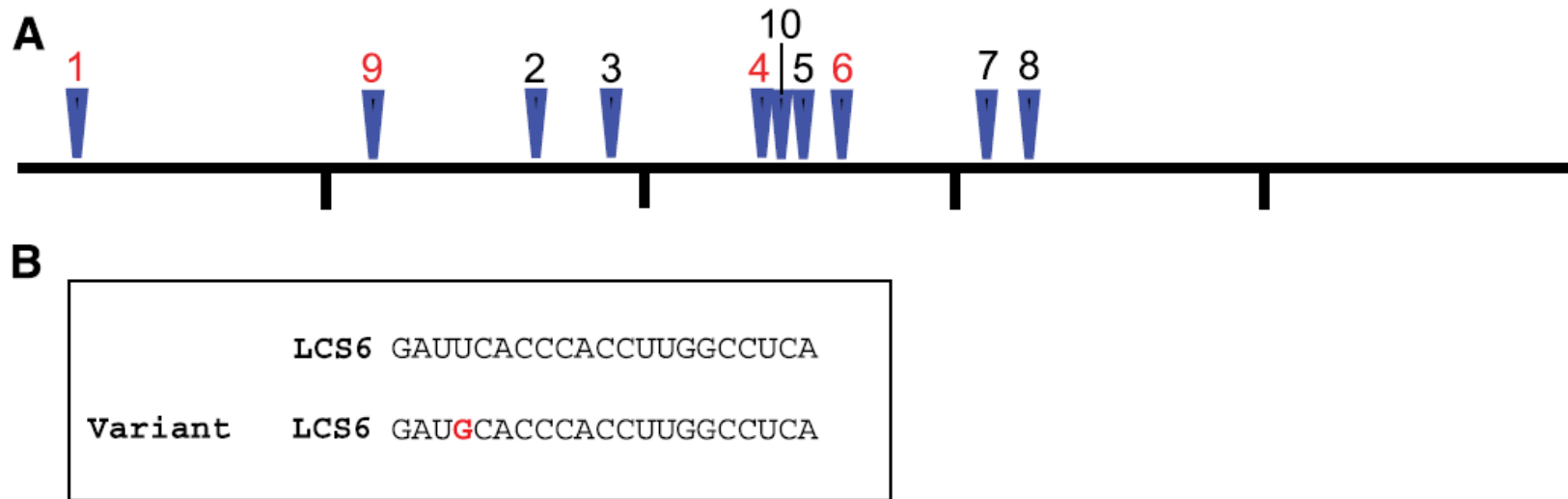
Regulation der Translation durch miRNAs

(Nat Rev Mol Cell Biol. 2010 Feb;11(2):113-27)



Ein Polymorphismus in einer miRNA Bindungsstelle in der 3'UTR des KRAS Gens

(Cancer Res 2008; 68: (20):8535)

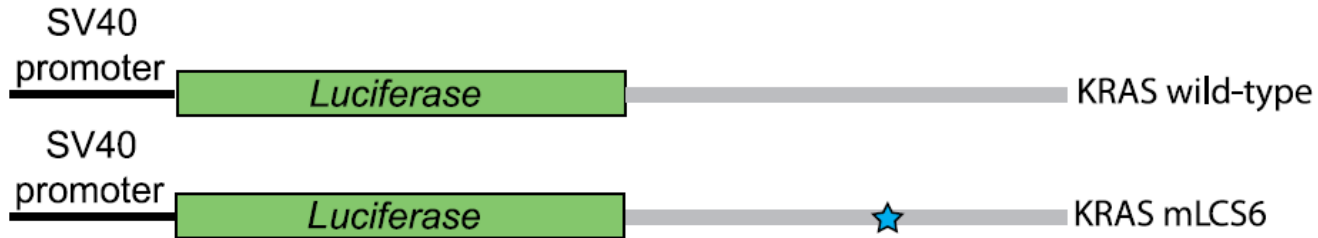


Die Variante ist mit einem 1.4 - bis 2.3 - fach erhöhten Risiko für das Nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom bei moderaten Rauchern assoziiert

Ein Polymorphismus in einer miRNA Bindungsstelle in der 3'UTR des KRAS Gens

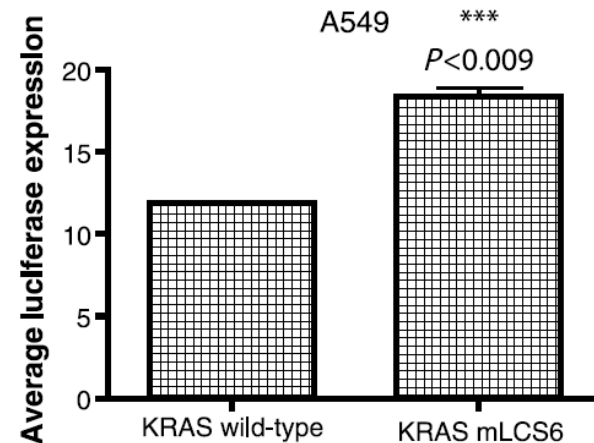
(Cancer Res 2008; 68: (20):8535)

A



Die Variante führt zu einer erhöhten KRAS Proteinproduktion

B



Synonyme Variationen

(Scientific American; Jun2009, Vol. 300 Issue 6, p46-53)

Es sind 10'000 synonyme SNPs in Dr. Venter's und Watson's Exomes vorhanden

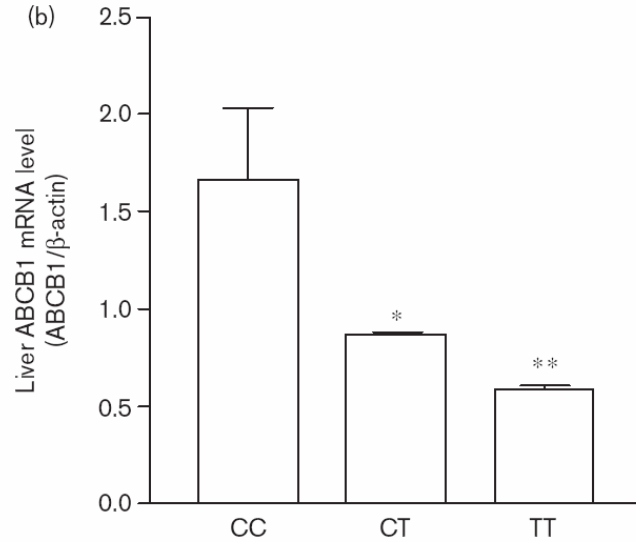
Es wird geschätzt, dass 5 - 10% der menschlichen Gene mindestens eine Region enthalten in der stille Mutationen schädlich sein können

- Durch Veränderung der mRNA Stabilität
- Durch Veränderung der mRNA Struktur
- Durch neue upstream Open Reading Frames (uORF)
- Durch veränderte Translation

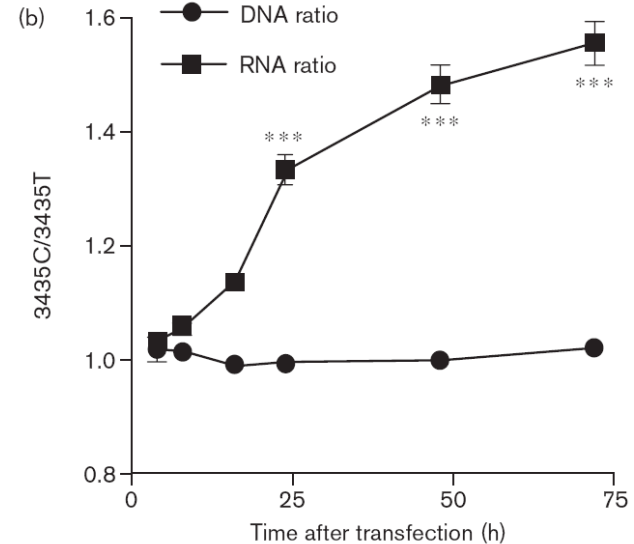
Der Synonyme SNP im MDR1 Gen reduziert die mRNA Stabilität

(Pharmacogenetics and Genomics 2005;15:693–704)

MDR1 mRNA in menschlicher Leber



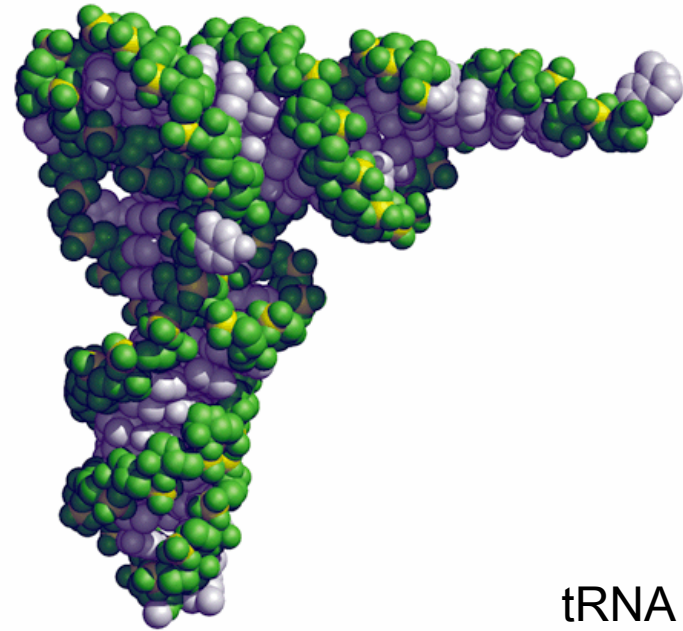
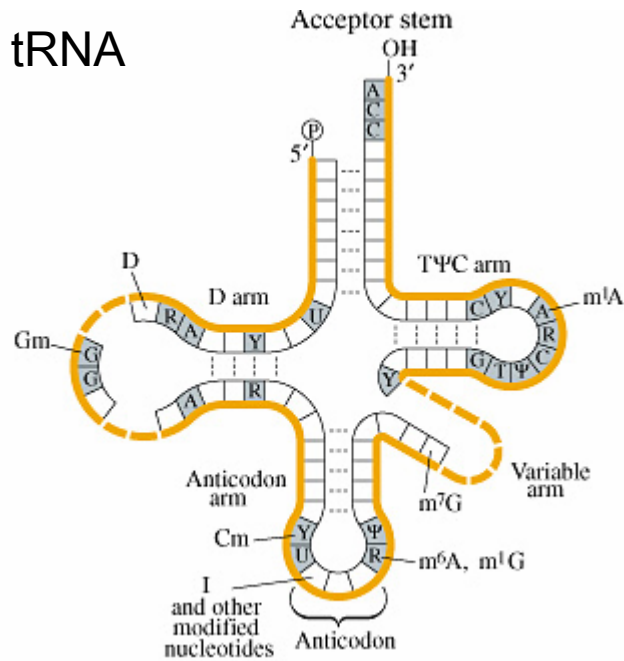
MDR1 mRNA Stabilität



Die Variante führt vermutlich zu einer veränderten mRNA Struktur

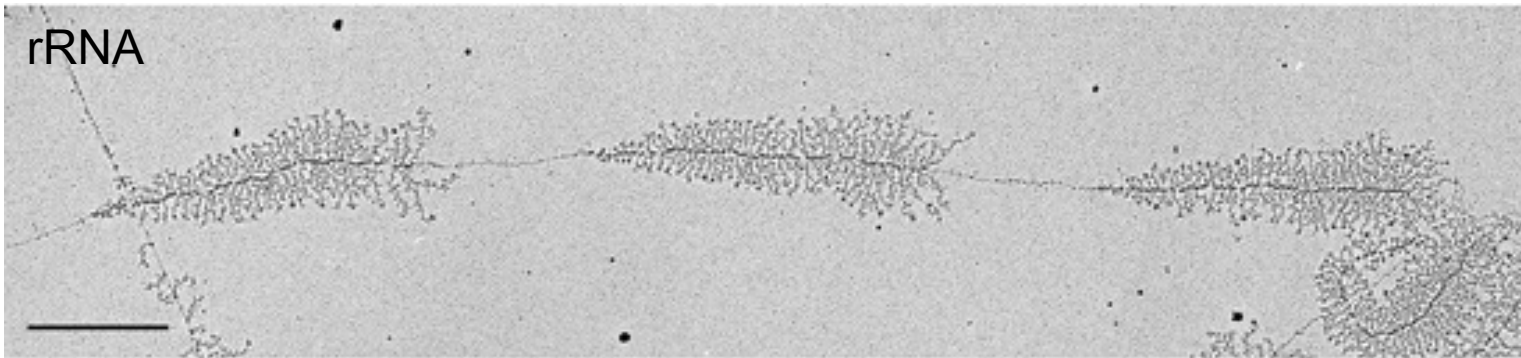
Die RNA ist kein lineares Molekül

tRNA



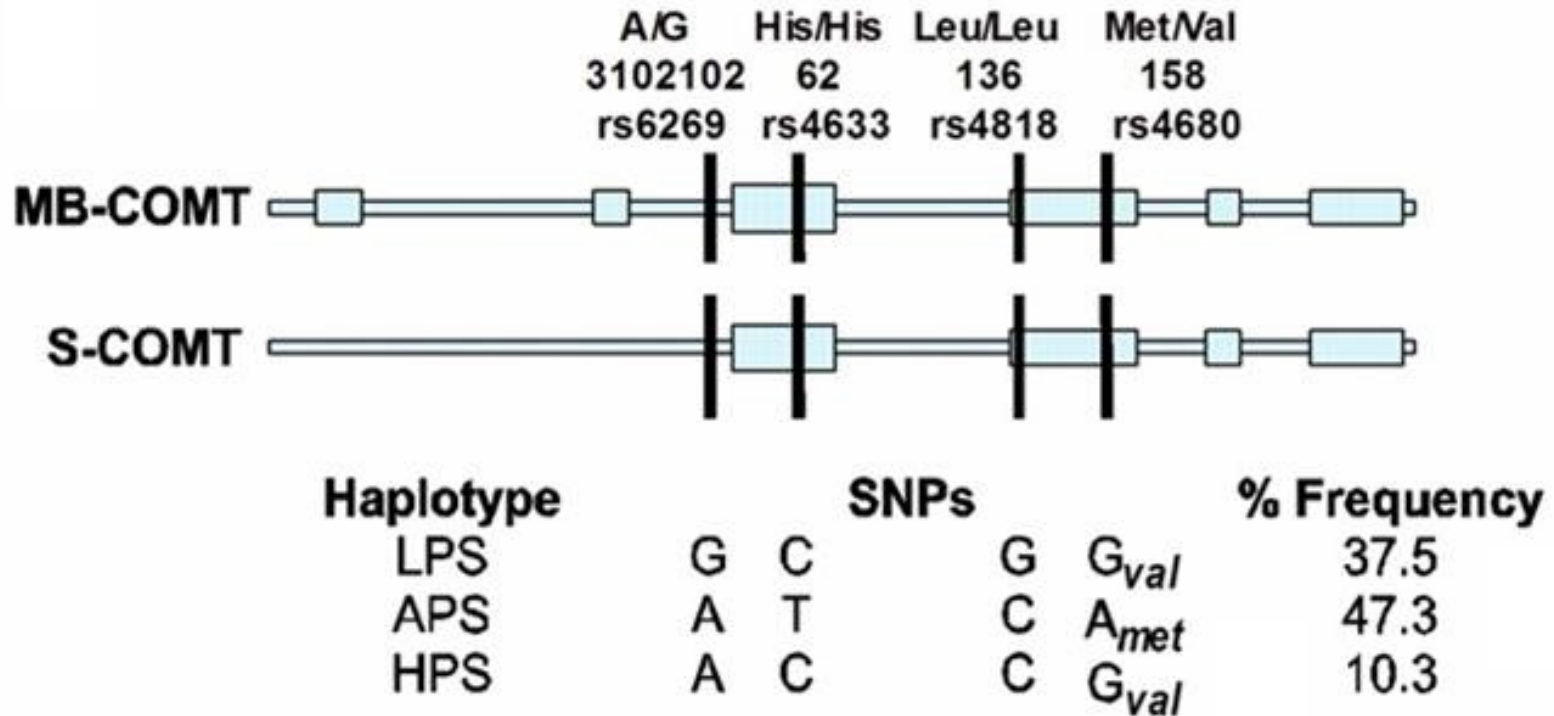
tRNA

rRNA



Drei häufige Haplotypen im COMT Gen beeinflussen die Schmerzempfindlichkeit

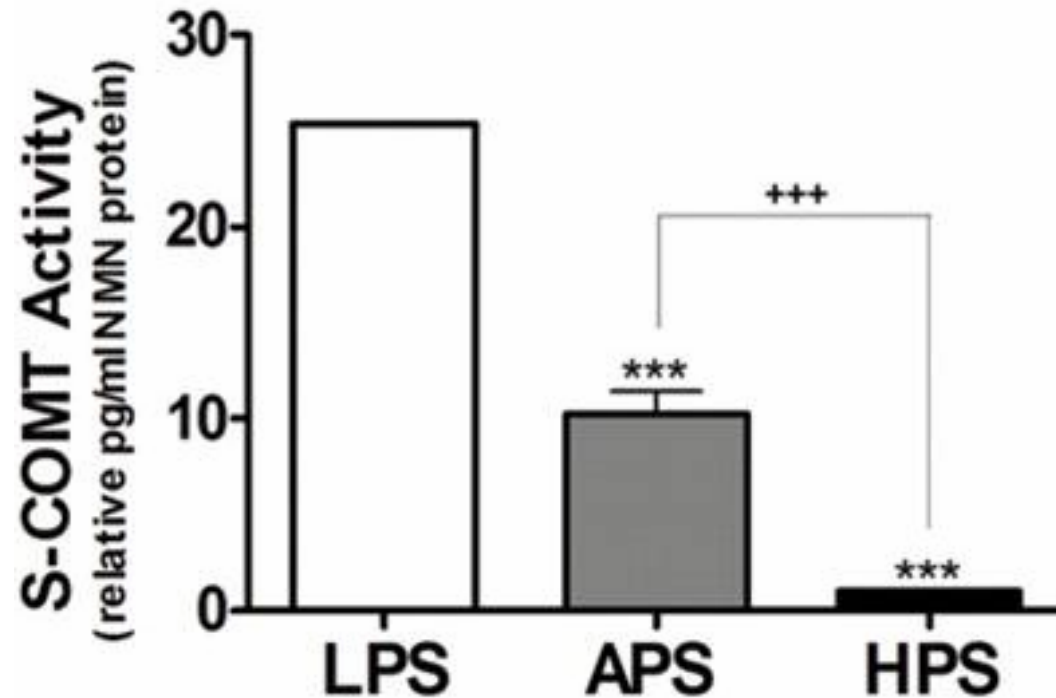
(Science. 2006;314:1930 -1933)



COMT: Catechol-O-Methyltransferase
 LPS: Low pain sensitive individuals
 APS: Average pain sensitive individuals
 HPS: High pain sensitive individuals

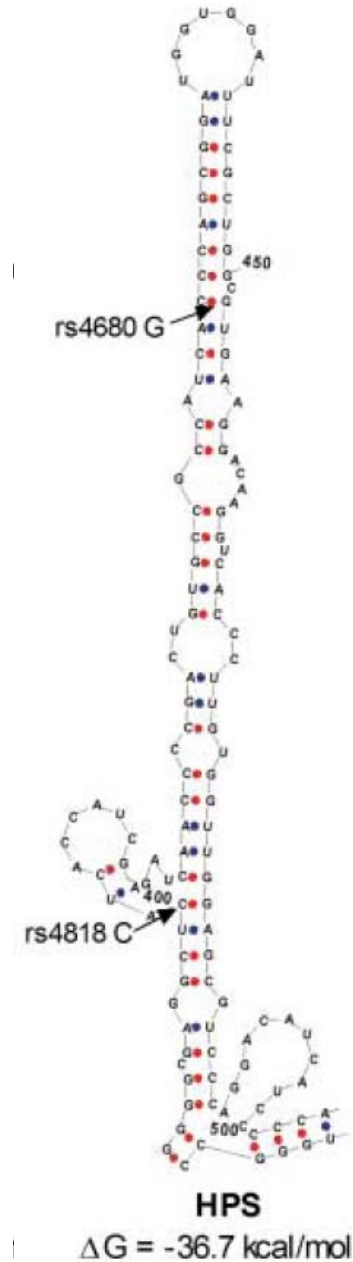
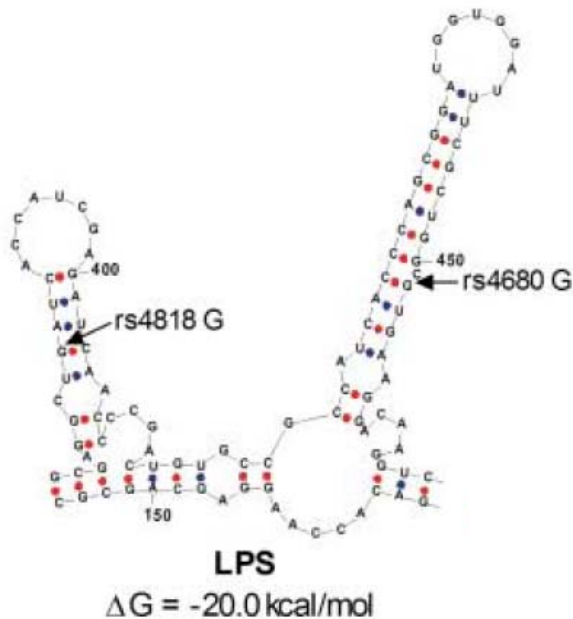
Und sie beeinflussen die COMT Aktivität

(Science. 2006;314:1930 -1933)



Durch Veränderungen in der mRNA Struktur

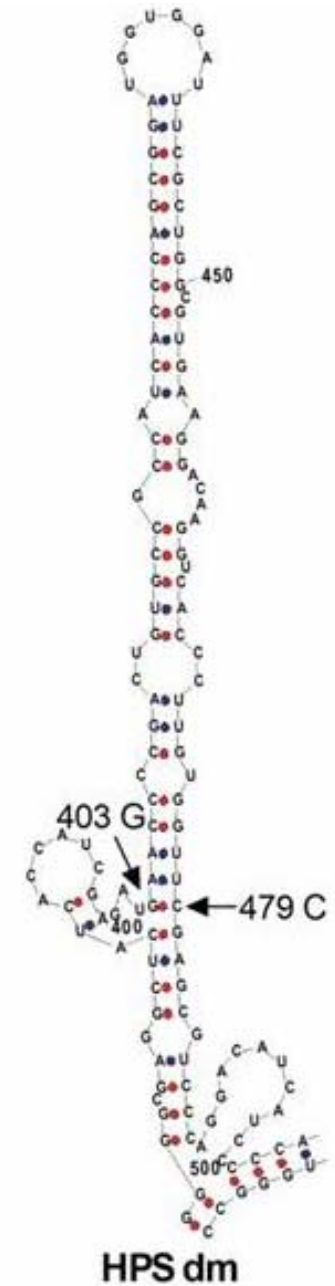
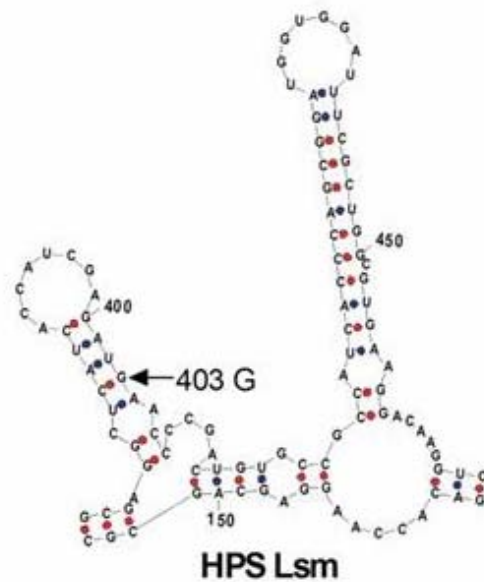
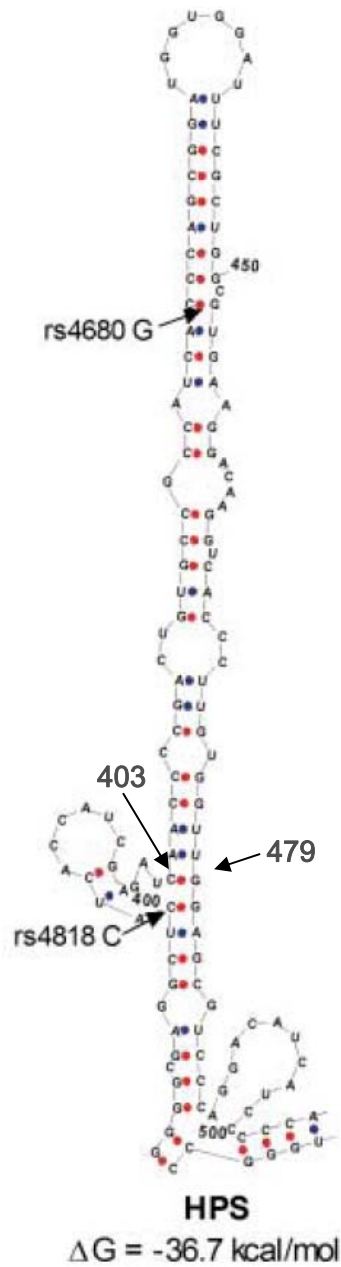
(Science. 2006;314:1930 -1933)

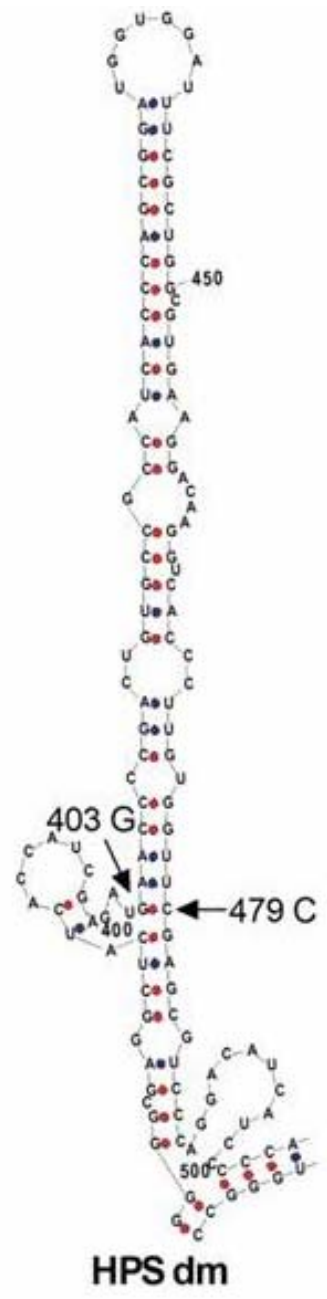
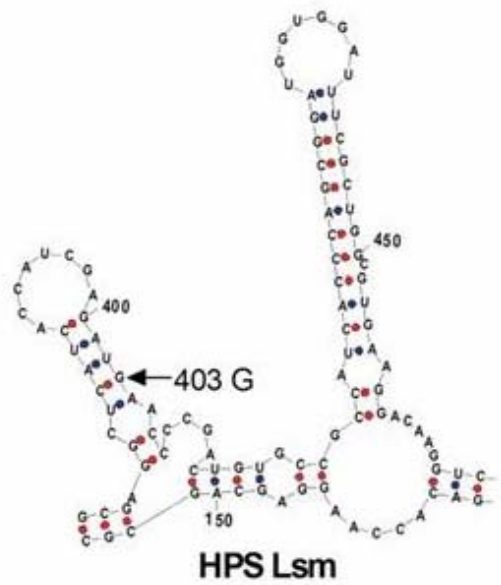
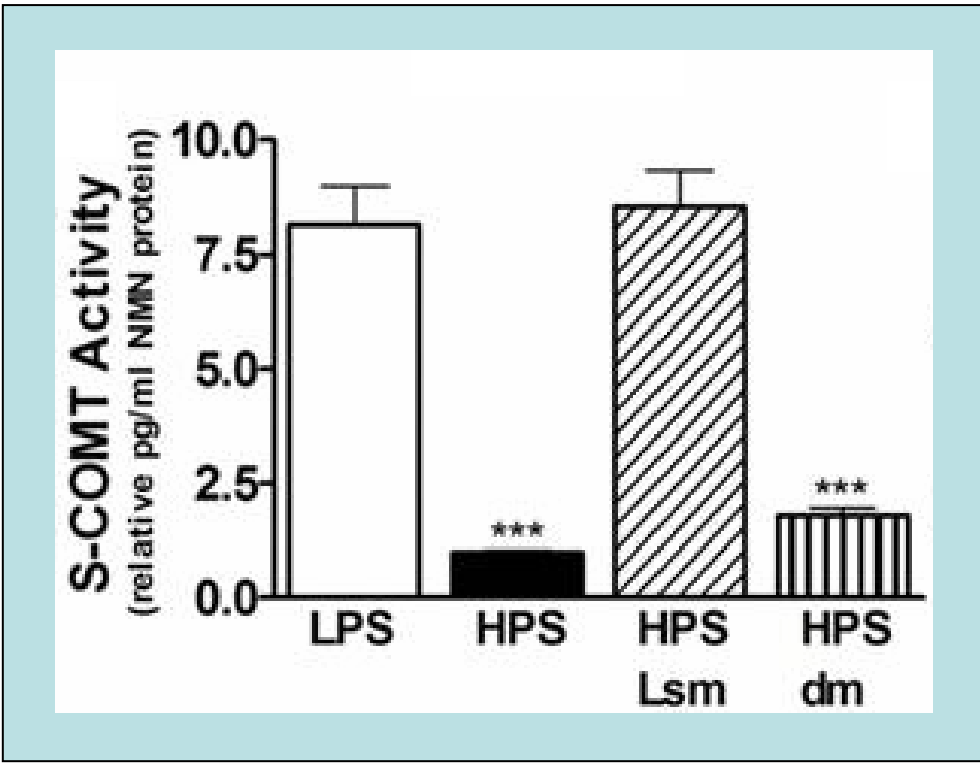
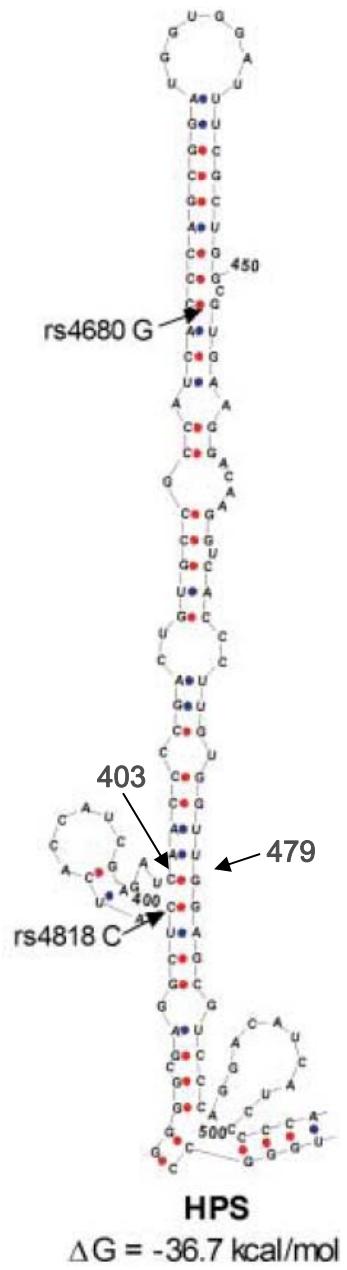


Der HPS Haplotyp bildet eine stabilere mRNA Struktur als der LPS Haplotyp, durch den synonymen SNP Leu136Leu

Mutationen an benachbarten Positionen bestätigen das das

(Science. 2006;314:1930 -1933)





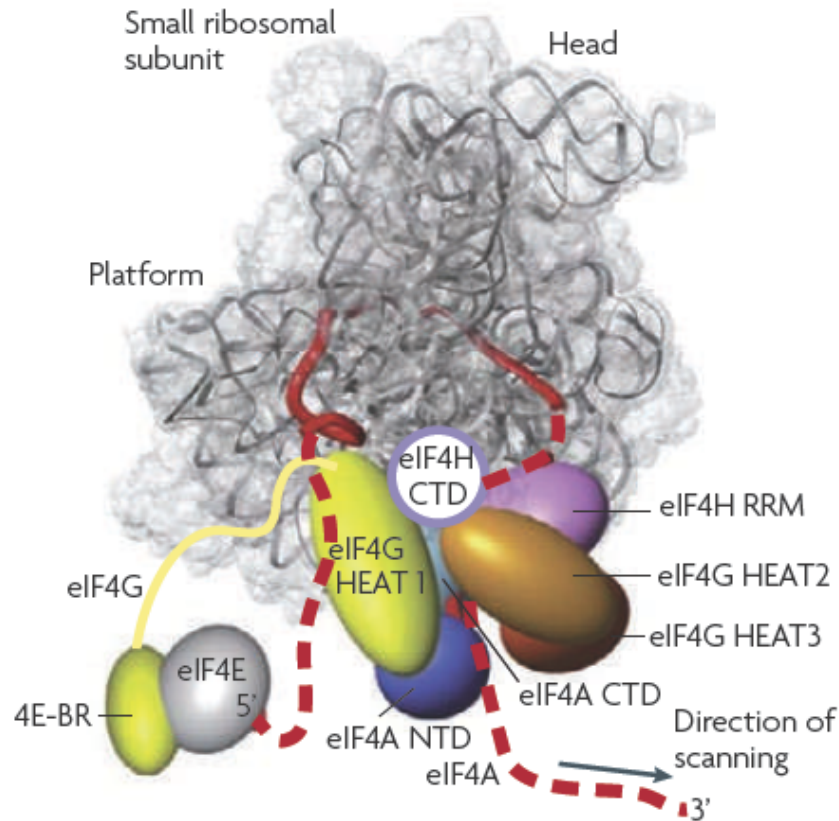
uORFs werden in 49% der humanen Gene gefunden

(Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 May 5;106(18):7507-12)



B # Transcripts with:	Human	Mouse
annotated 5' UTR	23775	18663
≥1 uORF	11670	8253
≥2 uORFs	6268	4197
≥1 uORF fully upstream	9879	6935
≥1 uORF overlapping CDS	4275	2872

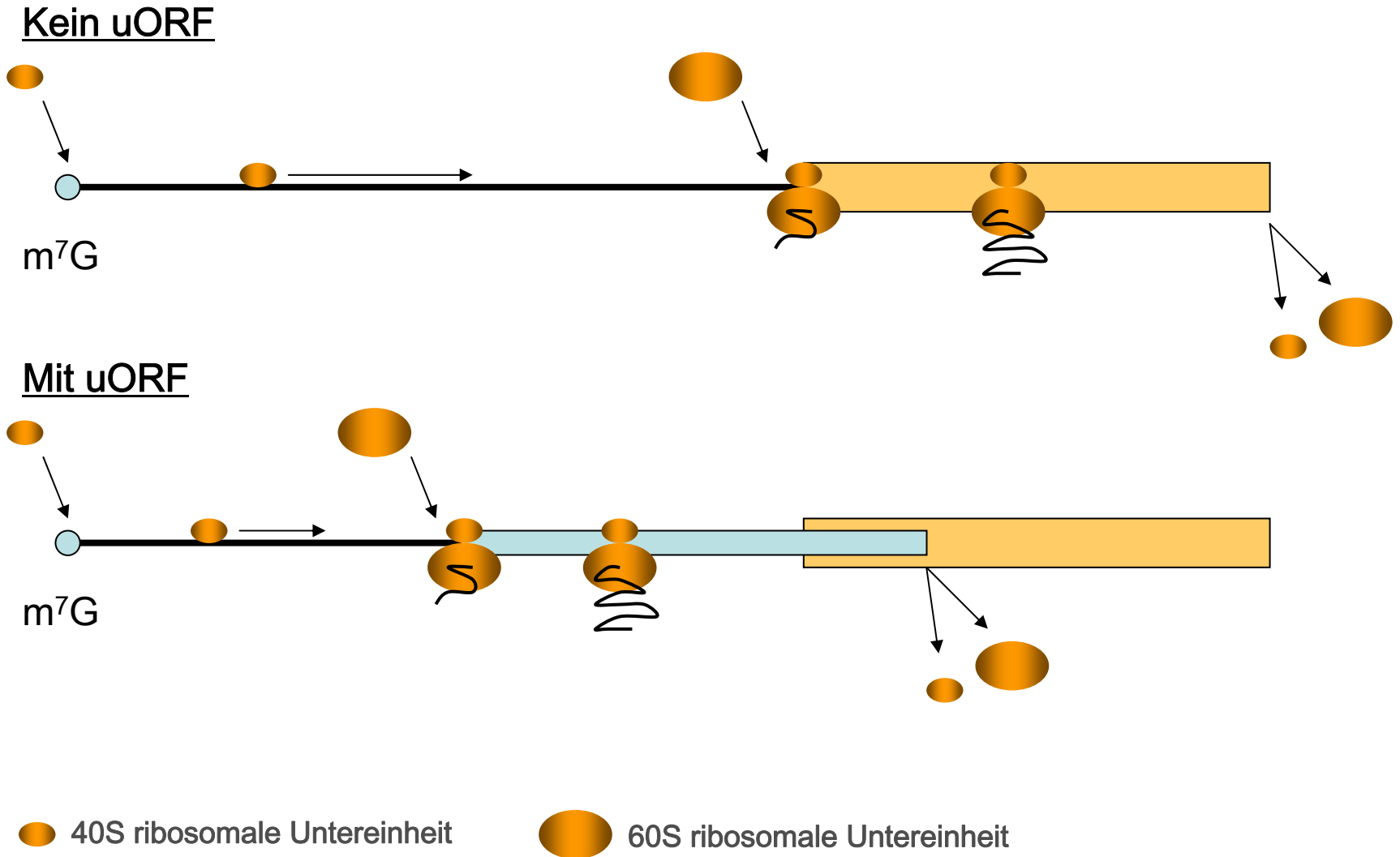
Der 48S Prä-Initiationskomplex sucht die mRNA nach dem ersten AUG ab



Die kleine ribosomale 40S Untereinheit bildet mit eIF4 den 43S Prä-Initiationskomplex und sucht die mRNA in 5' zu 3' Richtung nach dem ersten AUG ab

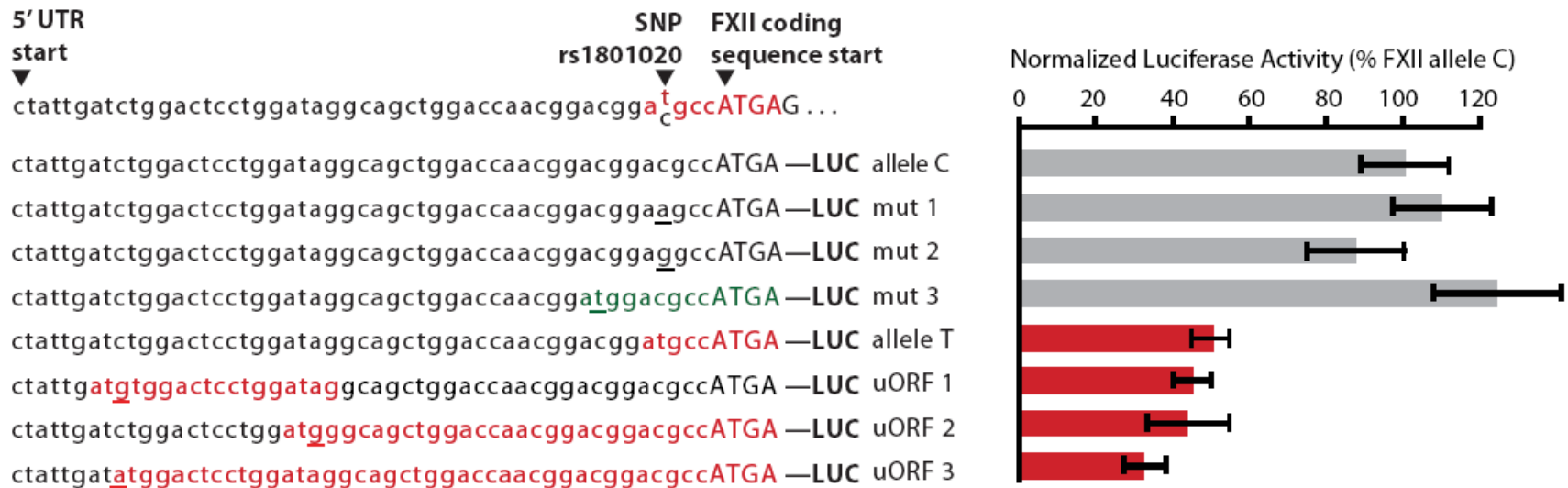
Scanning Model für die Initiation der Translation

(Nat Rev Mol Cell Biol. 2010 Feb;11(2):113-27)



SNP im FXII Gen reduziert die Protein Expression durch Bildung eines neuen uORF

(Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 May 5;106(18):7507-12)

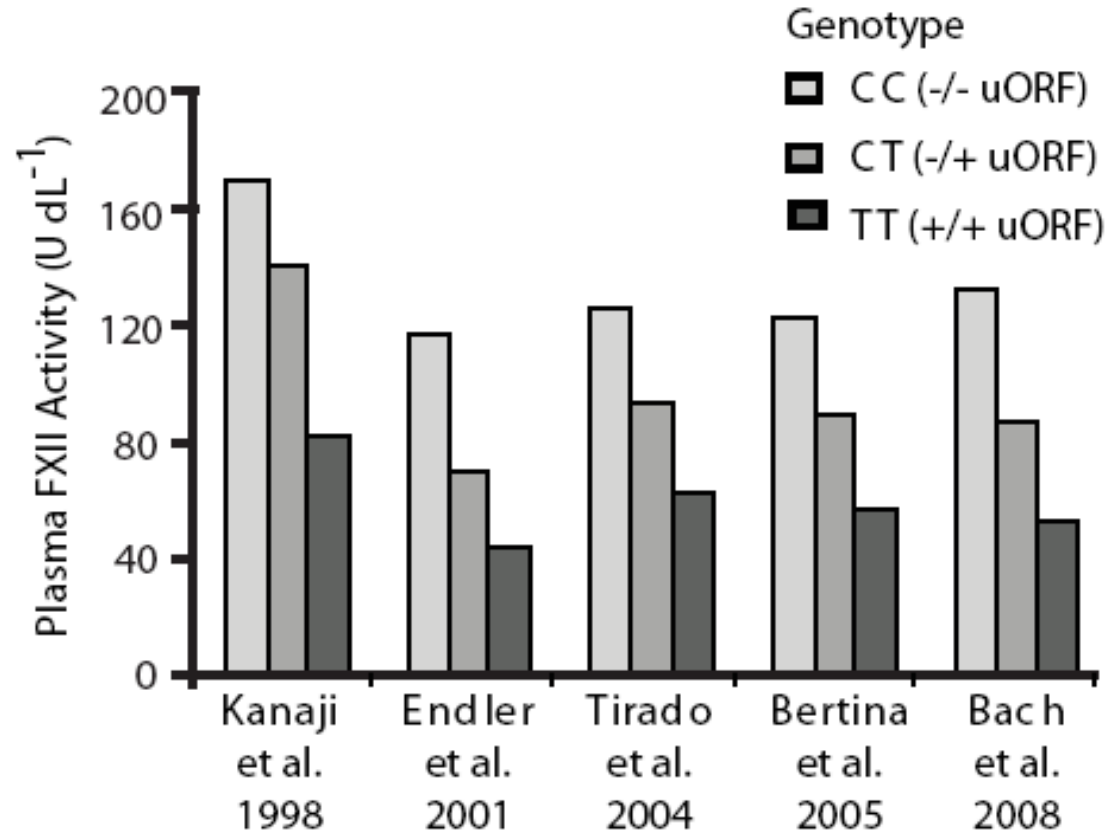


Allele mit einem uORFs produzieren 30 - 60% weniger Protein, als Allele ohne uORF bei gleichbleibenden mRNA Spiegeln

Es werden mindestens 509 menschliche Gene mit polymorphen uORFs mittels Bioinformatik vorausgesagt

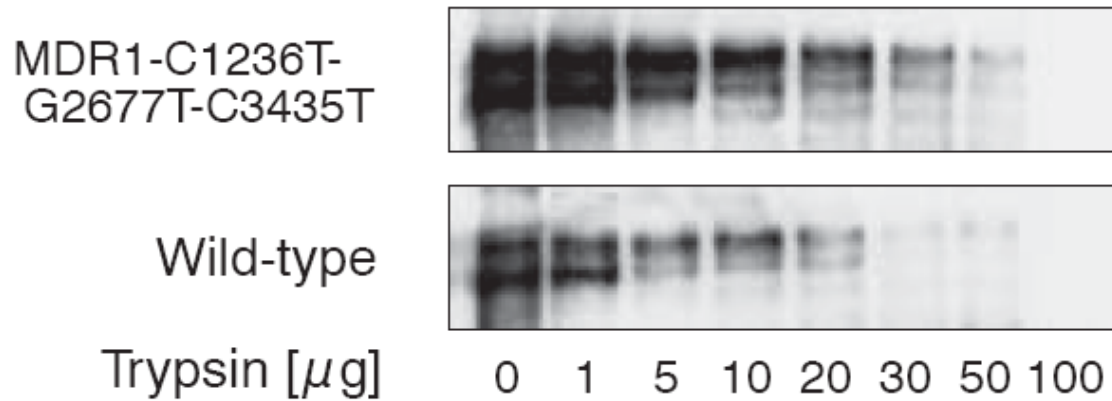
Der SNP im FXII Gen reduziert die Protein Expression und die Plasma Aktivität *in vivo*

(Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 May 5;106(18):7507-12)



Ein synonymer SNP im MDR1 Gen verändert die Proteinkonformation

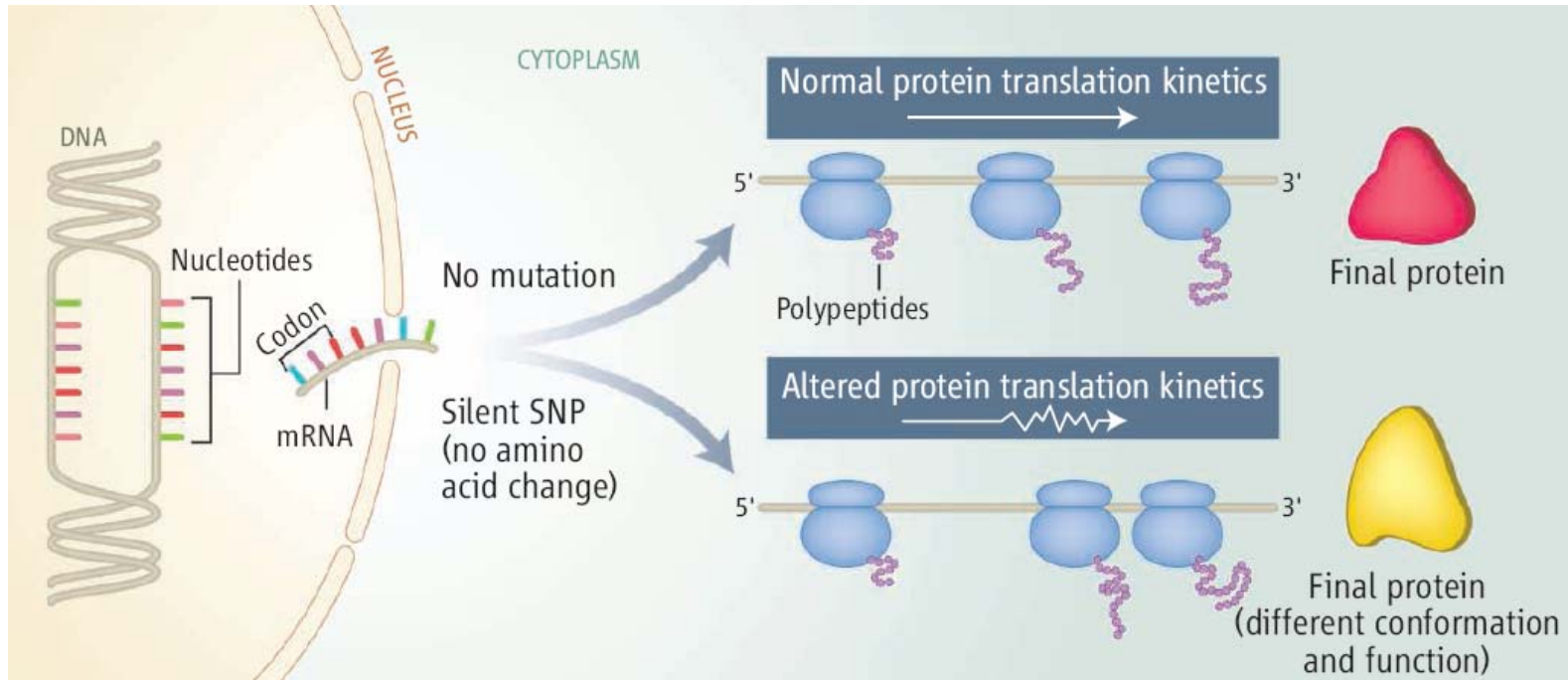
(Science. 2007 Jan 26;315(5811):525-8)



Die Änderung der Proteinkonformation führt auch zu einer veränderten Interaktion mit Medikamenten und Inhibitoren

Die Änderung im Codon für dieselbe Aminosäure führt zu veränderter Proteintranslation

(Science. 2007 Jan 26;315(5811):466-7)



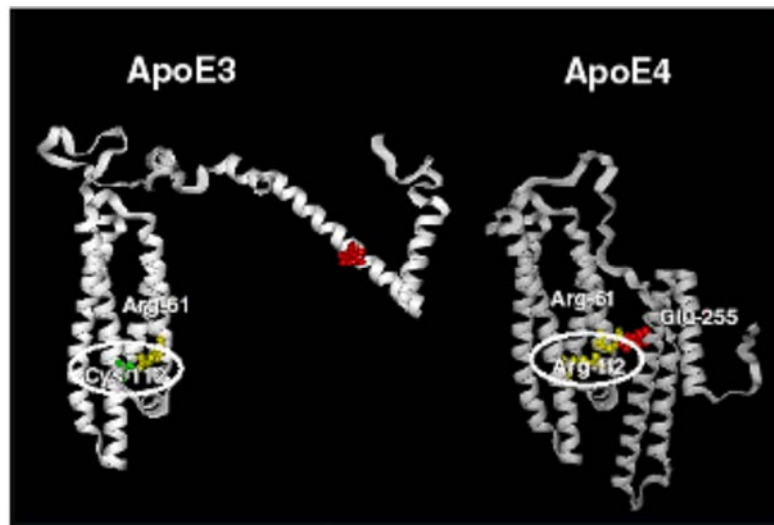
	Codon	Relative Frequenz
Ile	ATA	14%
Ile	ATC	52%
Ile	ATT	35%

Zusammenfassung nicht synonyme Variationen

Nicht synonyme Variationen und Variationen in regulatorischen Regionen führen wohl am häufigsten zu genetischen Krankheiten

Die zugrundeliegenden Mechanismen beinhalten:

- Änderung der Aktivität und der Struktur
- Änderung der Stabilität des Proteins und des Umsatzes



Zusammenfassung Variationen in regulatorischen Regionen

Variationen in regulatorischen Regionen verändern das Verhalten eines Gen ebenfalls

Diese regulatorischen Regionen sind in Enhancer / Promoter Regionen, Introns, und Exons lokalisiert, und sind zum Teil weit von der kodierenden Region separiert

Die zugrundeliegenden Mechanismen beinhalten:

- Änderung der Regulation der Transkription
- Alternatives Splicing
- Veränderte Polyadenylierung
- Interferenz mit micro RNAs
- Änderung der mRNA Stabilität

Zusammenfassung synonyme Variationen

Synonyme Variationen sind nicht immer „silent“, sondern beeinflussen die mRNA Prozessierung und die Translation

Im humanen Exom wurden ähnlich viele synonyme wie nicht-synonyme SNPs detektiert

Es wird geschätzt, dass 5 - 10% der menschlichen Gene mindestens eine Region enthalten in der stille Mutationen schädlich sein können

Die zugrundeliegenden Mechanismen beinhalten:

- Alternatives Splicing
- Änderung in der mRNA Stabilität
- Änderung in der mRNA Struktur
- Generation von uORFs
- Veränderte Proteintranslation



Besten Dank für Ihre Aufmerksamkeit!

