



Mutace, aberace a reparace DNA



Co je mutace?

- Mutace je změna genetické informace.
- Mutace je evoluční proces, který je jako jediný zdrojem nové genetické variability

Rozdělení mutací

1) Dle příčiny jejich vzniku

- **Spontánní** – vznik mutace bez přítomnosti indukčních faktorů, resp. takové mutace, u nichž nejsou známy příčiny jejich vzniku
- **Indukované** – mutace vyvolané působením indukčních faktorů, tzv. mutagenů.

2) Dle typu zasažené buňky

- **Somatické** – vznikají v somatických (tělních) buňkách a postihují jen daný organismus (mohou postihnout jen jeho část nebo i celý organismus)
- **Gametické** – vznikají v buňkách zárodečných linií nebo gametách (při meióze) a přenášejí se na potomstvo. Nemusí nutně postihovat vlastní organismus.



Rozdělení mutací

3) Dle úrovně, na níž působí

- **Genové (bodové)** – týkají se jednotlivých genů, mění se nukleotidy nebo jejich pořadí
- **Chromozomové** – týkající se struktury chromozómů, mění strukturu chromozomu na větším úseku
- **Genomové** – změny v počtech chromozómů

4) Podle vlivu na životaschopnost organismu

- **Letální** – způsobují smrt organismu ve stádiu vývoje před dosažením pohlavní dospělosti
- **Semiletální** – způsobují snížení vitality (životaschopnosti, fitness) organismu
- **Neutrální** – nemají vliv na vitalitu jedince
- **Supervitální** – zvyšují vitality (životaschopnosti, fitness) organismu



Rozdělení mutací

5) Podle úrovně, na níž působí

- **Dominantní** – plně se projeví již při výskytu jedné alely (tedy i v heterozygotní sestavě)
- **Recesivní** – projeví se pouze v homozygotní sestavě (přítomnost dvou alel)
- **Jiné typy interakcí** – projeví se již při výskytu jedné alely, ale projev takové mutace je méně výrazný než při jejím výskytu v homozygotní sestavě

6) Podle směru působení

- **Přímé (forward)** – mutace ve směru od standardního k mutovanému genu (typu)
- **Zpětné (back)** – mutace ve směru od mutovaného k standardnímu genu (typu)



Rozdělení mutací

7) Podle charakteru projevu

- **Morfologické** – způsobují nápadnou změnu fenotypu (vzhledu)
- **Fyziologické** – způsobují změny ve fyziologii organismu (metabolismu, fci některých vnitřních tkání či orgánů, nutričních požadavcích, reakcích organismu na vnější vlivy), kdy tyto změny nejsou na první pohled pozorovatelné
- **Kombinované** – způsobují jak změnu fenotypu, tak změny fyziologických funkcí

8) Podle okolností projevu

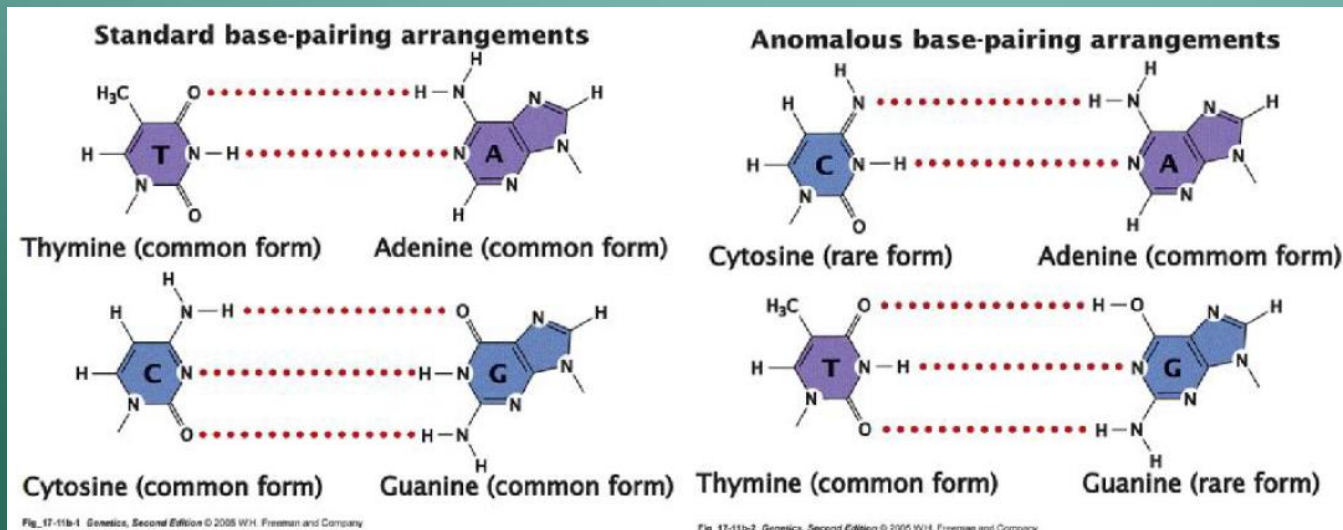
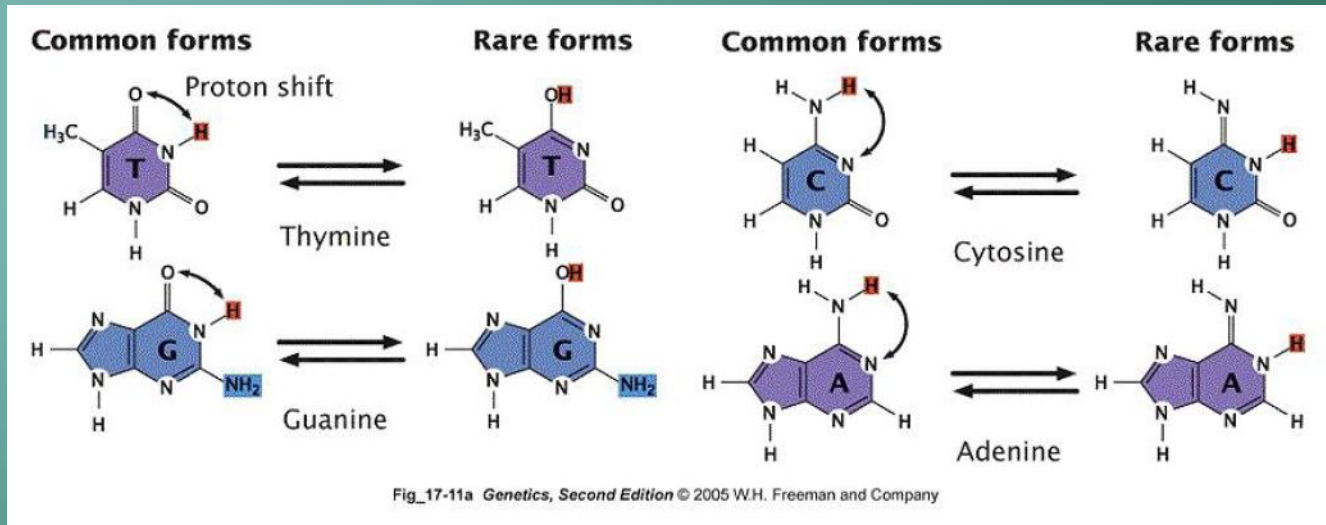
- **Nepodmíněné** – mutace se projeví vždy (za všech okolností)
- **Podmíněné** – mutace se projeví jen za určitých okolností (za určitých podmínek prostředí)

1) Mutace spontánní

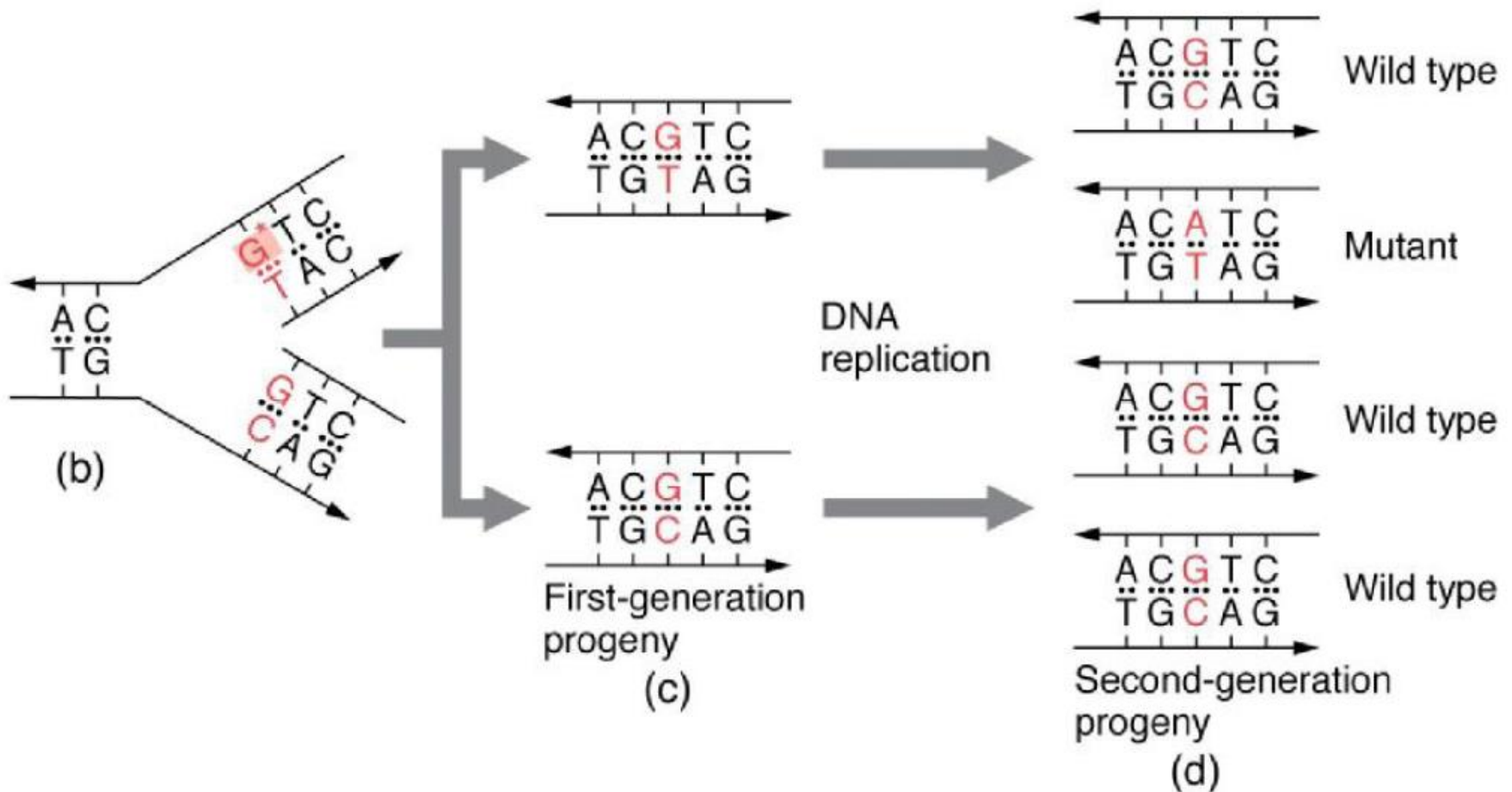


A) Tautomerní přesmyky bází

- Soudilo se, že jsou hlavní příčinou špatného párování během replikace DNA



1) Mutace spontánní

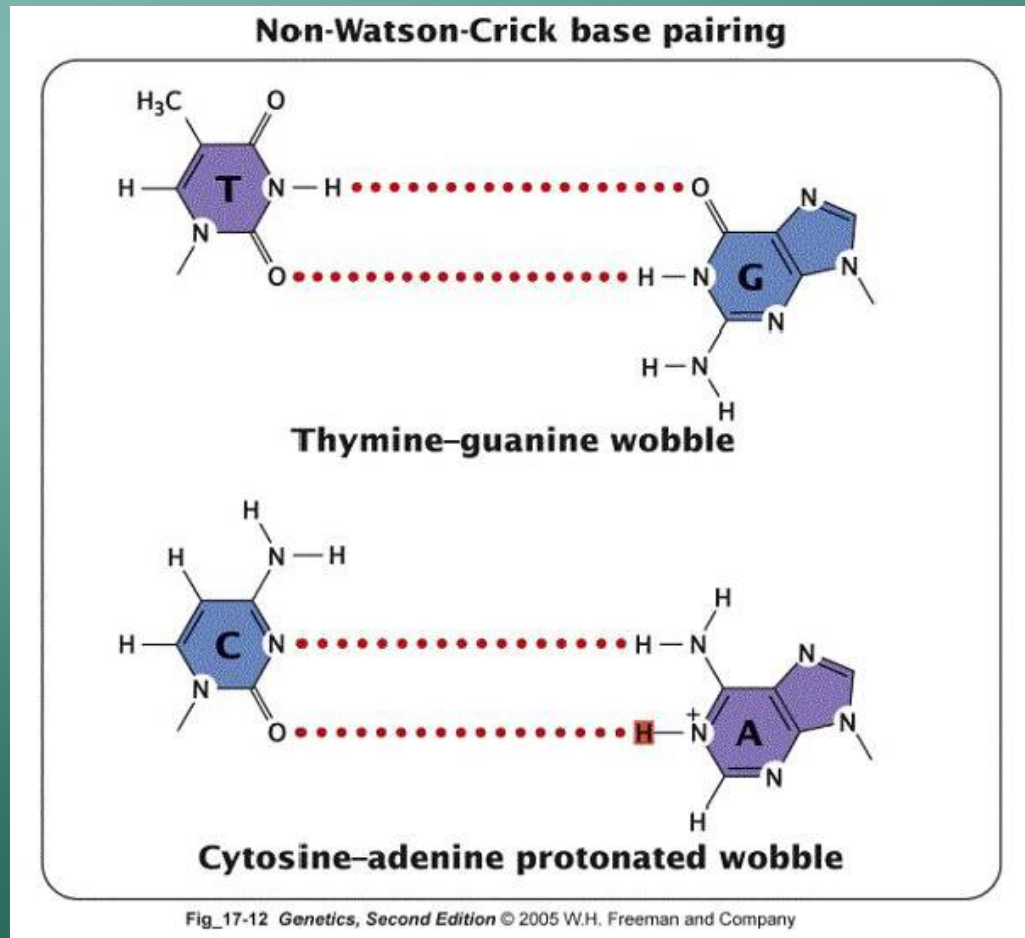


1) Mutace spontánní



B) Kolísavé párování bází (non-Watson-Crick base pairing)

- Dochází k němu díky značné flexibilitě molekuly DNA (tzv. wobble pairing)
- V současnosti se předpokládá, že většina chybného párování při replikaci DNA je způsobena právě kolísavým párováním bází



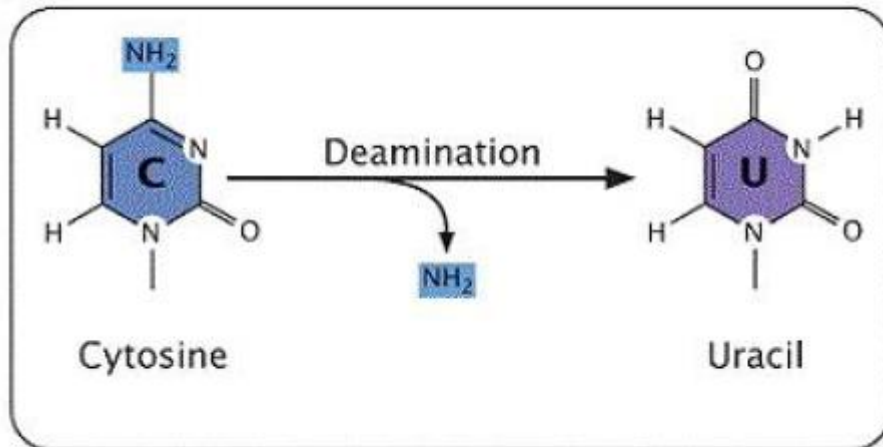
1) Mutace spontánní



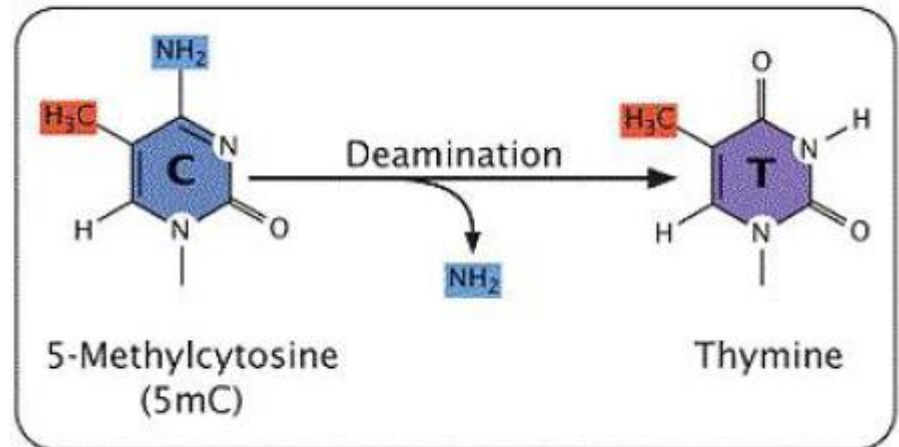
C) Deaminace báží

- deaminací cytosinu vznikne uracil → rozpoznáno uracil DNA glykosylázou → odstraněn a nahrazen C.
- deaminací minoritní báze 5-metylcytozinu (páruje se s G) vznikne thymin. Ten se při replikaci bude párovat s adeninem (A) – záměnová mutace (tranzice)
- deaminací adeninu vznikne hypoxantin, který se páruje s cytozinem → rozpoznán specifickou glykosilázou a nahrazen A

(a)



(b)



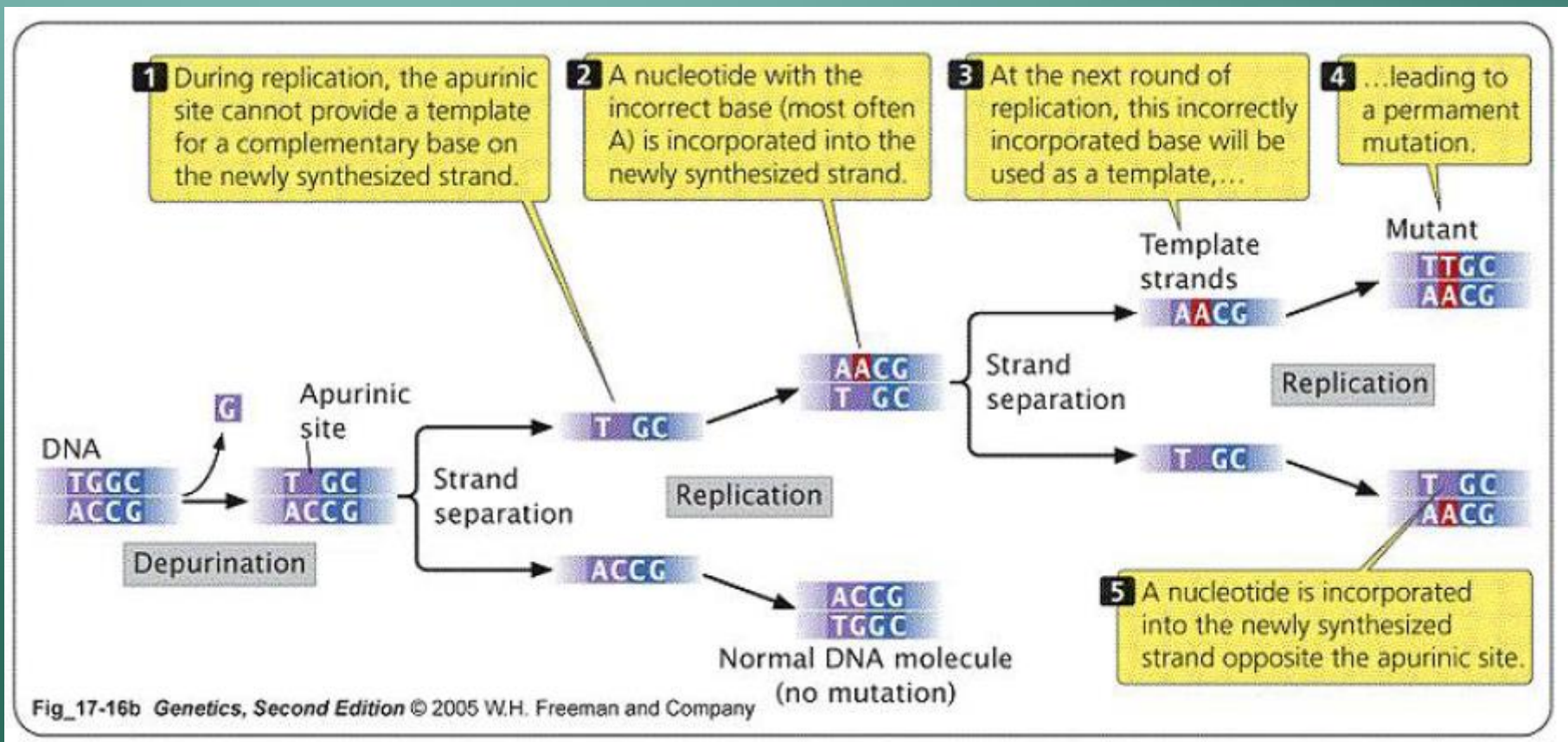
Fig_17-17 Genetics, Second Edition © 2005 W.H. Freeman and Company

1) Mutace spontánní



D) Depurinace

- Ztráta purinu (A, G) z nukleotidu → depurinované místo nemůže sloužit jako komplementární templát při replikaci DNA → vkládá se náhodný nukleotid (nejčastěji A) → chyba při následné replikaci je zafixována
- Depurinace je poměrně častá

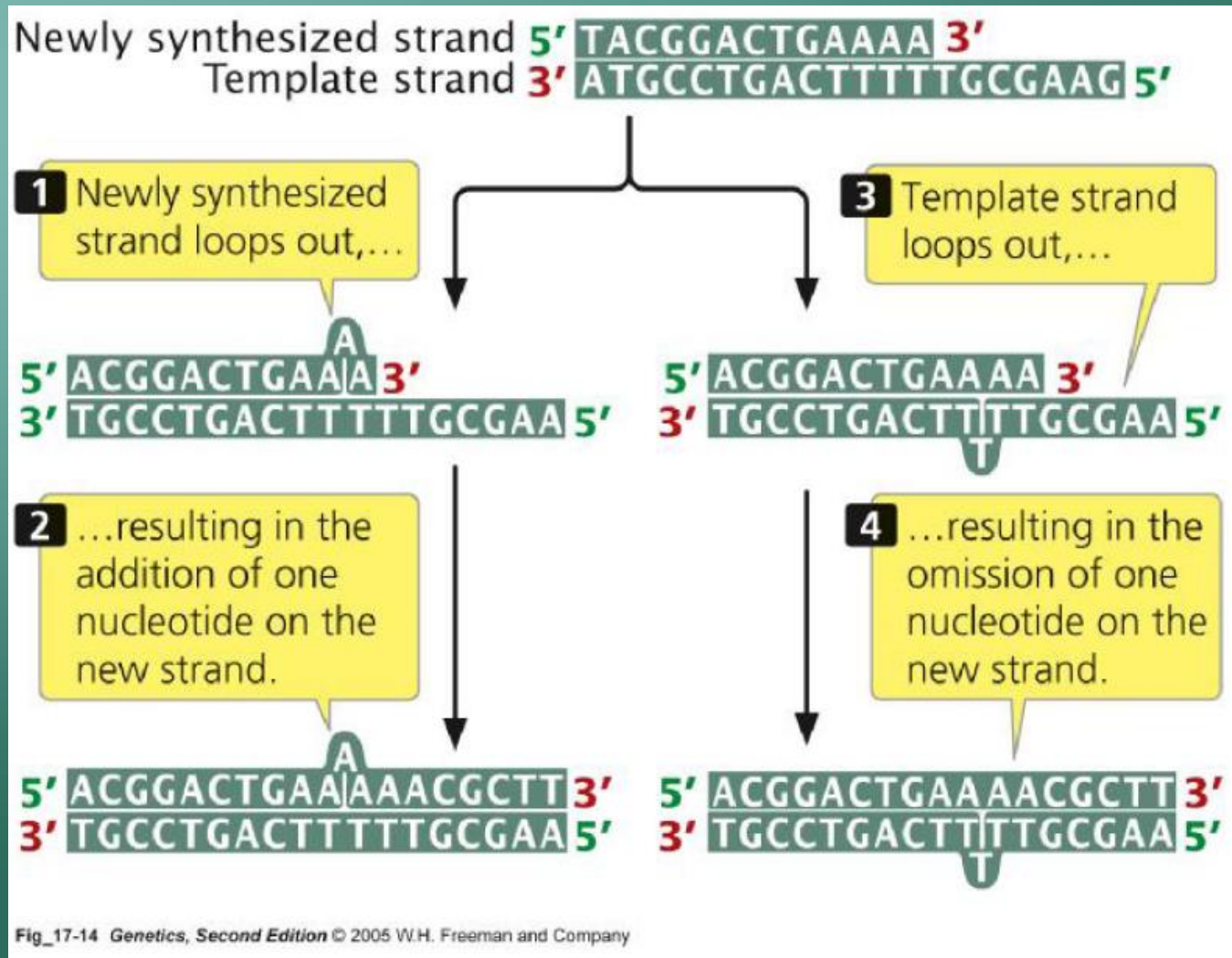


1) Mutace spontánní



E) Vklouzávání vlákna DNA při replikaci

- Dochází tím k inzercím nebo delecím několika nukleotidů → posunové mutace

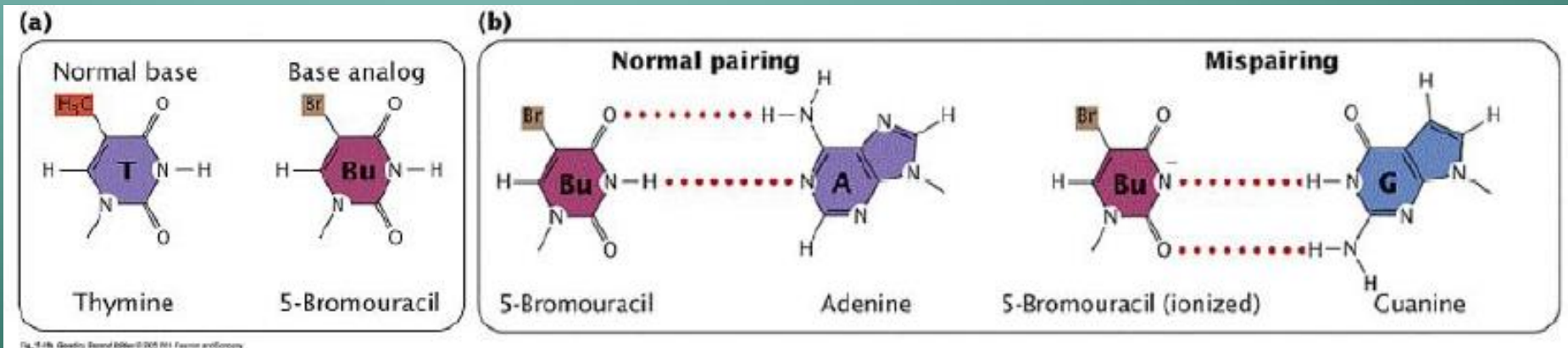


Fig_17-14 Genetics, Second Edition © 2005 W.H. Freeman and Company

1) Mutace indukované - chem. faktory

A) Analogy bází

- Látky připomínající svojí strukturou standardní báze, takže mohou být inkorporovány do replikované molekuly.
- 5-bromouracil (5BU) je analog tyminu a také se normálně páruje s A. Někdy ale může dojít k párování s G, což normálně vede k tranzici (T-A → 5BU-A → 5BU-G → C-G)



- 2-aminopurin (2AP) je analog adeninu - páruje se s T avšak občas také s C – v konečném důsledku tranzice (A-T → 2AP-T → 2AP-C → G-C)

1) Mutace indukované - chem. faktory

B) Kyselina dusitá

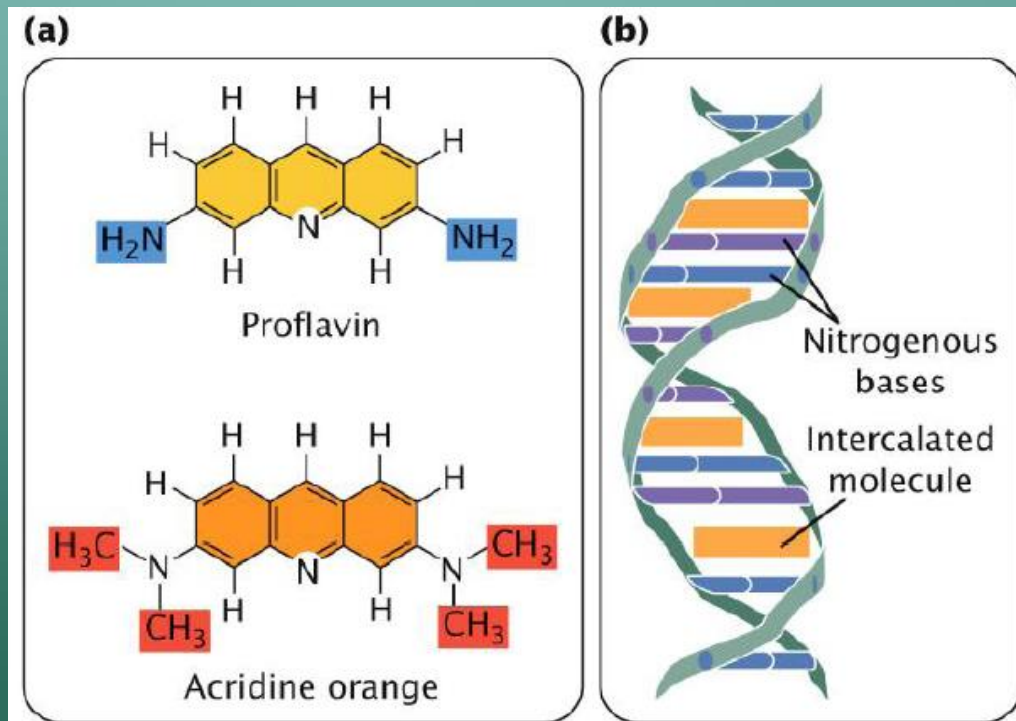
- způsobuje deaminaci bází, především cytozinu

C) Hydroxylamin

- hydroxyluje cytosin na hydroxylamincytosin, který se páruje s adeninem (tranzice C-G → T-A)

D) Interkalační látky

- Svojí strukturou připomínají dvojice bází → vmezeřují se do DNA a narušují její 3D strukturu → jednonukleotidové inserce nebo delece



1) Mutace indukované - chem. faktory

E) Oxidativní reakce

- Látky způsobující poškození DNA prostřednictvím reaktivní formy kyslíku (peroxid vodíku, hydroxylový a superoxidový radikál) – vznikají v buňce během normálního aerobního metabolismu nebo může být jejich vznik indukován ionizujícím zářením
- např. z G vznikne 8-oxy-7,8-dihydrodeoxyguanine, který se často nesprávně páruje s A (tranzice G-C → T-A)

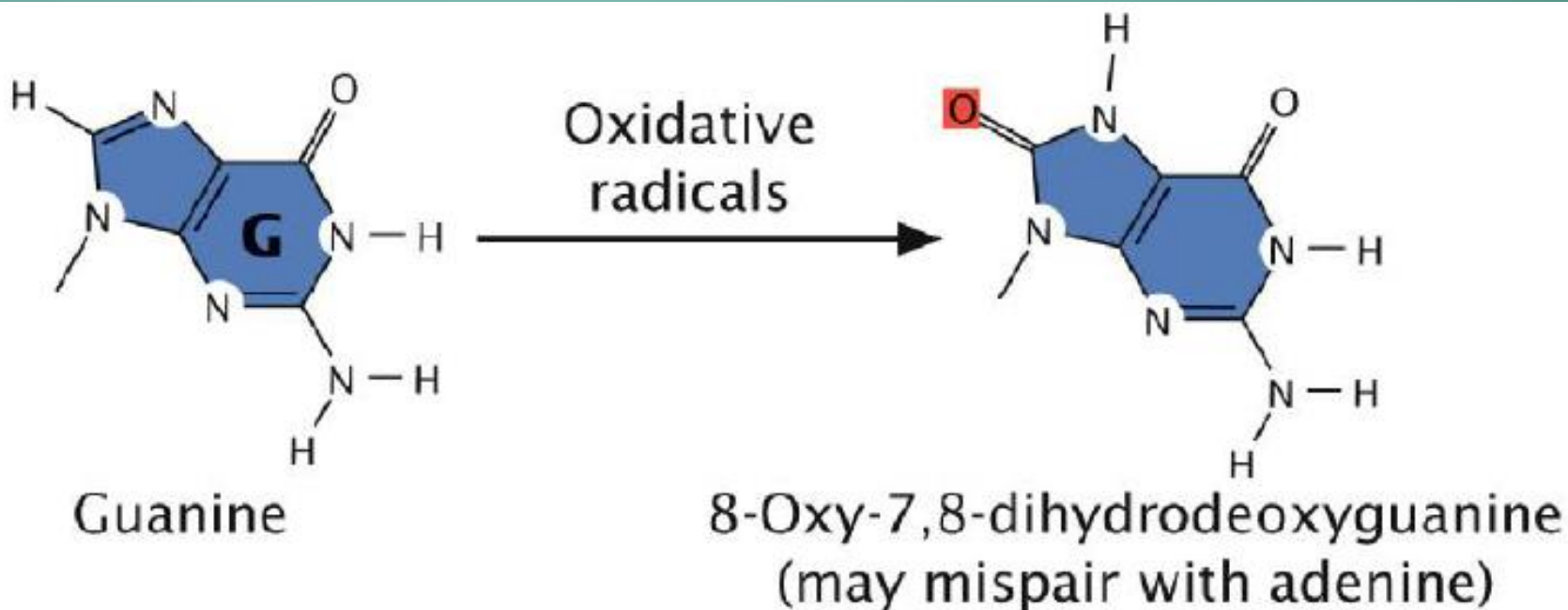


Fig. 17-21 Genetics, Second Edition © 2005 W.H. Freeman and Company

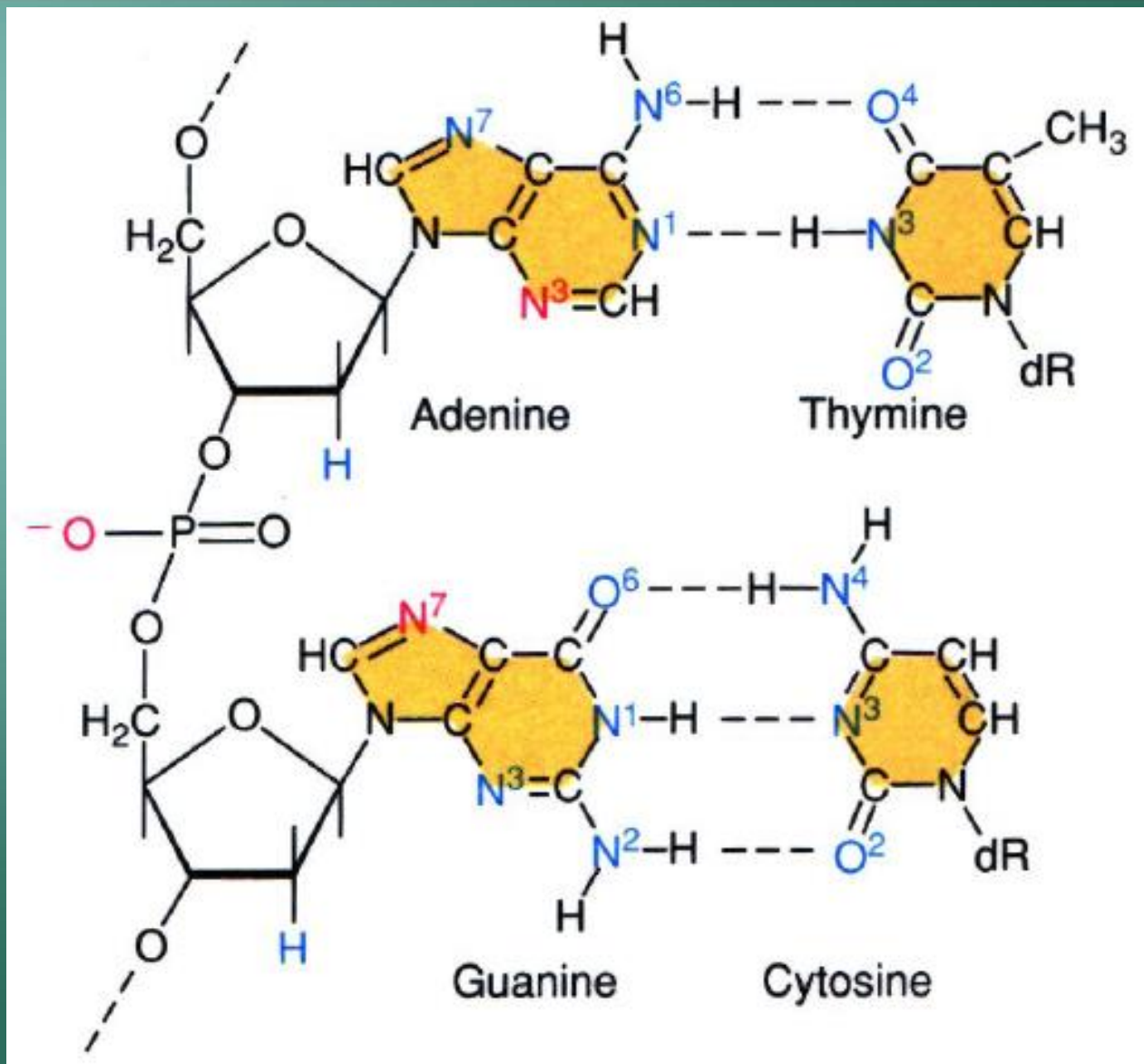
1) Mutace indukované - chem. faktory



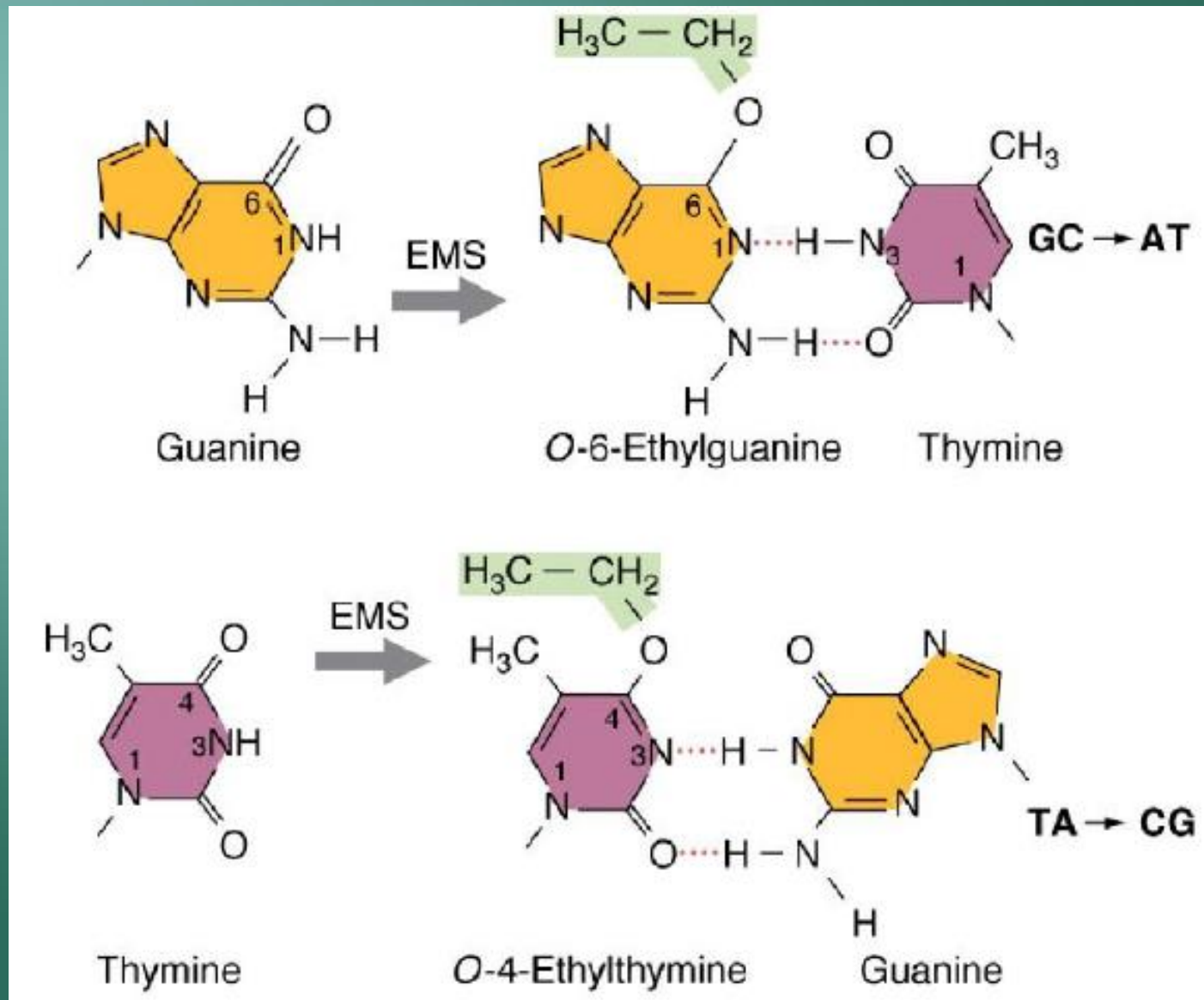
F) Alkylační látky

- elektrofilní látky s afinitou k DNA, která má negativní náboj – každý nukleotid má negativní náboj na fosfátu a parciální negativní náboj na bázi
- alkylační látky reagují s takovými místy a zanechávají na nich alkyl- skupiny (alkylace DNA)
- na bázích jsou nejvíce náchylné k alkylacím N⁷ guaninu a N³ adeninu → destabilizace → vznik apurinního místa → mutace
- alkylovány mohou být rovněž všechny atomy N a O podílející se na tvorbě vodíkových můstků → nesprávné párování takové báze → mutace
- dělí se na:
 - ✓ monofunkční (EMS – etylmetansulfonát; MMS - metylmetansulfonát; ENU – etylnitrosomočovina; MNNS – metylnitronitrosoguanidin)
 - ✓ bifunkční – způsobují hodně chromozomových mutací – zlomů = klastogení účinek; sirný a dusíkatý yperit

1) Mutace indukované - chem. faktory



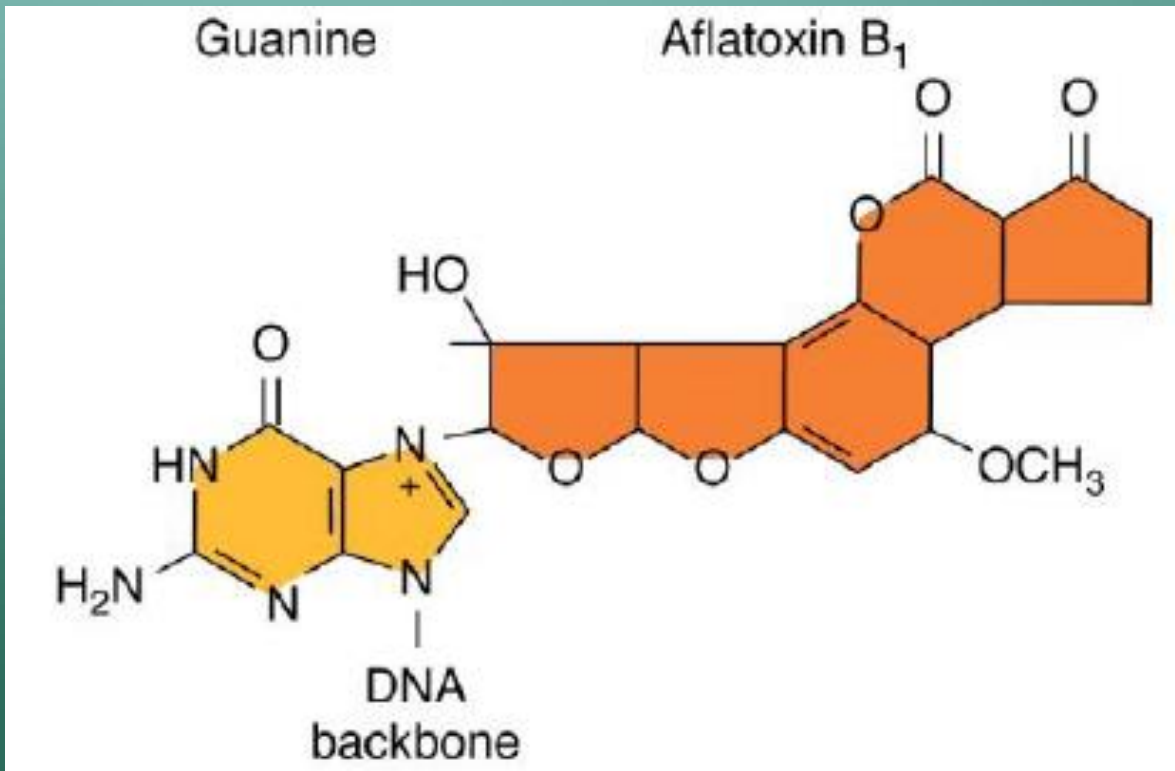
1) Mutace indukované - chem. faktory



1) Mutace indukované - chem. faktory

G) Aflatoxin B₁

- silný karcinogen produkovaný plísněmi (aflatoxiny jsou akutně toxické, karcinogenní, mutagenní a teratogenní)
- váže se na guanin v pozici N⁷ → destabilizace vazby báze-cukr → vznik depuronovaného místa → mutace
- na výskyt aflatoxinů jsou choulostivé potraviny jako: arašídy, para ořechy, chilli, koření, sušené ovoce (např. fíky), sója, kukuřice



1) M. indukované – fyzikální faktory



A) UV záření

- má nízkou energii → proniká jen nepatrně (povrchově) a nezpůsobuje ionizaci, nicméně je vysoce mutagenní
- způsobuje tvorbu pyrimidinových dimerů (nejčastěji T-T, méně často C-C nebo C-T) v rámci jednoho vlákna DNA vytvořením cyklobutanového kruhu → změna 3D struktury DNA → inhibice replikace a transkripce
- nejsilnější mutagenní účinek má UV záření o vlnové délce 260 nm (DNA nejsilněji absorbuje záření právě takové vlnové délky)

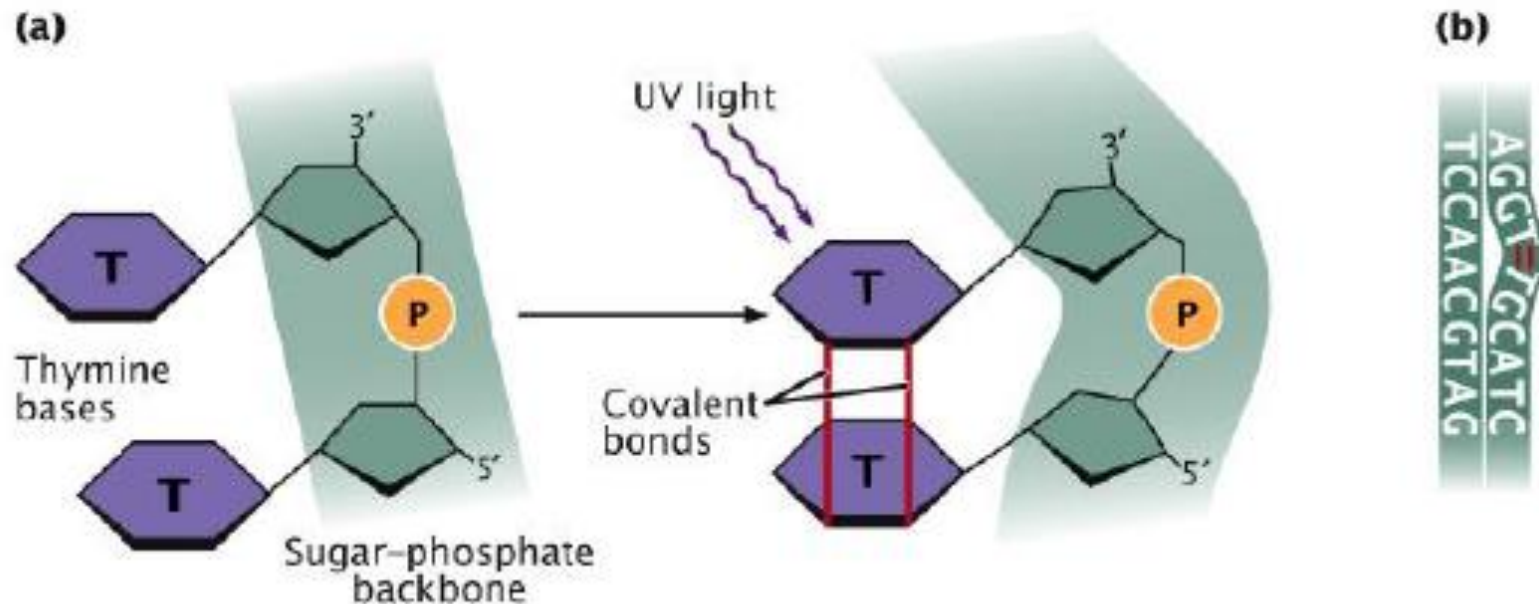


Fig. 17-24 Genetics, Second Edition © 2005 W.H. Freeman and Company

1) M. indukované – fyzikální faktory



B) Ionizující záření

- má vysokou energii → vysoce pronikavé
- způsobuje tvorbu volných radikálů a reaktivních iontů, které napadají DNA a vedou nejčastěji k dvouřetězcovým zlomům = jedná se o klastogen = mutagen způsobující zlomy → nepřímý účinek
- přímý účinek → přímý zásah molekuly DNA a její zlomení (rozštěpení)

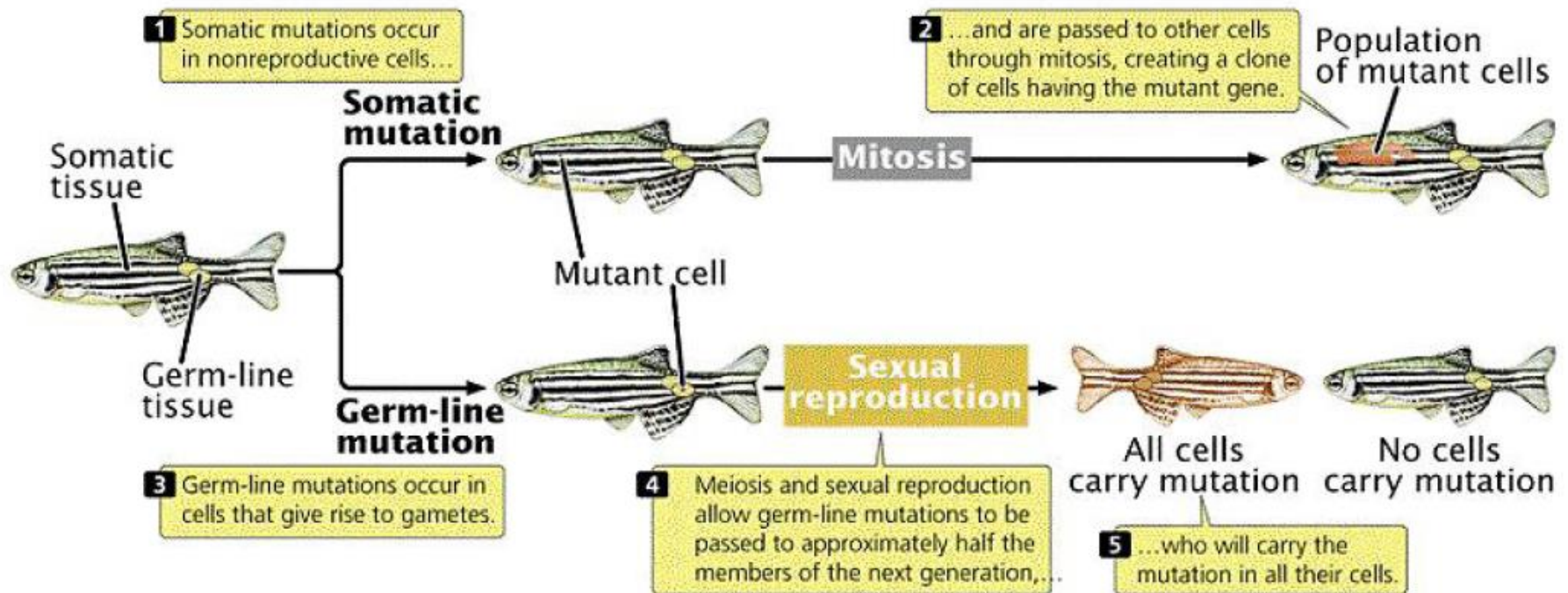
C) Další typy záření

- záření X (rentgenové)
- Gama záření

1) M. indukované – biologické faktory

- podmíněné transpozicemi mobilních genetických elementů nebo integracemi retrovirů nebo a T-DNA
- somaklonální variabilita – genetické a epigenetické změny v rostlinných a tkáňových kulturách

2) Somatické vs. gametické mutace



Fig_17-02 *Genetics, Second Edition* © 2005 W.H. Freeman and Company

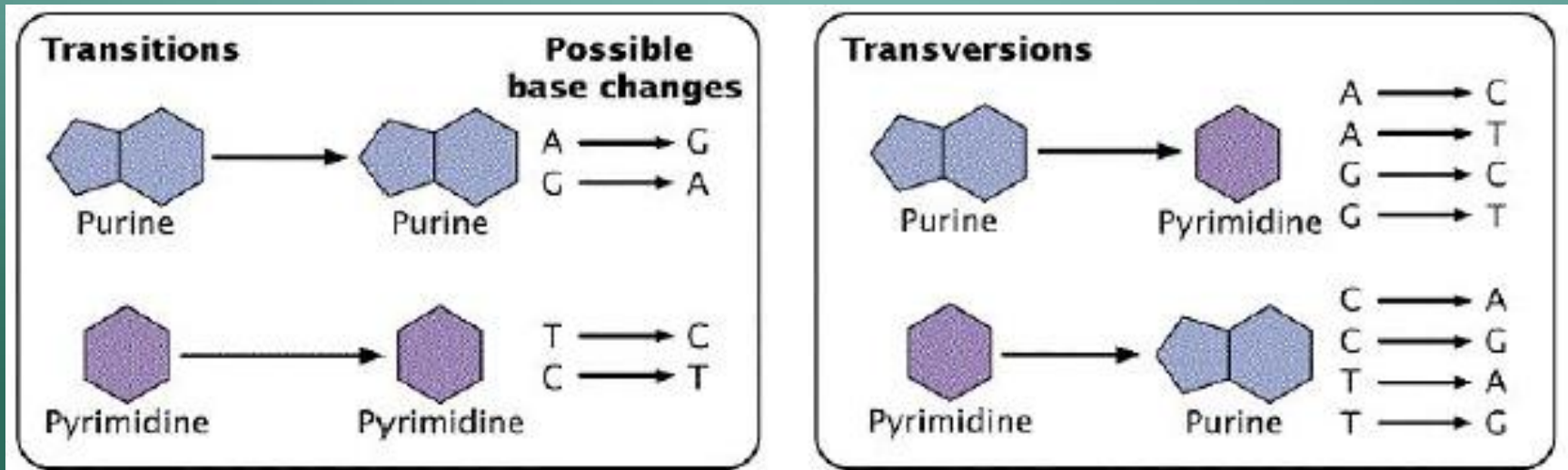
3) Mutace genové



Typy mutací

A) Substituce (záměna, nahrazení) bází

- **Tranzice** – záměna purinu za purin ($A \rightarrow G$; $G \rightarrow A$) nebo pyrimidinu za pyrimidin ($C \rightarrow T$ nebo $T \rightarrow C$)
- **Transverze** – záměna purinu za pyrimidin (např. $A \rightarrow T$; $G \rightarrow C$) nebo pyrimidinu za purin (např. $C \rightarrow A$; $T \rightarrow G$)
 - Transverze má dramatictější následky než tranzice jak z hlediska genetického (degenerace genetického kódu) tak z hlediska chemického



Fig_17-04 Genetics, Second Edition © 2005 W.H. Freeman and Company

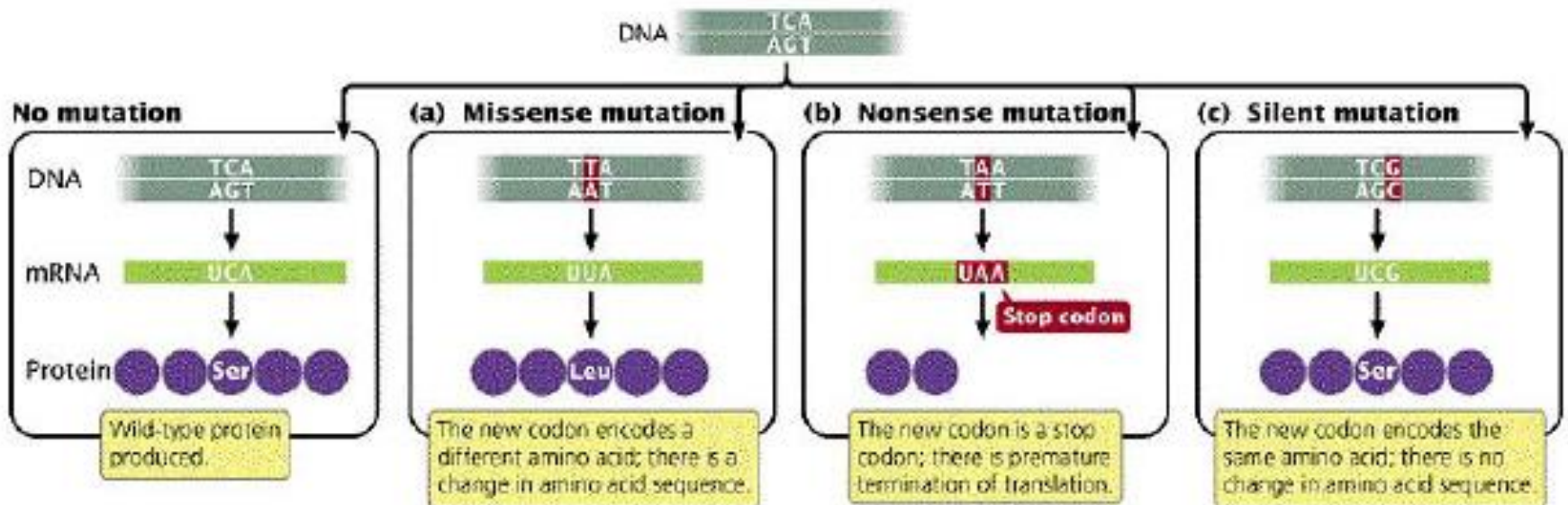
3) Mutace genové



A) Substitute

Z hlediska následků substitute mohou nastat následující situace:

- **Mutace měnící smysl (nesynonymní, „missense“ mutations)** – vedou ke změně proteinového produktu (změna AK)
- **Mutace neměnící smysl (synonymní, tiché, „silent“ mutace)** – nevedou ke změně proteinového produktu. Vznikají v kódujících i nekódujících úsecích. Nově se zjistilo, že i tyto mutace mohou mít vliv na proces transkripce a translace a vzniklé proteinové produkty nemusejí být 100 % funkční
- **Mutace nesmyslné („nonsense“)** – taková kdy dojde ke vzniku stop kodonu - předčasnému ukončení transkripce nebo translace



3) Mutace genové



Výhoda degenerace genetického kódu s ohledem k mutacím

	U		C		A		G	
U	UUU	fenylalanin	UCU	serin	UAU	tyrosin	UGU	cystein
	UUC	fenylalanin	UCC	serin	UAC	tyrosin	UGC	cystein
	UUA	leucin	UCA	serin	UAA	stop	UGA	stop
	UUG	leucin	UCG	serin	UAG	stop	UGG	tryptofan
C	CUU	leucin	CCU	prolin	CAU	histidin	CGU	arginin
	CUC	leucin	CCC	prolin	CAC	histidin	CGC	arginin
	CUA	leucin	CCA	prolin	CAA	glutamin	CGA	arginin
	CUG	leucin	CCG	prolin	CAG	glutamin	CGG	arginin
A	AUU	izoleucin	ACU	treonin	AAU	asparagin	AGU	serin
	AUC	izoleucin	ACC	treonin	AAC	asparagin	AGC	serin
	AUA	izoleucin	ACA	treonin	AAA	lysin	AGA	arginin
	AUG	metionin	ACG	treonin	AAG	lysin	AGG	arginin
G	GUU	valin	GCU	alanin	GAU	kys.	GGU	glycin
	GUC	valin	GCC	alanin	GAC	asparagová	GGC	glycin
	GUA	valin	GCA	alanin	GAA	kys.	GGA	glycin
	GUG	valin	GCG	alanin	GAG	glutamová	GGG	glycin

3) Mutace genové



B) Inzerce (vložení) a delece (ztráta)

- Tento typ mutací je častější než substituce
- Pokud dojde ke změně počtu, který je násobkem tří, může dojít k tzv. **in-frame mutacím**, kdy dojde pouze ke změně počtu AK v peptidovém řetězci
- Pokud dojde ke změně počtu, který není násobkem tří, dochází k tzv. **posuvným „frameshift“ mutacím** – dochází k posunu čtecího rámce a ke změnám ve všech tripletech od místa mutace – záměna AK nebo vznik předčasného stop kodonu

Insertion

5'	AUG	CGA	UUA	UAC	GGG	3'
	Met	Arg	Leu	Tyr	Gly	

↓

5'	AUG	CGA	UUA	UUA	CGG	G	3'
	Met	Arg	Leu	Leu	Arg		

Deletion

5'	AUG	CGA	UUA	UAC	GGG	AAA	3'
	Met	Arg	Leu	Tyr	Gly	Lys	

↓

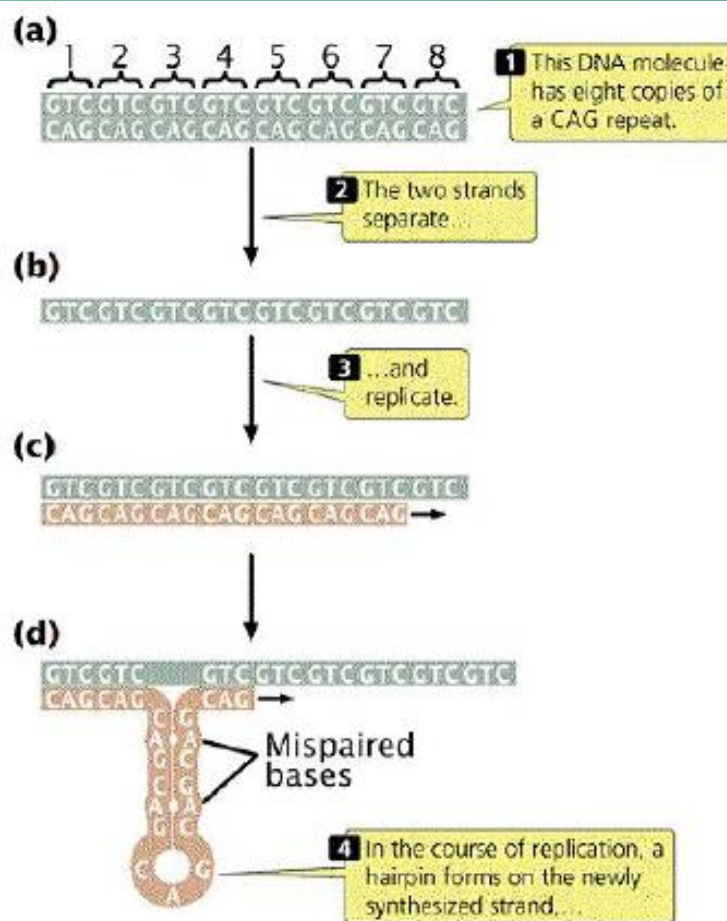
5'	AUG	CGA	UUA	UAG	GGA	AA	3'
	Met	Arg	Leu	Stop			

3) Mutace genové

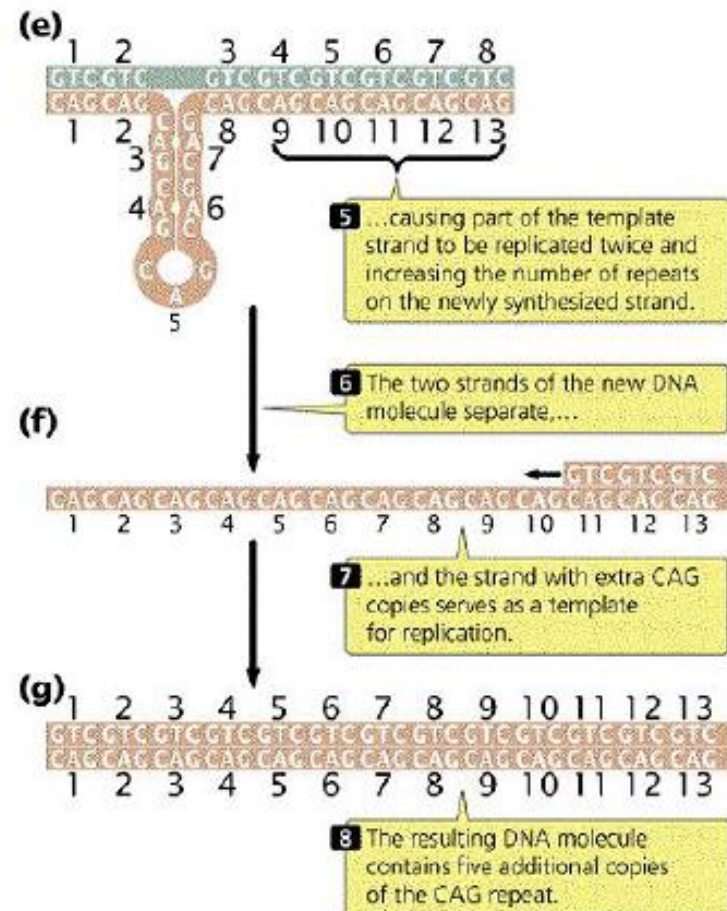


C) Expanze trinukleotidových repetice

- Poměrně nový typ mutací, objevený v roce 1991
- Dochází při něm ke zvyšování počtu trinukleotidových přirozeně se vyskytujících repetice



Fig_17-06-1 Genetics, Second Edition © 2005 W.H. Freeman and Company



Fig_17-06-2 Genetics, Second Edition © 2005 W.H. Freeman and Company

3) Mutace chromozomové (aberrace)



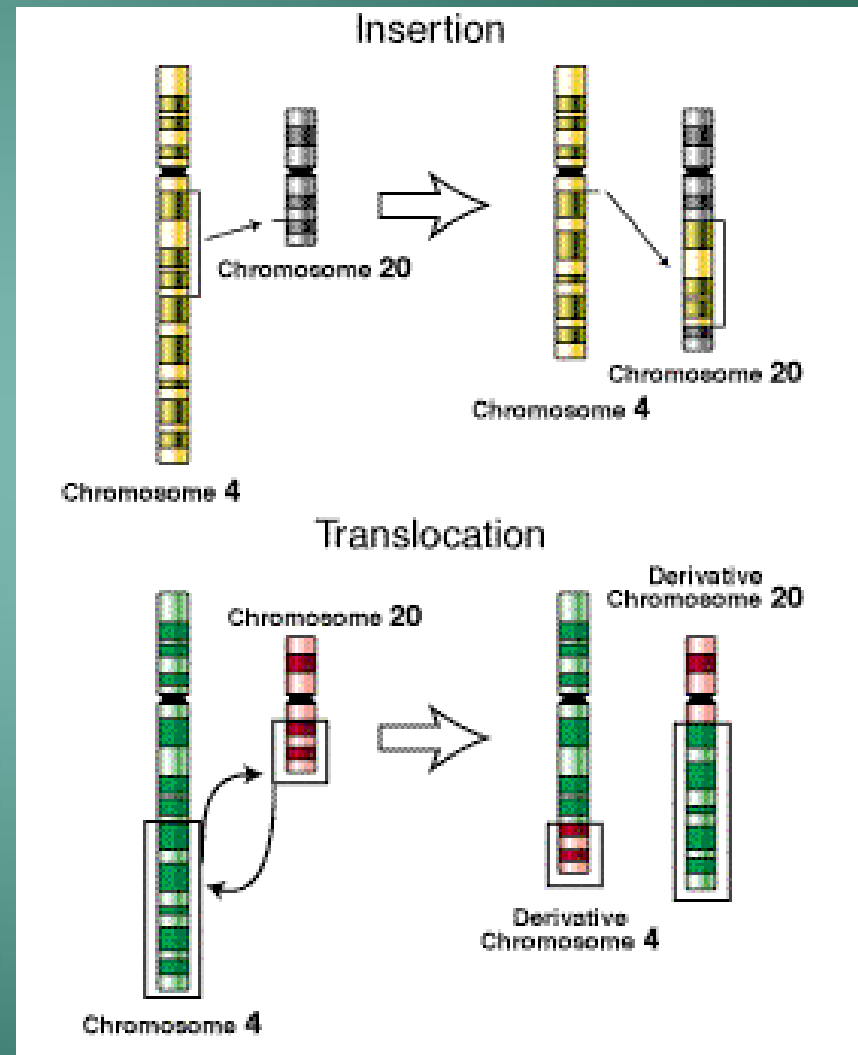
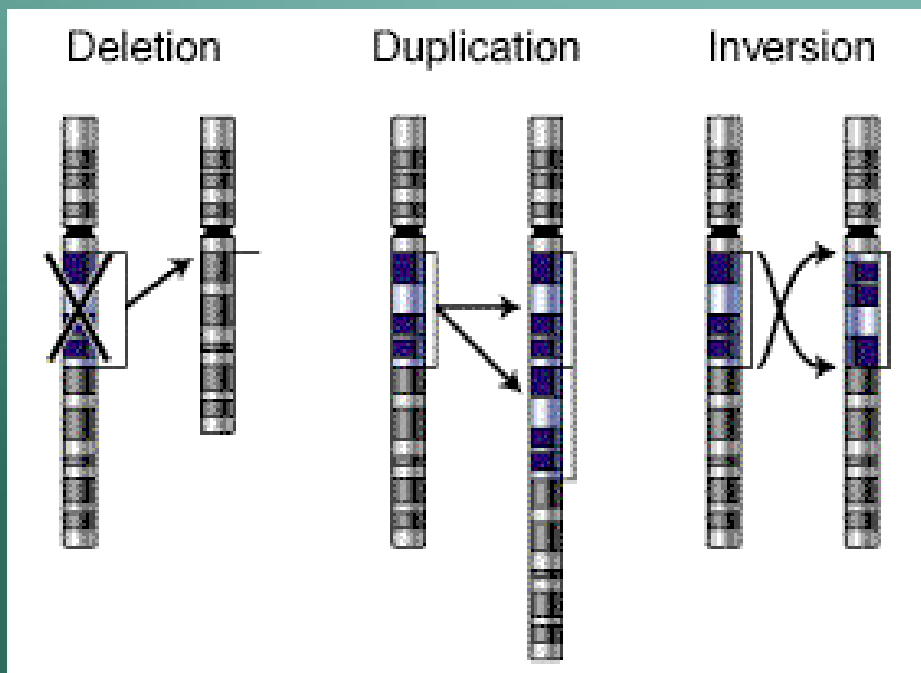
- **Balancované** - zachováno původní množství genetické informace.
- **Nebalancované** - původní množství genetické informace zachováno není

Podle mechanismu vzniku klasifikujeme chromozomální přestavby takto:

- **Duplikace** – znásobení úseku chromozomu. Může být způsobeno např. nerovnoměrným crossing-overem
- **Delece** – ztráta části chromozomu. Deletován může být konec raménka (potom jde o terminální delecii) nebo střední část některého z ramének chromozomu (intersticiální delece). Delece vznikají jako následek chromozomální nestability nebo nerovnoměrného crossing-overu.
- **Inverze** – vyštěpení části chromozomu, její převrácení a zpětnému napojení. Pokud je na invertované části chromozomu centromera, je inverze označována jako pericentrická; pokud na invertovaném úseku centromera není jde o inverzi paracentrickou.
- **Inzerce** – vzniká jako následek minimálně 3 chromozomálních zlomů, kdy dojde k začlenění části chromozomu (vyštěpené z určitého chromozomu) do jiného chromozomu.

3) Mutace chromozomové (aberrace)

- **Translokace** – výměna částí nehomologních chromozomů.
- **Fragmentace** – krajní případ chromozomové aberrace, kdy dojde k rozpadu chromozomu na fragmenty.



3) Mutace chromozomové (aberrace)



- **Izochromozom** - chromozom, který má pouze dlouhá, či naopak pouze krátká raménka. Vzniká chybným mitotickým rozestupem chromozomů, kdy nedojde k rozestupu chromatid, ale do jedné dceřiné buňky se dostanou obě krátká raménka a do druhé obě raménka dlouhá.
- **Ring chromozom** - pokud dojde u chromozomu k delecí konců obou ramének (telomer), může se tento chromozom stočit, koncové části se spojí a vznikne "kolečko" - tedy kruhový chromozom (ring chromosome).
- **Marker chromozom** - malý chromozomální fragment, který získal schopnost existovat samostatně jako chromozom i v průběhu mitotického dělení. Musí mít tedy funkční centromeru, jako kterýkoliv jiný chromozom.

3) Mutace genomové



Terminologie pro variabilitu počtu chromozomů

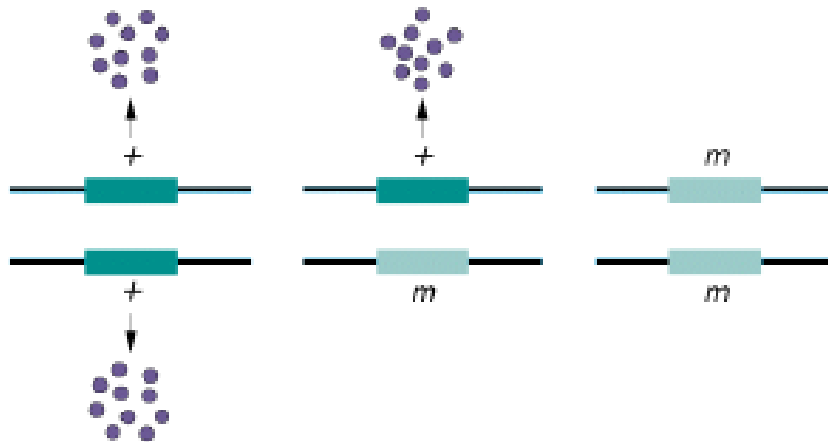
Aneuploidie	$2n \pm \text{chromozom}$
nulizomie	$2n - 2$
monozomie	$2n - 1$
trizomie	$2n + 1$
tetrazomie, pentazomie	$2n + 2$; $2n + 3$ atd.
Euploidie	Násobení n
diploidie	$2n$
polyploidie • triploidie • tetraploidie, pentaploidie, atd. • autopolyploidie • allopolyploidie	$3n, 4n, 5n$ • $3n$ • $4n, 5n$ atd. • znásobení stejného genomu (např. AAAA) • znásobení odlišných genomů (např. AABB)

http://user.mendelu.cz/urban/vsg1/mendel/klas_cyto5.html

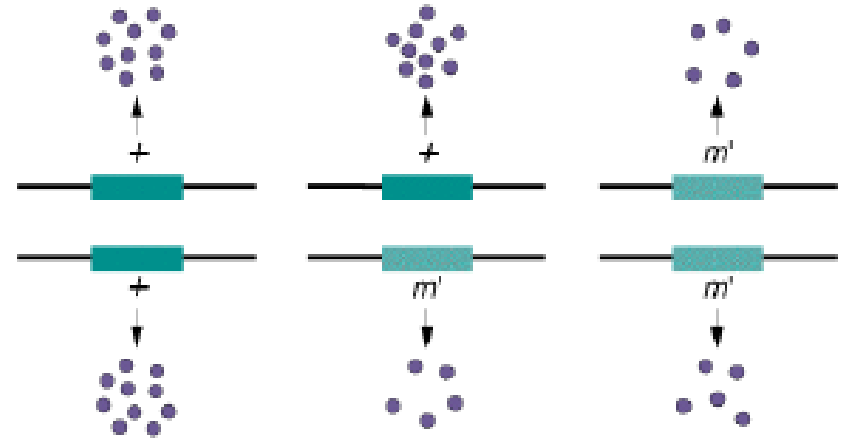
4) Letalita, semiletalita, supervitalita



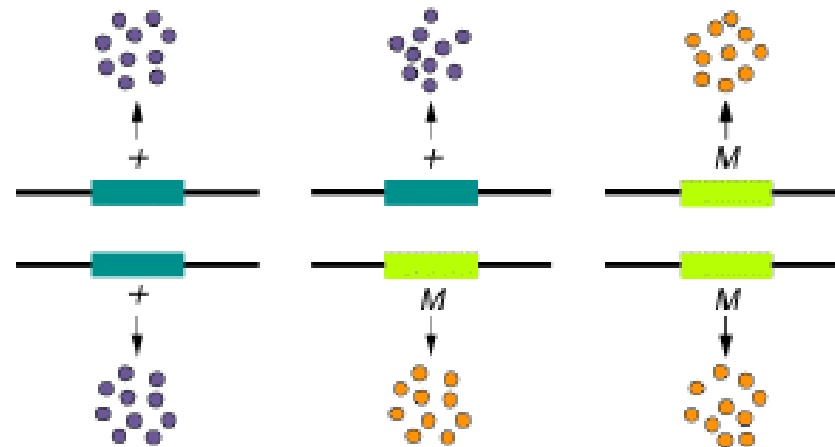
(a) Loss-of-function mutation (m)



(b) Leaky loss-of-function mutation (m')



(c) Gain-of-function mutation (M)





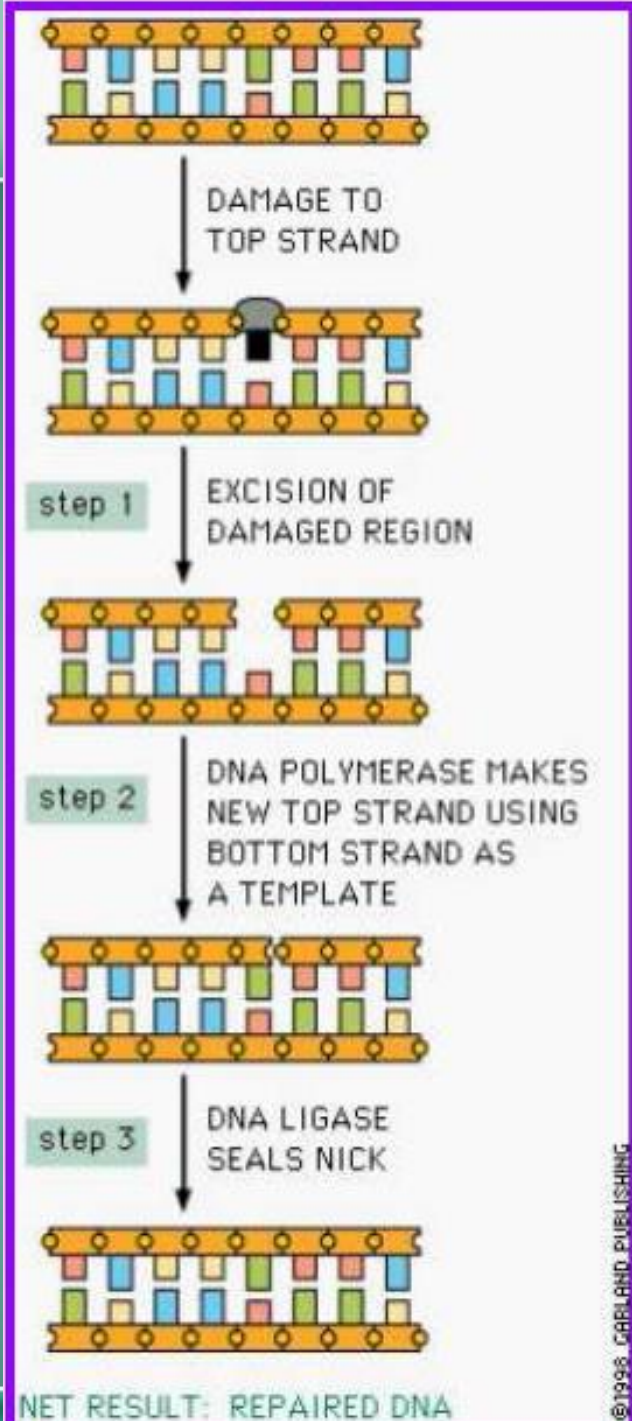
Co je reparace ?

- Enzymatické odstranění chyb v DNA, které vznikly v průběhu replikace, rekombinace nebo působením vnějších vlivů
- DNA je jediná molekula, která je opravována, ostatní jsou vyměněny! Oprav DNA se účastní asi 130 genů
- K mutacím dochází nejčastěji během proliferace. Většina je jich opravena už v průběhu replikace DNA „kontrolním čtením“ DNA polymerázou - korektura.

Reparace DNA

Obecný princip oprav DNA

- 1) Rozeznání a odstranění chybného místa
 - 2) Vyplnění mezery
 - 3) Spojení řetězce DNA
- Body 2-3 téměř stejné u různých typu oprav, v bodu 1 jsou u různých oprav zúčastněny různé proteiny





Typy reparací

- 1) Přímá reparace
- 2) Nepřímá reparace (Excizní)
- 3) Reparace dvouřetězcových zlomů
- 4) SOS reparace

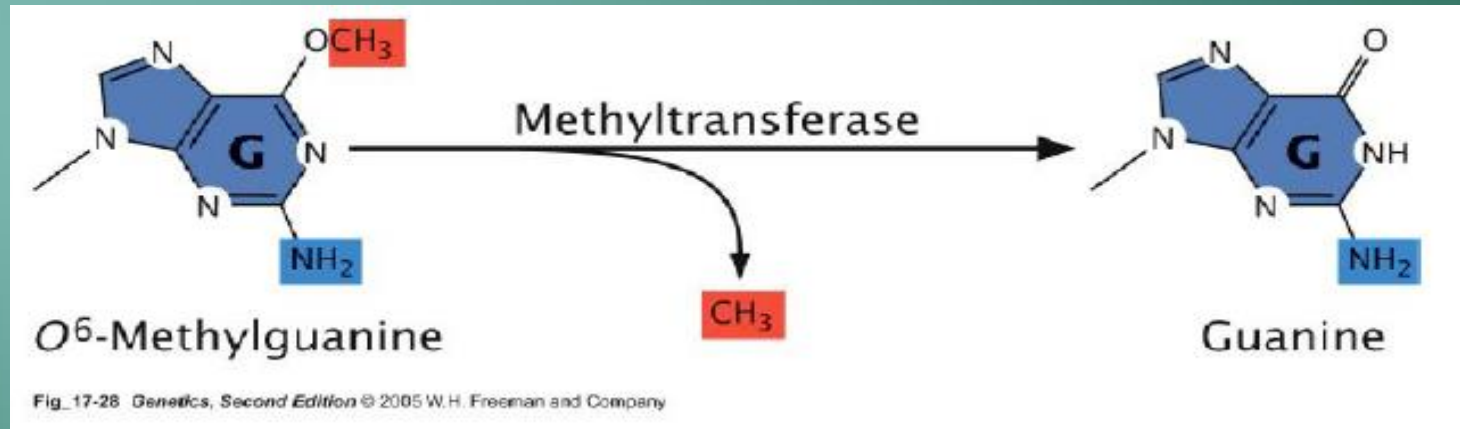
1) Přímá reparace

- Oprava alkylací a metylací – není potřeba zlomu
- Fotoreaktivace - opravy (štěpení) pyrimidinových dimerů absorpcí kvant viditelného záření – porušení kovalentních vazeb – enzym CPD photolyáza – není u savců!!! Je aktivován světlem vlnové délky 340-400 nm

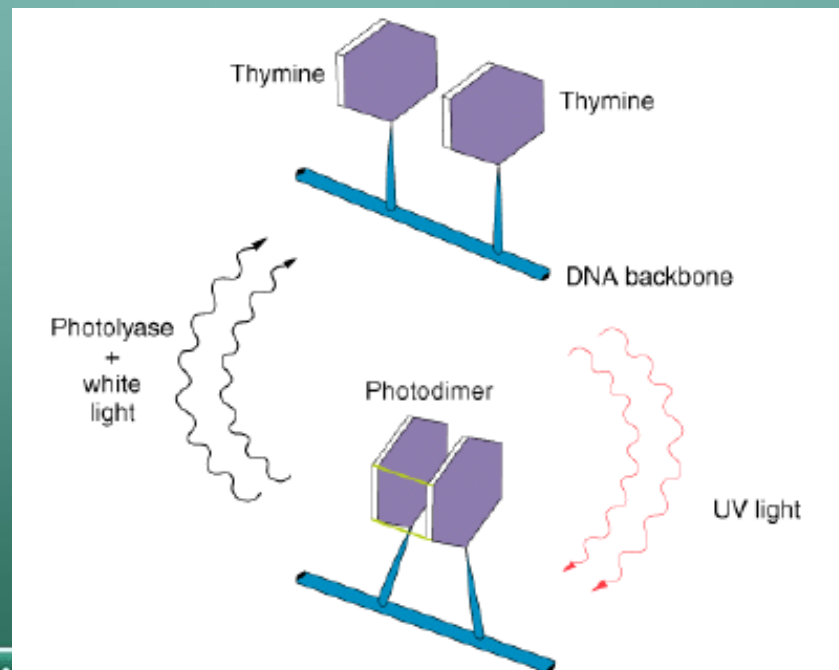
Reparace DNA - přímá



Oprava alkylací a metylací



Fotoreaktivace



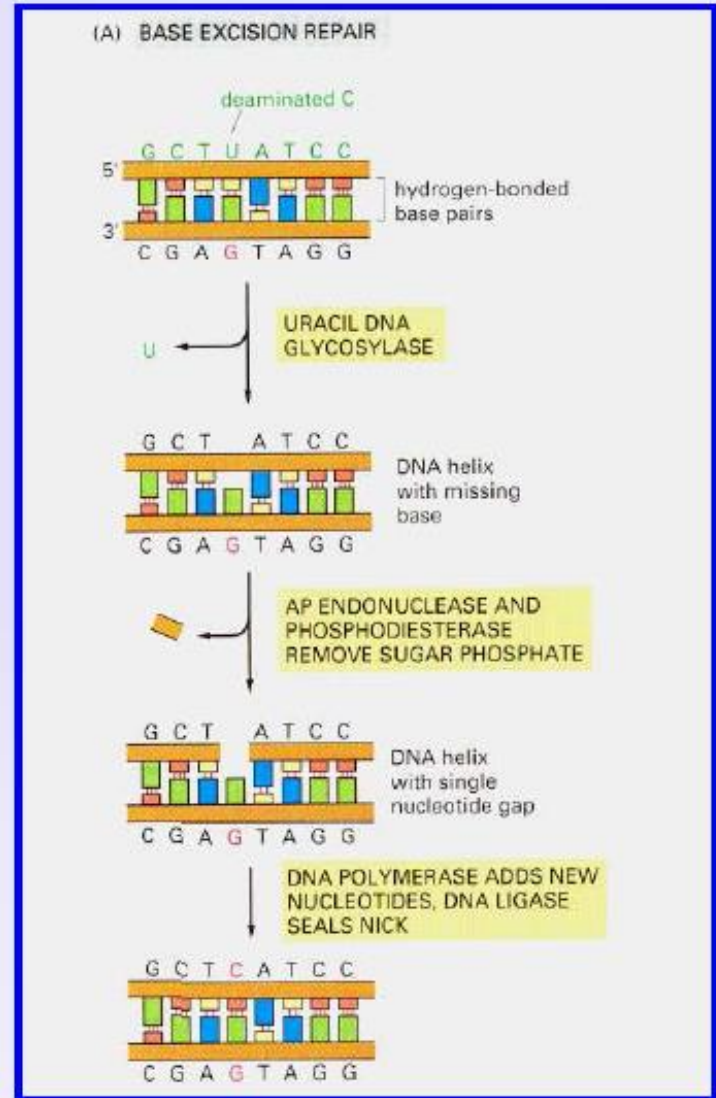
Reparace DNA - nepřímá



BER -Base excision repair

V každé b našeho těla proběhne asi 20000 x denně. Opravy důsledků oxidačního stresu

1. Odstranění porušené baze **DNA glykosylázou**
2. Odstranění deoxyribóza fosfátu (**endonukleáza a fosfodiesteráza**)
3. Výměna za správný nukleotid - **DNA- polymeráza β** (1 z 11 polymeráz)
4. Spojení **ligáza** (ATP)



Reparace DNA - nepřímá



NER - Nucleotide Excision Repair

Rozdíly od BER

Používá jiné enzymy. Přestože je špatná jen 1 báze, je jich vystřiženo a opraveno více (12). Opravuje např. thyminové dimery nebo důsledky oxidačního stresu, modifikované baze.

1. Rozpoznání **proteinovými faktory** (podjednotky **endonukleázy** - UvrA,B,C) - na základě deformace DNA
2. Vystřižení postiženého místa s okolím v obou směrech (**nukleáza**).

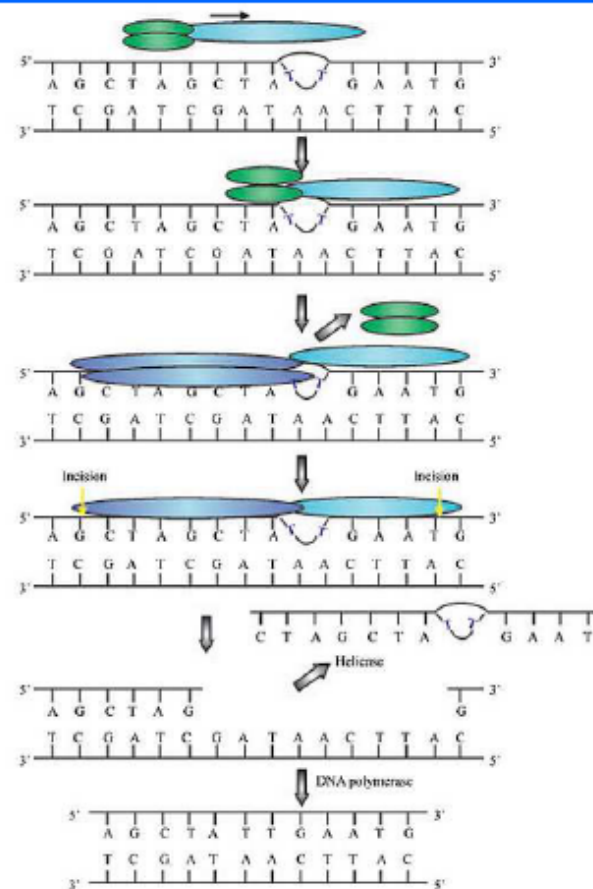


Figure 2. Schematic representation of nucleotide excision repair. The UvrAB heterodimer scans the DNA searching for large distortions in the helix such as the ones caused by pyrimidine dimers. Once a damaged site is found, UvrA proteins (dark green) dissociate, and a stable UvrB-DNA (light green) complex is formed. UvrC (blue) associates to bound UvrB and enables UvrB protein to nick the DNA at the fourth nucleotide 3' to the site of damage. Following the 3' incision, UvrC protein catalyzes nicking of the DNA at the seventh nucleotide, 5' to the damage. The potential oligonucleotide fragment that is generated is removed by a helicase. The remaining gap is filled up by polymerase synthesis and repair is completed by ligation.

Reparace DNA - nepřímá



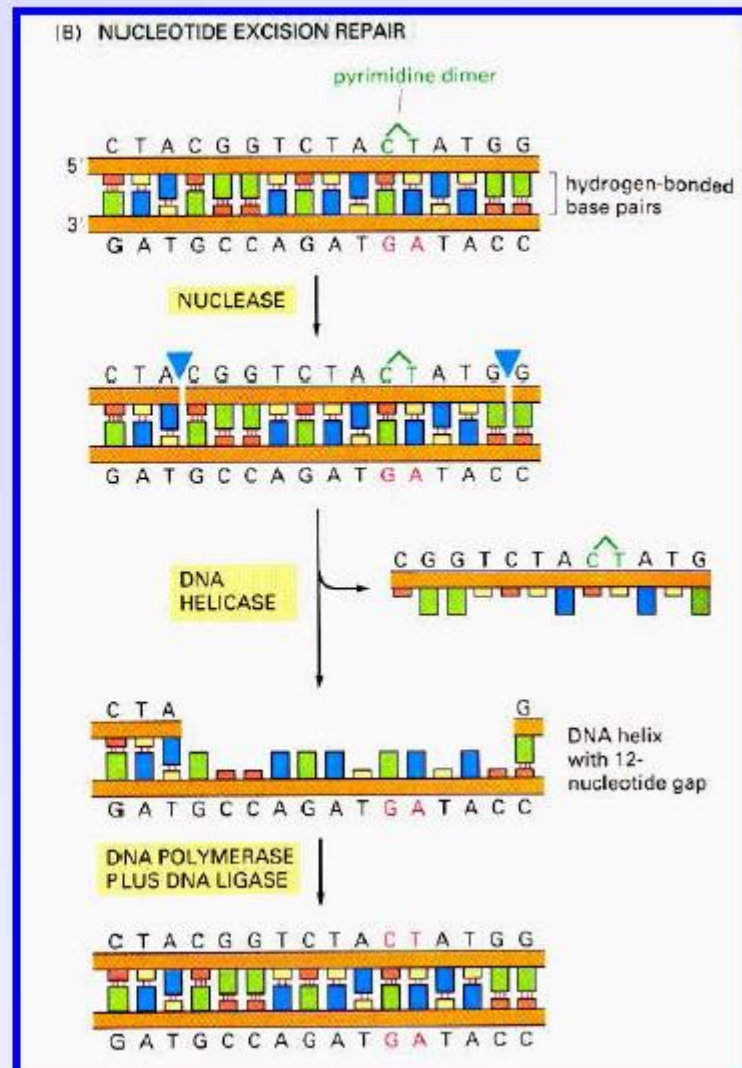
NER - Nucleotide Excision Repair

3. Rozmotání DNA -
bublina (transkripční
faktory IIH, TFIIH)
DNA-helikáza

4. Syntéza na základě
komplementárního
vlákna (**DNA**
polymeráza δ a ϵ)

5. Spojení **DNA ligázou**

Chyby - **Xeroderma**
Pigmentosum



Reparace DNA - nepřímá

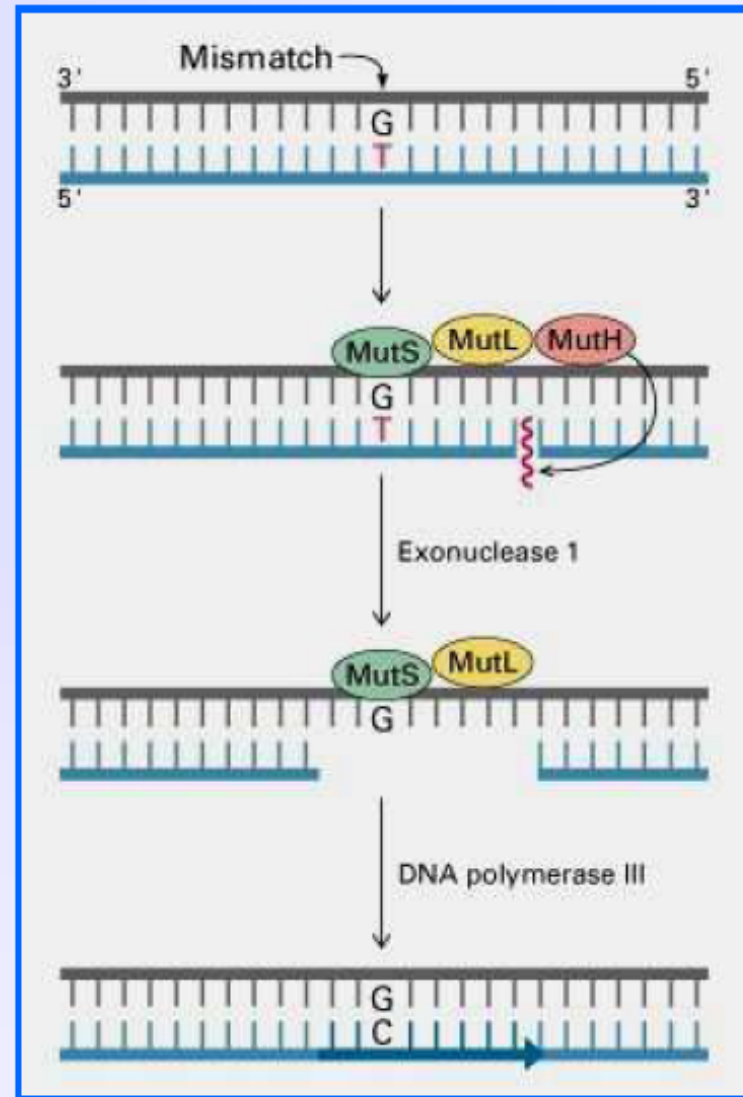


MMR - Mismatch Repair

Opravuje **chyby v párování**, špatně zařazené nukleotidy

Existuje celý **komplex proteinů** pro tyto opravy - MutS protein nasedá s MutL na špatně zařazenou bázi a aktivují MutH, který vytvoří štěrbinu v nově vznikajícím řetězci. Takto porušený řetězec je vyštěpen **exonukleázou**, resyntetizován **DNA polymerázou** a spojen **DNA ligázou**. U eukaryont homology MutS=MSH, MutL=MLH

Chyby - **predispozice k nádorům střev**



Reparace DNA – dvouřetězcové zlomy



Existují dva základní mechanismy opravy:

- i) homologní rekombinace (jako templát pro opravu DSB využívá totožné nebo velmi podobné sekvence DNA)
- ii) nelegitimní rekombinace (NHEJ – nonhomologous end joining; rekombinuje zcela odlišné sekvence)

Homologní rekombinace (HR)

- je důležitá při opravě DNA v somatických buňkách a při meióze
- existují 3 modely HR (založené ovšem především na studiích na kvasinkách)

Nelegitimní rekombinace (NHEJ)

- nejčastější způsob opravy DSB v eukaryotních buňkách
- iniciační rozpoznání zlomu je zprostředkováno komplexem KU70 a KU80
- následuje opracování konců DNA molekuly (komplex MRN), aby byly substrátem pro DNA ligázu
- závěrečná ligace je katalyzována komplexem DNA ligázy IV a proteinu XRCC4

Reparace DNA – dvouřetězcové zlomy



Non Homologous End Joining

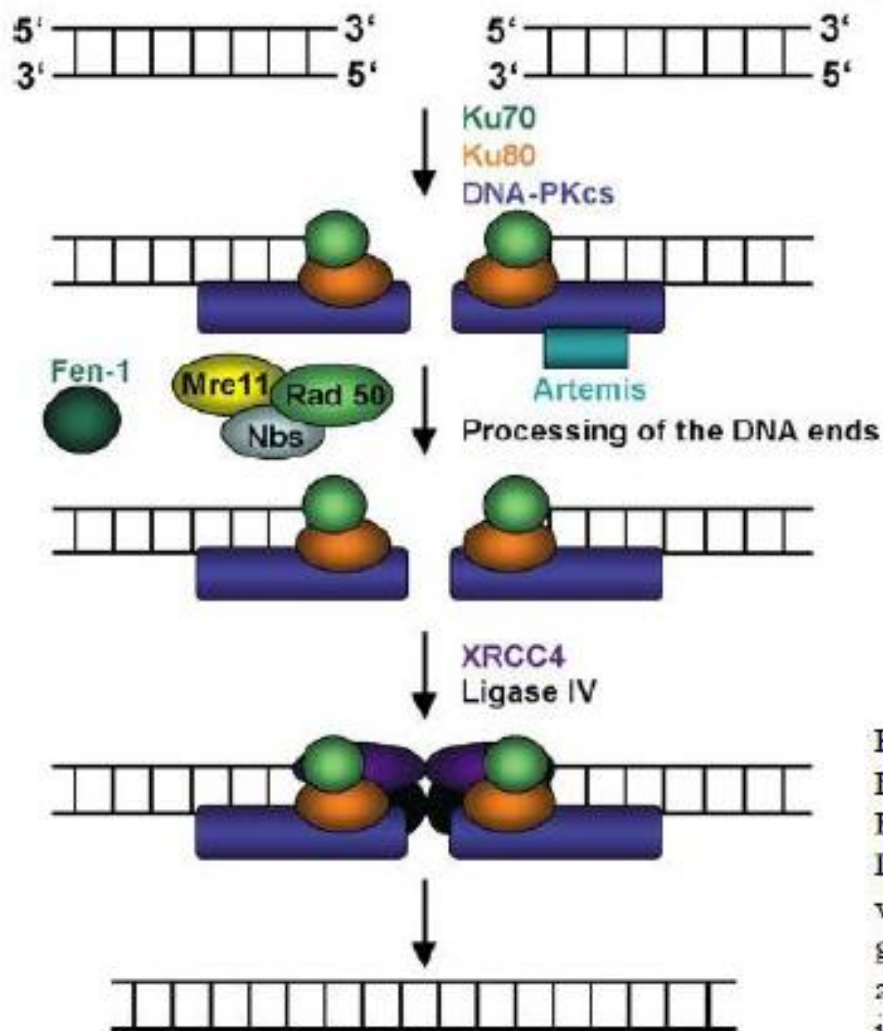


Fig. 4. Mechanism of non-homologous end joining (NHEJ). Recognition of and binding to damaged DNA occurs by the Ku70–Ku80 complex. Thereafter, the Ku heterodimer binds to DNA–PKcs, forming the DNA–PK holoenzyme. DNA–PK activates XRCC4–ligase IV, which links the broken DNA ends together. Before re-ligation by XRCC4–ligase IV, the DNA ends are processed by the MRE11–Rad50–NBS1 complex, presumably involving FEN1 and Artemis.

Reparace DNA – SOS



- dovoluje překonat replikační blok i za cenu vnesení četných chyb do DNA (což může být meší zlo než nedokončená replikace DNA, která je fatální)
- komplexní proces zahrnující nejméně 25 genů

