

Mutace, poškození DNA, „DNA repair“

MUDr. Iva Slaninová, Ph.D.

Biologický ústav LF MU

Typy mutací

Genové (bodové)
mutace

Chromozomové (strukturní
aberrace chromozomů)

Genomové (numerické aberrace
chromozomů)

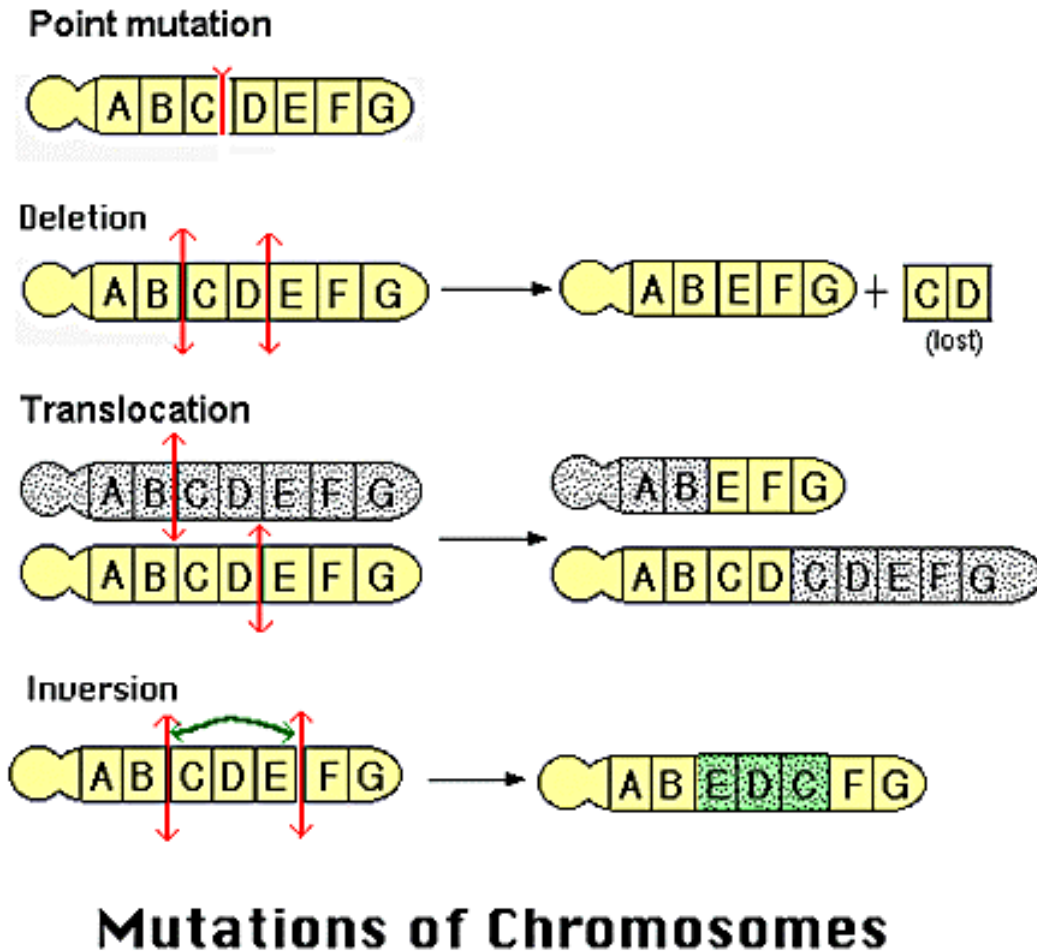
Euploidie

Aneuploidie



Chromozomové mutace

DELECE,
DUPLIKACE,
INVERZE,
INZERCE,
RING,
TRANSLOKACE



Genové mutace

Tab. 9. Důsledky mutací strukturních genů.

a) substituce bazí

Mutace měnící smysl kodonu:

DNA: CAT → CTT

RNA: GUA → GAA

Protein: Val → Glu

Mutace nesmyslná:

DNA: ATG → ATC

RNA: UAC → UAG

Protein: Tyr → stop

Tichá mutace:

DNA: TGA → TGG

RNA: ACU → ACC

Protein: Thr → Thr

b) delece nebo inserce páru bazí

Posunové mutace (inzerce):

DNA: TAC TTC AAA CTG → TAC GTT CAA ACT G

RNA: AUG AAG UUU GAC → AUG CAA GUU UGA C

Protein: Met-Lys-Phe-Asp → Met-Gln-Val-stop

Posunové mutace (delece):

DNA: TAC TTC AAA CTG → TAC TCA AAC TG

RNA: AUG AAG UUU GAC → AUG AGU UUG AC

Protein: Met-Lys-Phe-Asp → Met-Ser-Leu-

vlákno standardní DNA

a b c d e f

substituce

a r c d e f

transpozice

a c d b e f

inzerce

a b m n c d e f

duplikace

a b b c d e f

delece

a b d e f

inverze

a b c d e f

včlenění analogu baze

a β c d e f

Nečas a kol., 2000

Mutace v somatických a zárodečných buňkách

Somatické mutace projeví se v jediné buňce - pokud se dělí klon buněk - žádný fyziologický vliv nebo zánik buňky nebo **vede k nádorové transformaci** - vliv na daného jedince

Mutace zárodečných buněk - přenášené na potomky - intrauterinní zánik plodu, nebo **vrozené vývojové vady** - vliv na vývoj druhů

Pravděpodobnost vzniku „úspěšné“ germinativní mutace je nízká: **1:1000000**.

Mutace

Opravy



Evoluce

Genetická
stabilita

Tisíce změn denně

Jen 1 z asi 1000 změn DNA vede k permanentní mutaci

Mutagenní faktory

Fyzikální - záření - **ionizující** (X, γ , neutrony, protony, elektrony). Kovalentní vazby nukleotidů, zlomy DNA.

- **neionizující** (UV)- specifictější - konjugované dvojně vazby bází pohlcují specificky UV o vlnové délce 260-280 nm - dimery thyminu

Chemické - genotoxiny - alkylační činidla (yperit) - předávají DNA alkylové skupiny (methyl, ethyl)

- Silná oxidační činidla (peroxydy, kyselina osmičelá)
- Desaminující látky (dusitany)
- Interkalační látky (akridiny)
- Aromatické aminy (benzidin, naftylamin)

Mutagenní faktory

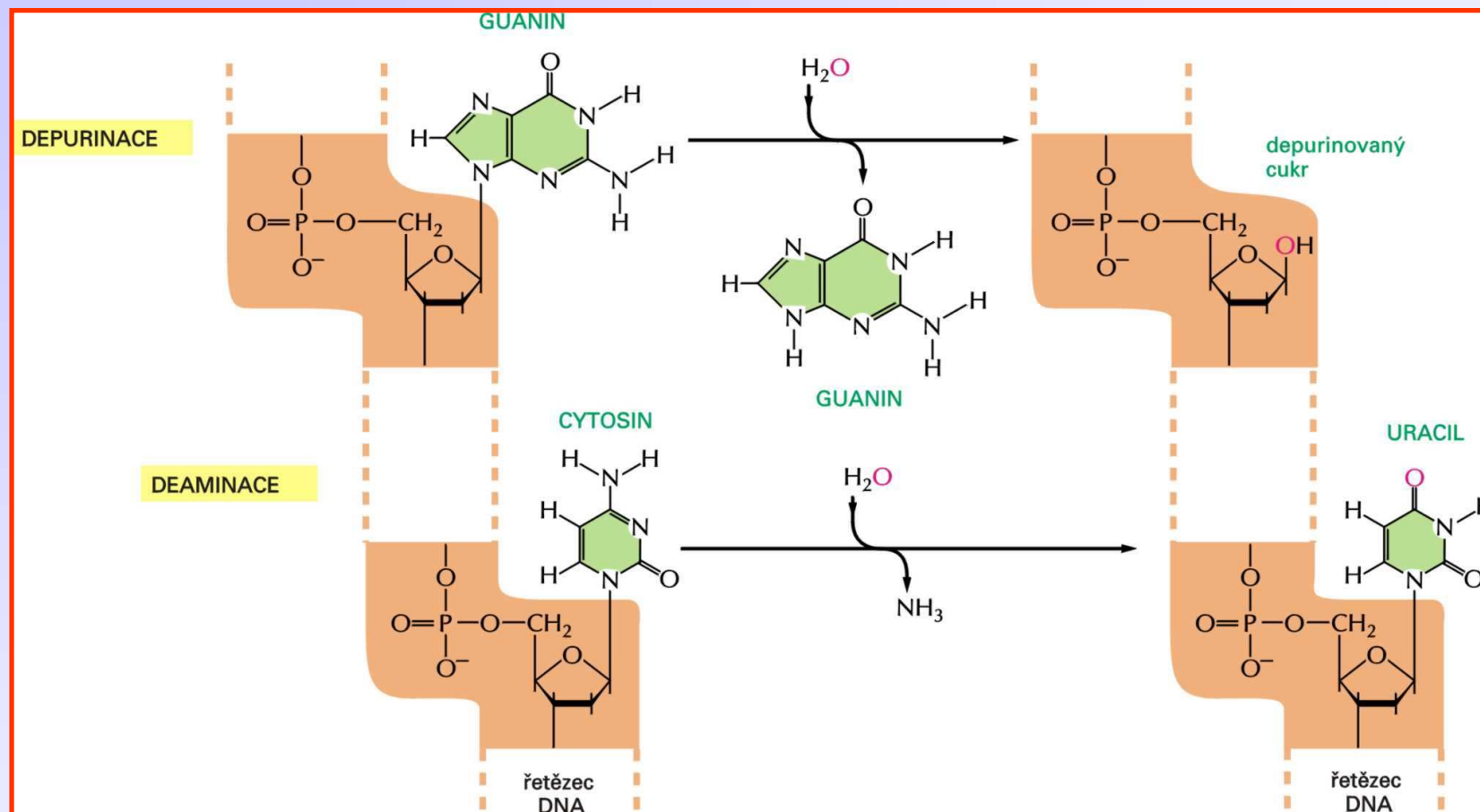
- Aromatické nitrosloučeniny (nitrofurany, nitropyren)
- Azobarviva a triazenová barviva
- Hydrazin a jeho deriváty
- Urethan a jeho deriváty
- Mn, Ni - narušení replikace

Nepřímo působící mutageny - látky mutagenní po změně buněčnými enzymy - polycyklické aromatické uhlovodíky, mykotoxiny, nenasycené MK

Typy poškození DNA

- ❖ Depurinace a deaminace
- ❖ Chemické modifikace nukleotidů
- ❖ Poškození DNA ultrafialovým zářením
- ❖ Další

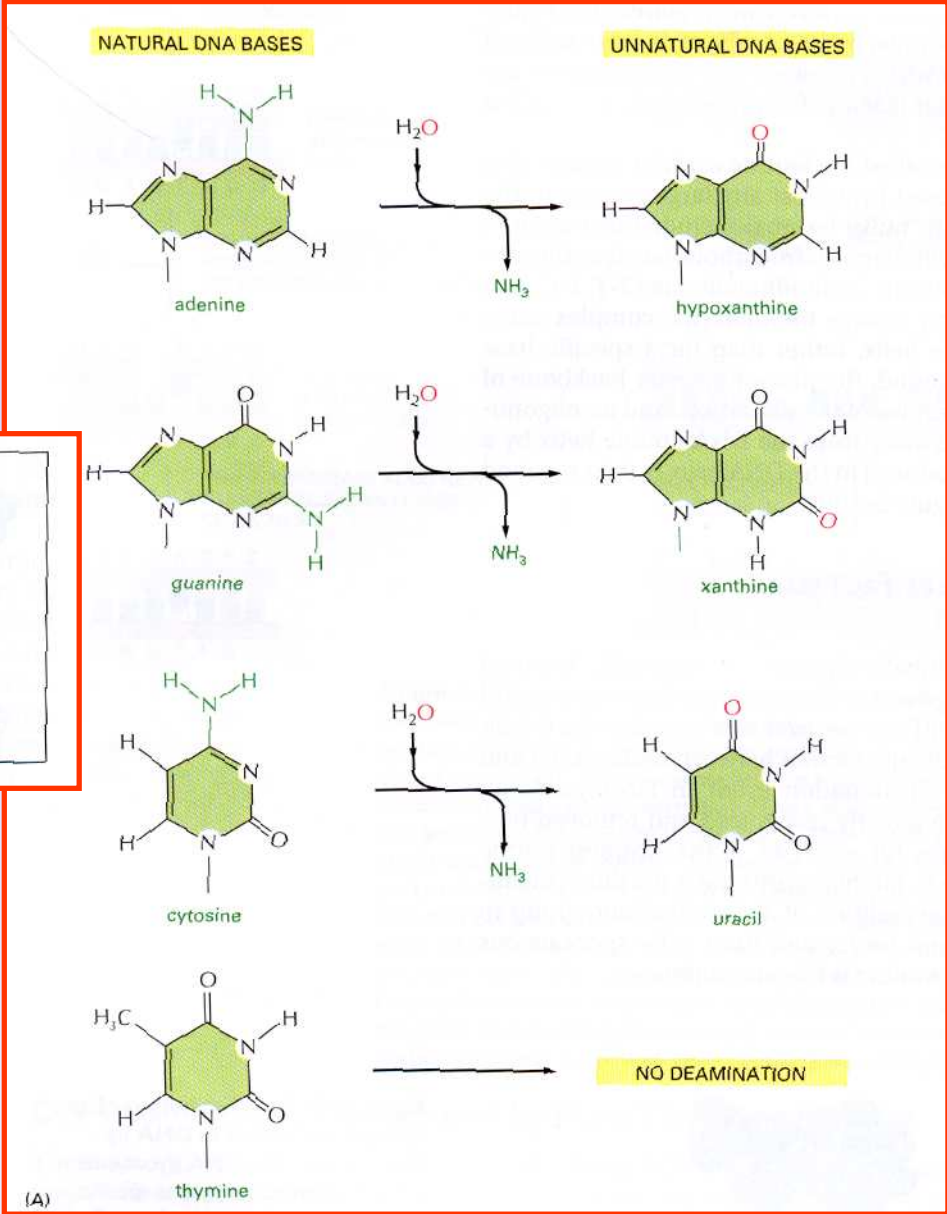
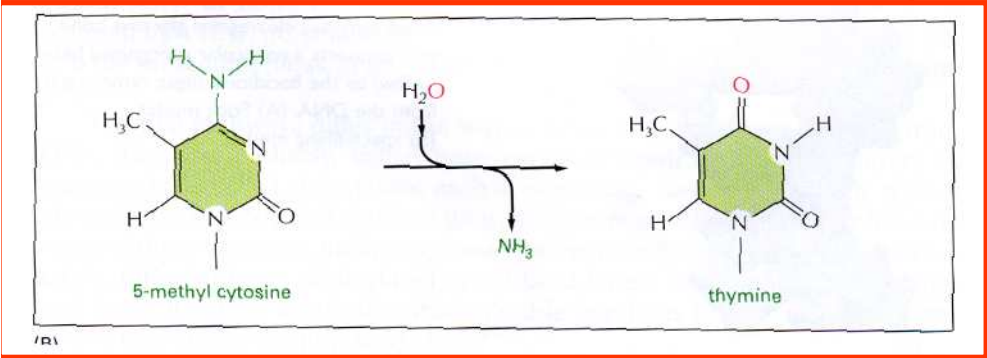
Depurinace a deaminace



Asi 5 -10000 purinových (A,G) bází denně mizí **ztráta baze delece**

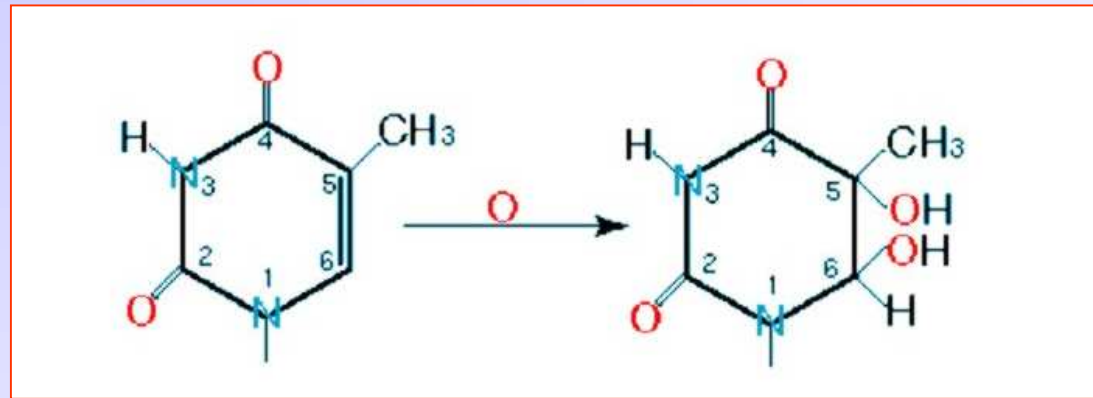
Asi 100-600 deaminací cytosinu za vzniku uracylu - **chemická modifikace baze, záměna**

Deaminase



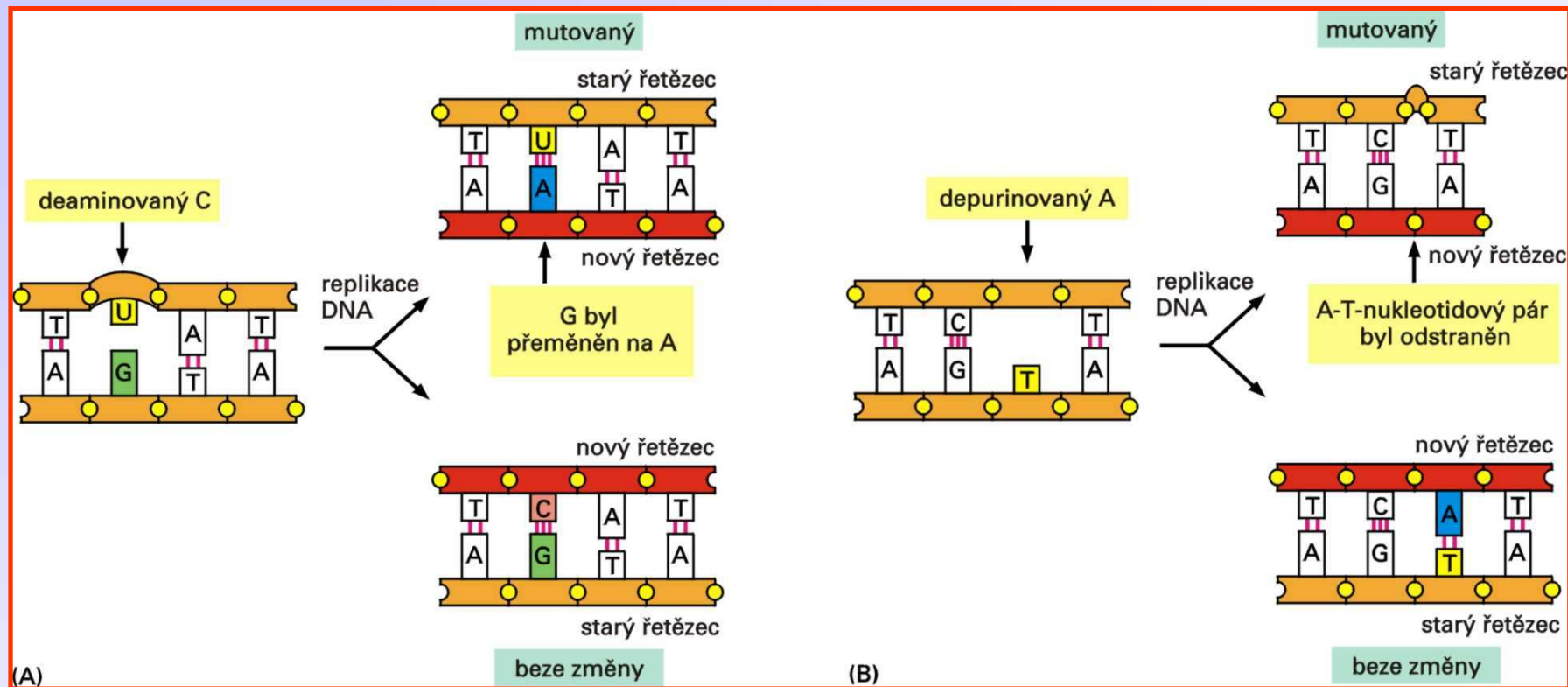
(A)

Chemická modifikace



Chemická modifikace (ROS, záření), například oxidací thyminu - thymin glycol

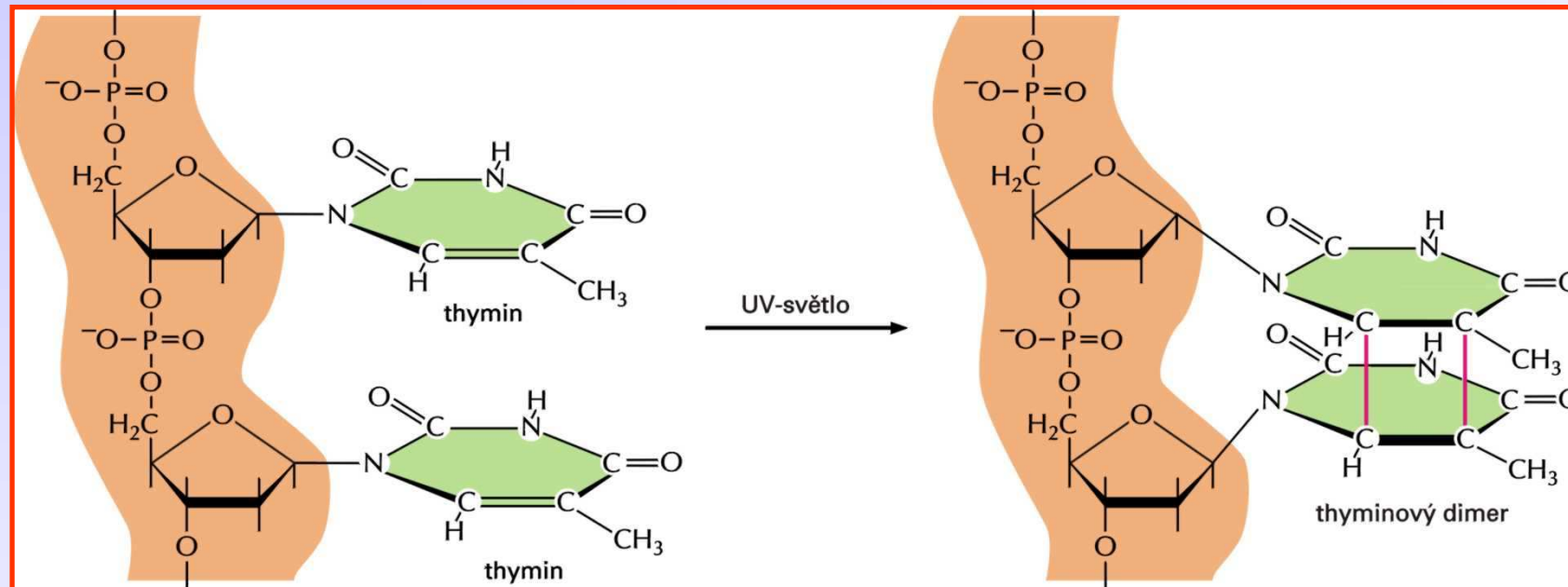
Důsledky chemické modifikace nukleotidů



Deaminace C - U -
při replikaci místo G-
A - **záměna bází**

Depurinace - ztráta
nukleotidového páru v jedné ze
vznikajících dceřinných DNA -
delece

Poškození DNA ultrafialovým zářením



Vznik kovalentních vazeb mezi sousedními thyminy - **thyminové dimery** (pirimidinové dimery). Ty jsou překážkou v replikaci a transkripci - mutace nebo smrt buňky.

Další

Mischamsches - nesprávné párování - chyby v replikaci

Zlomy -SSB single strand break - 1 řetězec

DSB - double strand break - 2 řetězce

Kovalentní vazby mezi bazemi - crosslinks

Frekvence mutací v 1 lidské buňce za 1 den

50000 single strand break

10000 depurinací

600 deaminací

2000 oxidačních lézí

5000 alkylací

10 double strand breaks

Opravy mutací – DNA repair

Enzymatické odstranění chyb v DNA, které vznikly v průběhu replikace, rekombinace nebo působením vnějších vlivů

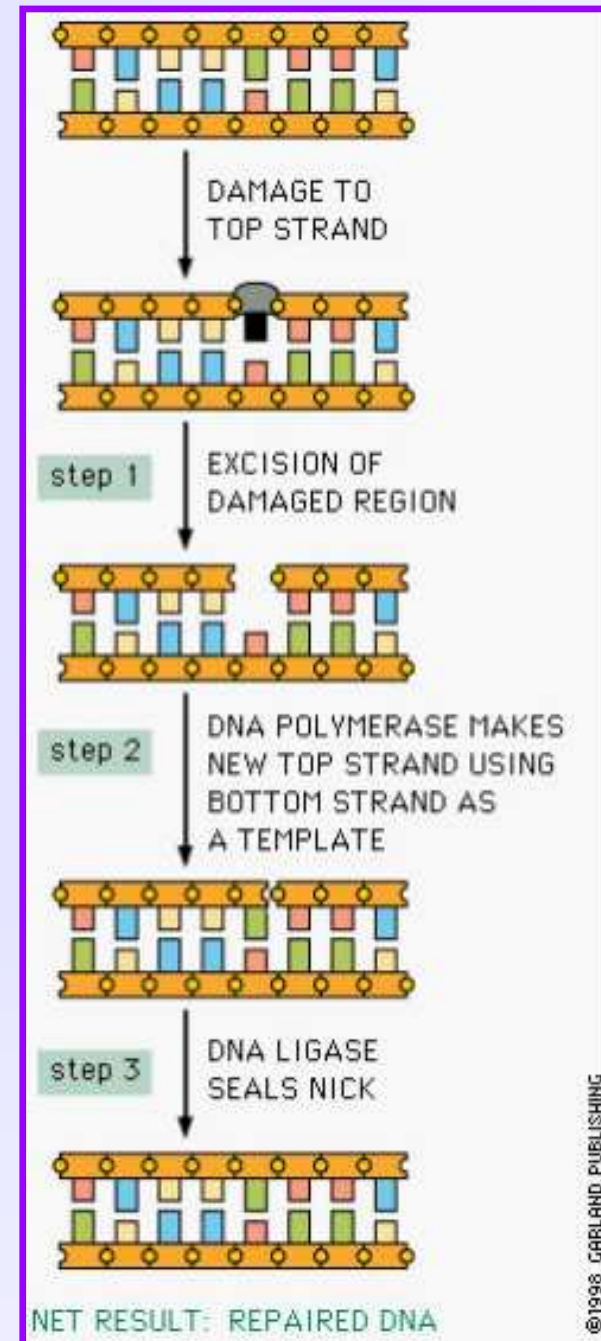
DNA je jediná molekula, která je opravována, ostatní jsou vyměněny !

K mutacím dochází nejčastěji během proliferace. Většina je jich opravena už v průběhu replikace DNA „kontrolním čtením“ DNA polymerázou - korektura.

Obecný princip oprav DNA

- 1) Rozeznání a odstranění chybného místa
- 2) Vyplnění mezery
- 3) Spojení řetězce DNA

Body 2-3 téměř stejné u různých typů oprav, v bodu 1 jsou u různých oprav zúčastněny různé proteiny



Základní typy oprav

Přímá chemická oprava -

oprava alkylací a metylací

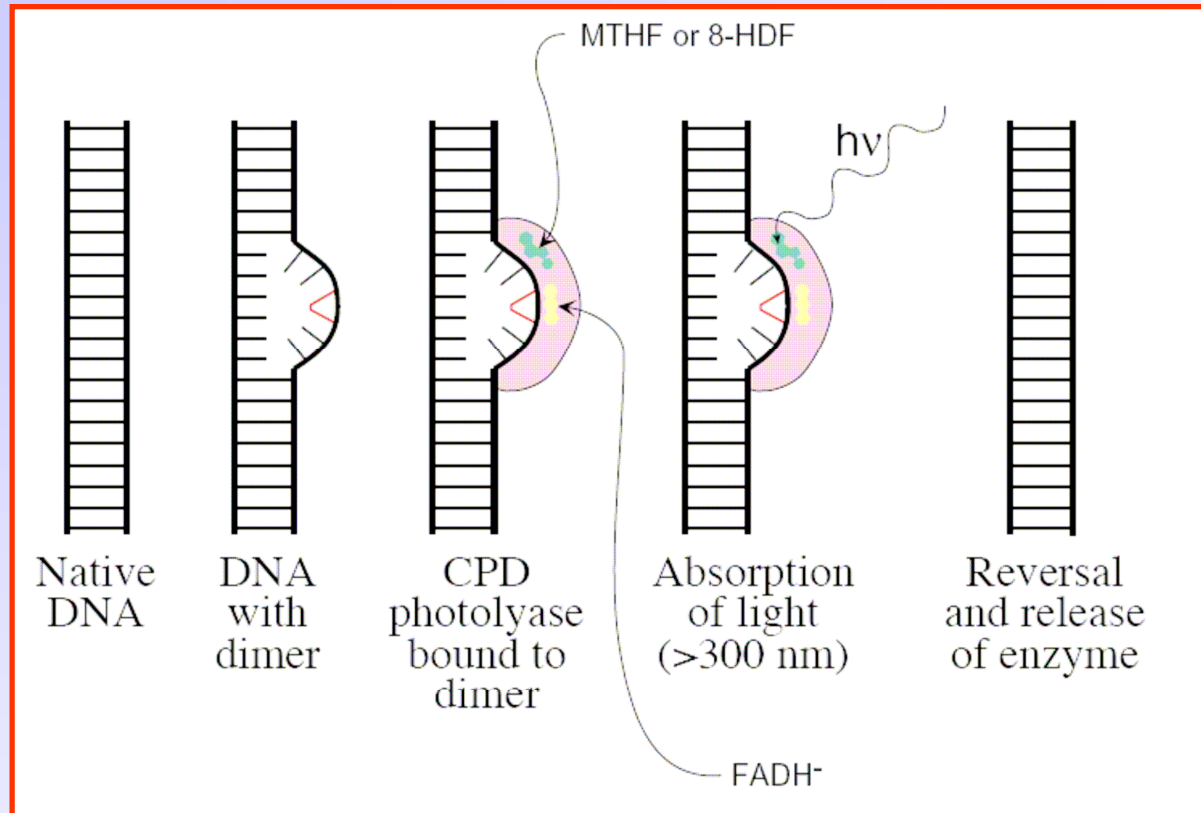
Glykosylázy opravují špatně zařazený T na C - není potřeba zlomu

Fotoreaktivace

Excizní reparace - poškozená báze je odstraněna a vyměněna za správnou - 3 typy

1. Base excision repair (BER)
2. Nucleotide excision repair (NER)
3. Mismatch repair (MMR)

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

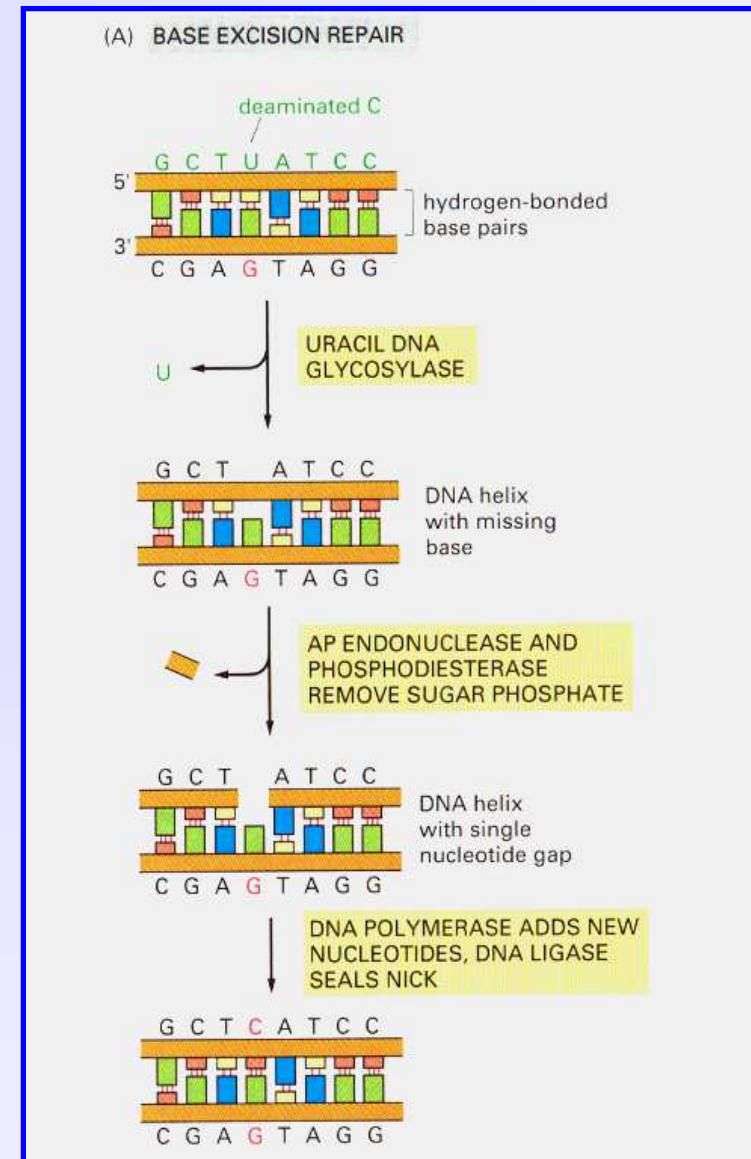
Excizní reparace

Odstranění poškozeného úseku 2 řetězcové DNA excizní **endonukleázou** a zaplnění vzniklé mezery opravnou syntézou (**DNA polymerázou**). Nový segment je napojen **DNA-ligázou**.

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)

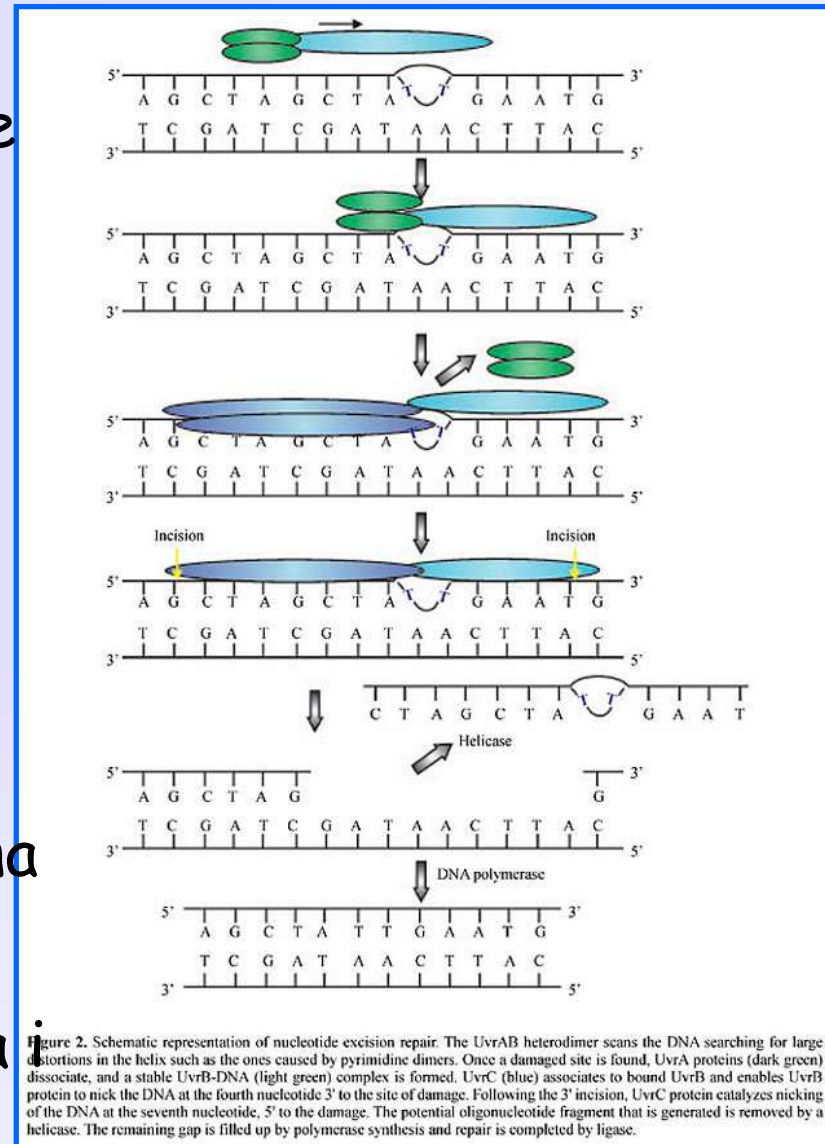


NER - Nucleotide Excision Repair

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 báze.

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



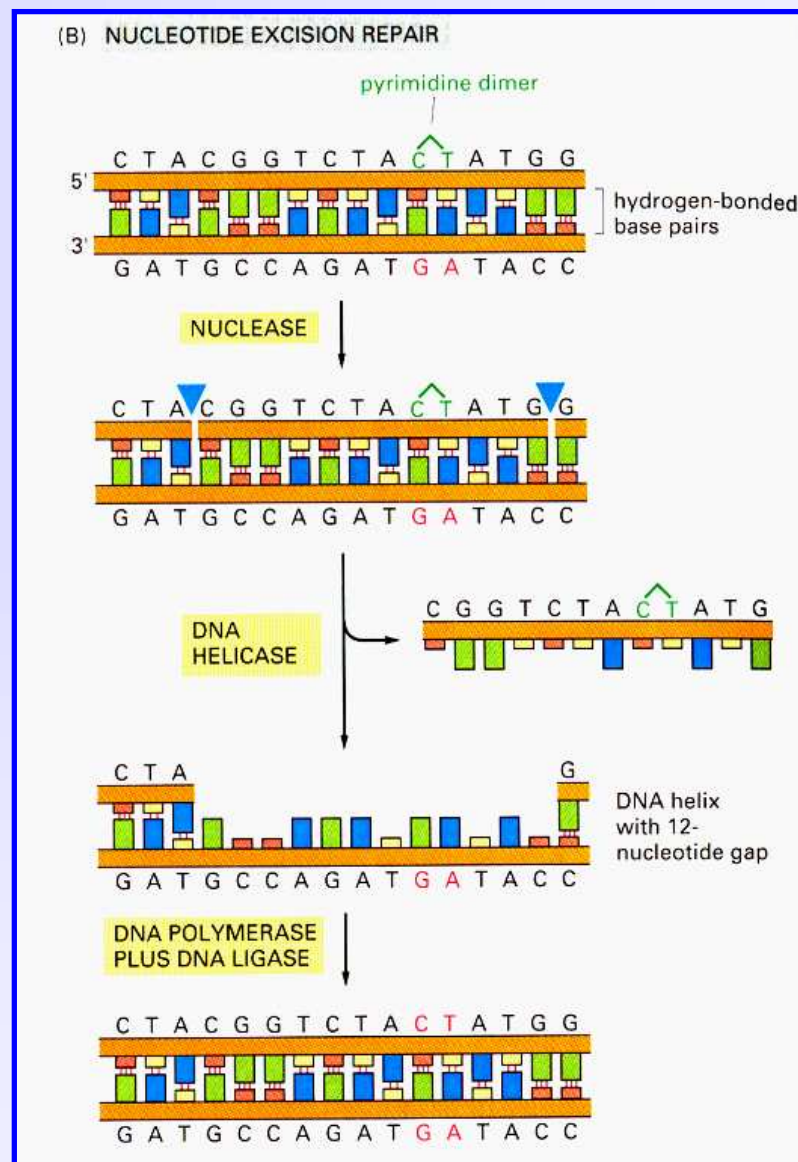
NER - Nucleotide Excision Repair

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

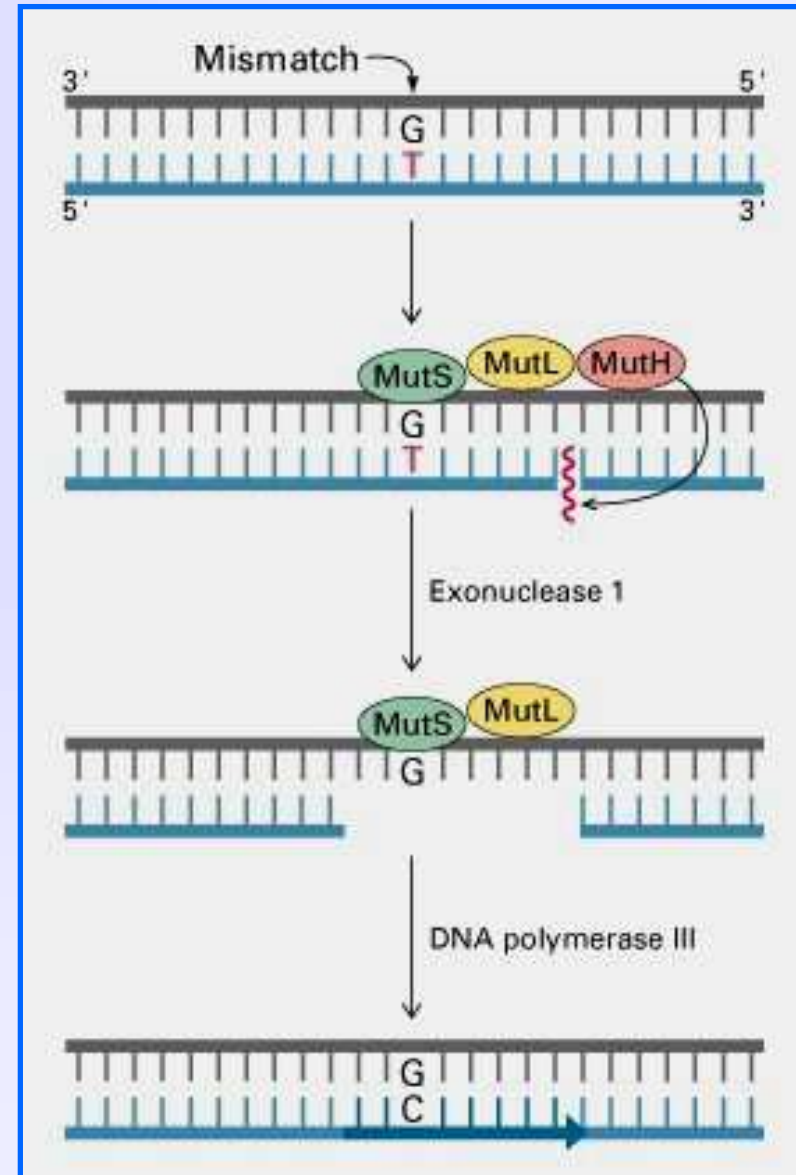


MMR - Mismatch Repair

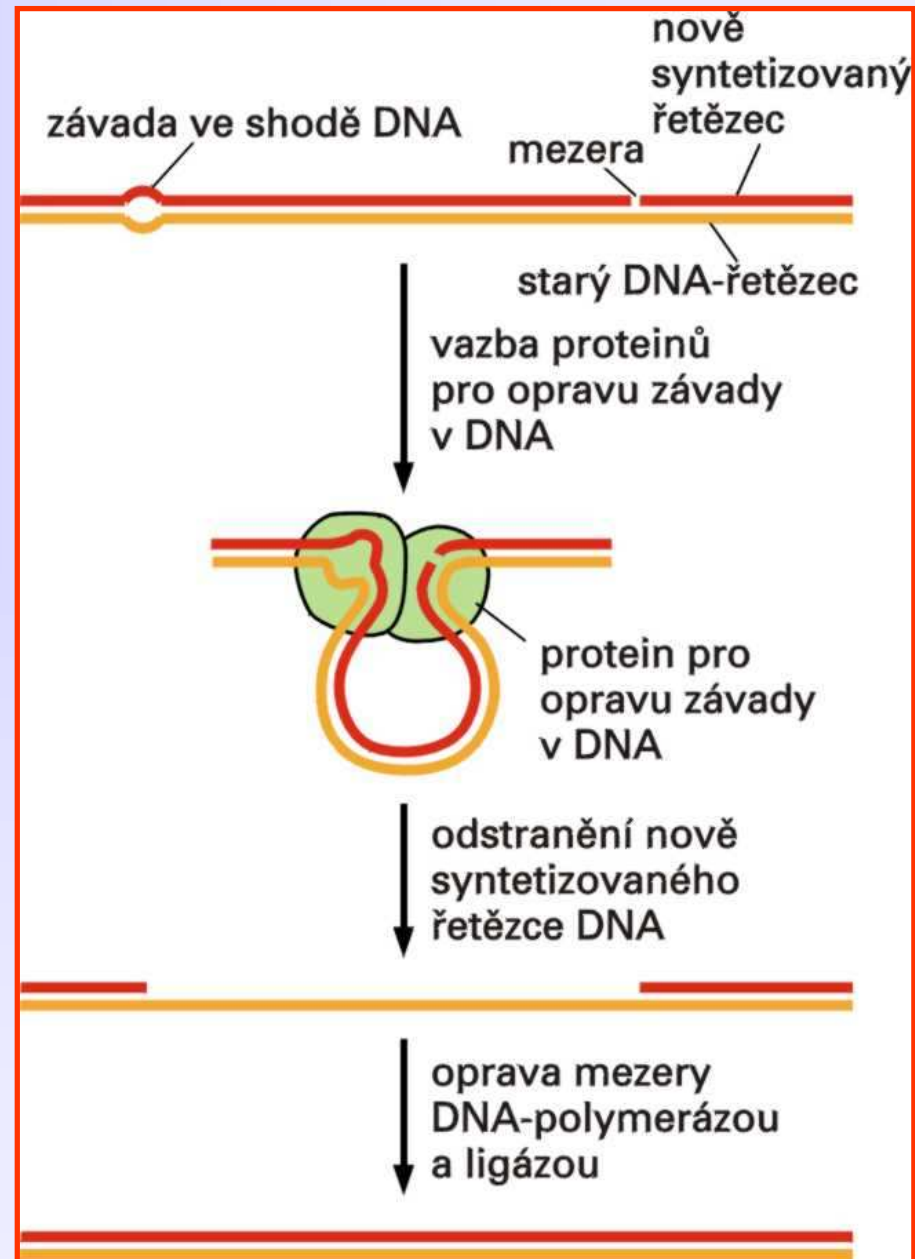
Opravuje chyby v párování, špatně zařazené nukleotidy

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

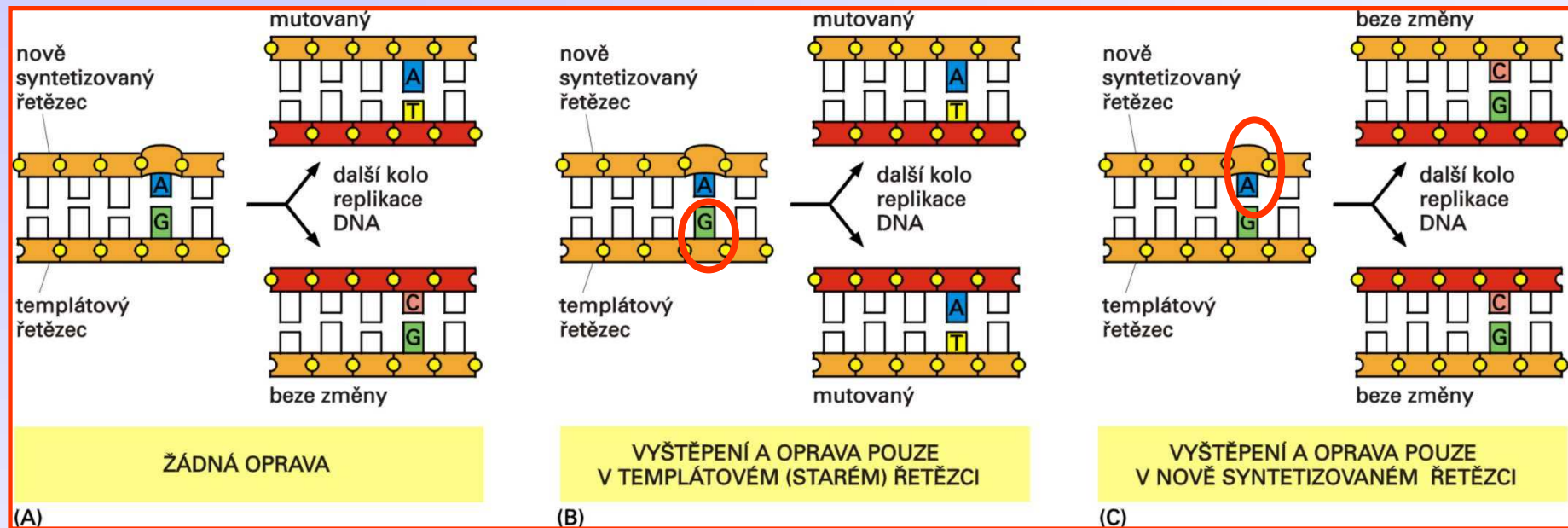


Mechanismus opravy chybného párování bází u eukaryot



Chybné párování bází v DNA a jeho oprava

© Espero Publishing, s.r.o.



a) Pokud nedojde k opravě vzniká permanentní mutace v jedné z DNA molekul vznikající při další replikaci

b) Pokud je k opravě použit nově syntetizovaný řetězec jako templát, oba řetězce vznikající další replikací jsou mutované

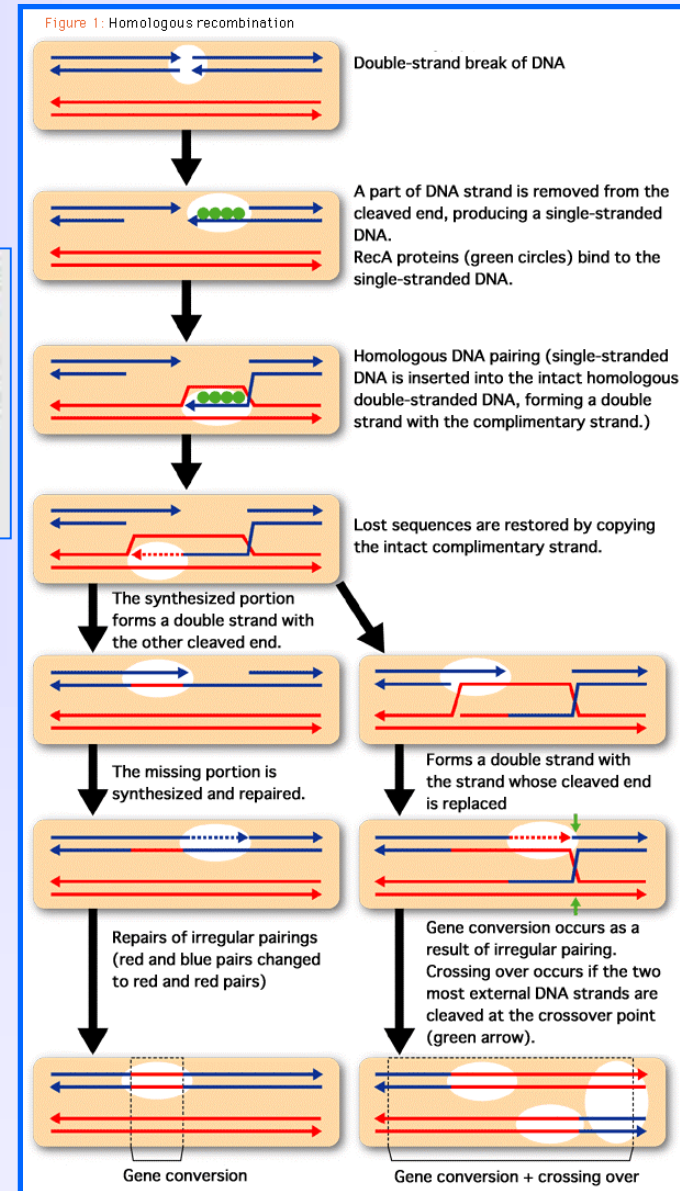
c) Pokud je jako templát použit starý řetězec, mutace je eliminována

Zlomy DNA - DSB Double strain breaks

Homologní rekombinace - zlomené konce jsou opraveny na základě informace neporušených sesterských chromatid (G2) nebo homologních chromozomů (G1). „DNA-damage binding protein“. **RecAp, Rad50** skupina proteinů, **BRCA1 a 2p**. Poškozený ch. se dostává do synapse s nepoškozenou homologní DNA, probíhá především v S a G2 fázi.



Holoday junction



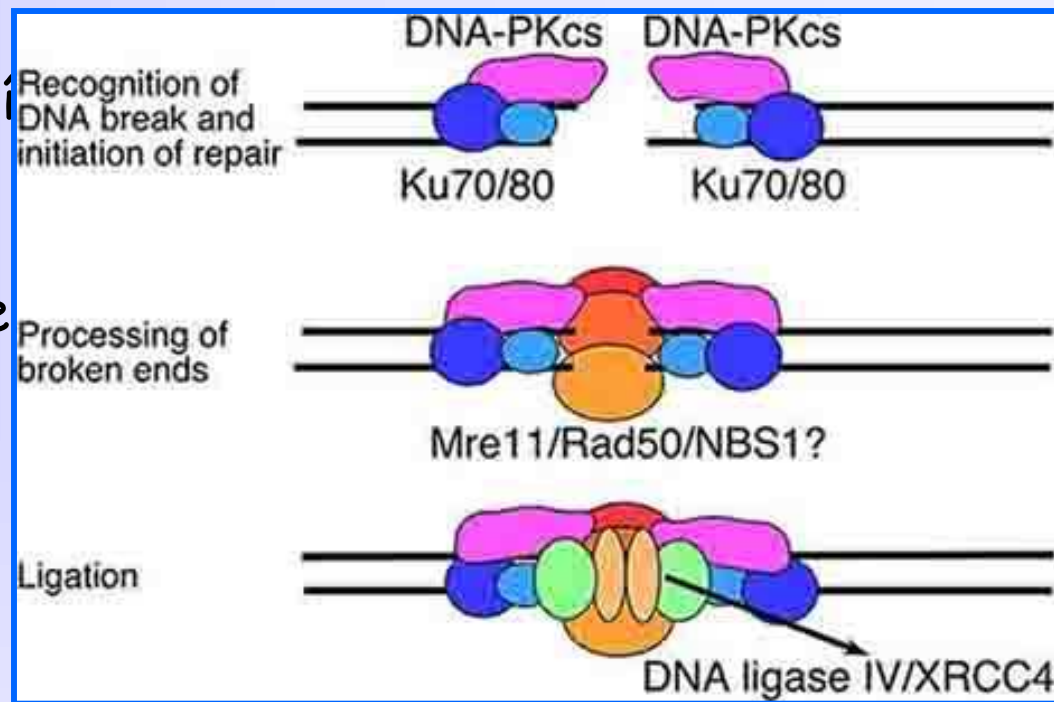
Spojení nehomologních konců

Přímé spojení zlomených konců - vyžaduje rozpoznání a vazbu konců a jejich přiblížení pro ligaci. Není nutná homologie ani synapse. Probíhá především G0 a G1 fázi.

Protein **Ku** u eukaryont katalytická podjednotka DNA-dependentní protein kinázy,

DNA ligáza IV, Rad50p-NBS1 komplex (exo a endonukleázy), často i DNA polymeráza

Výsledkem delece



Chyby - translokace - Burkittův Lymfom, Philadelphský chromozom (CML),

Leukémie B buněk

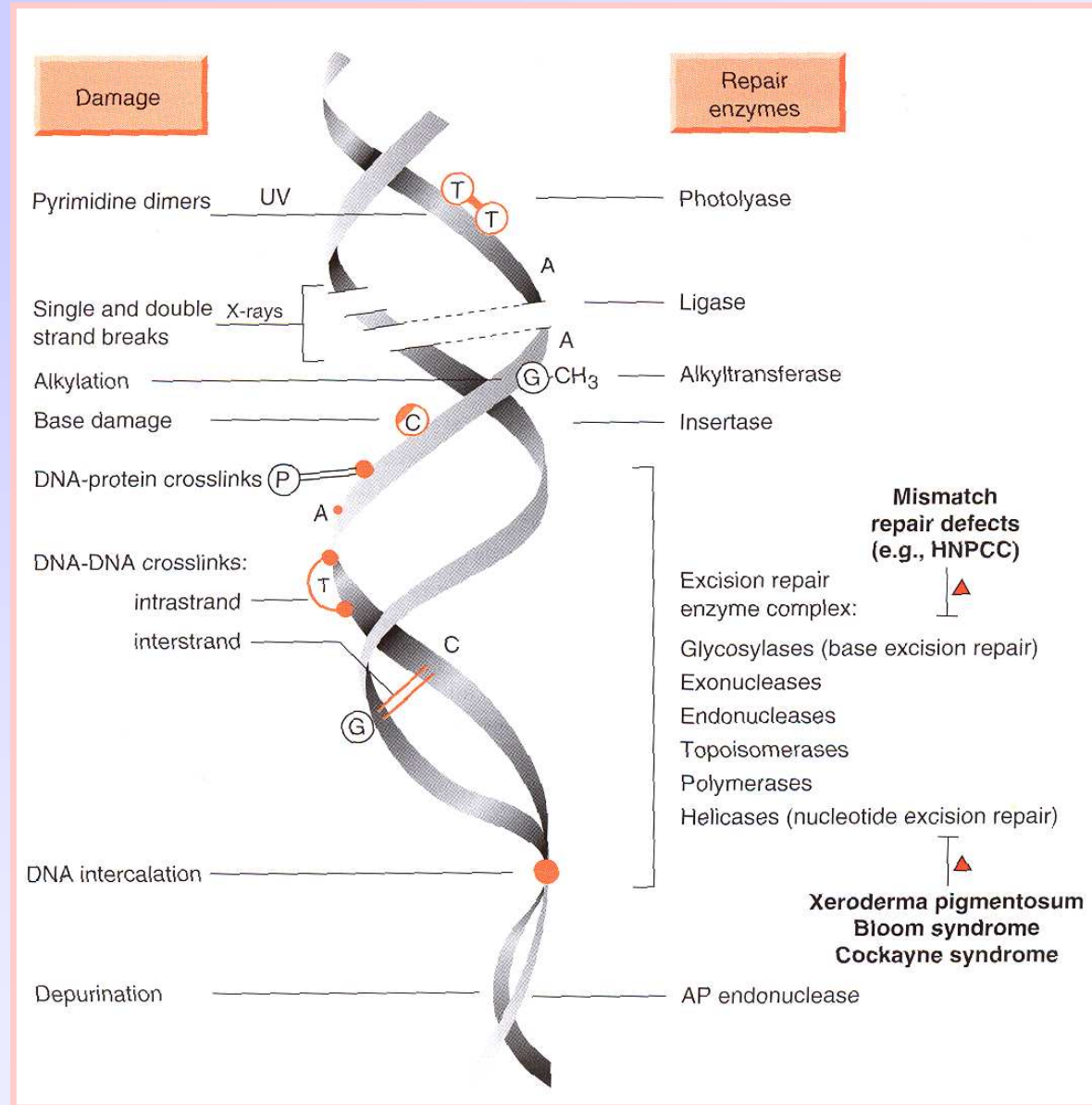
SOS- reparace

Koordinovaná syntéza enzymů a činnost odpovídajících opravných mechanismů indukovaná poškozením DNA u **bakterií**

Účastní se jí produkty genů *uvrA*, *uvrB*, *uvrC* (protomery endonukleázy)

Gen *recA* -kóduje RecA protein - proteáza štěpící represor LexA a umožňuje transkripci genů *uvrA*, *uvrB*, *uvrC* - odstraňování thyminových dimerů

Další geny - *umuC* - ruší mutační účinky a nepřesné opravy



Epstein. Human Molecular Biology. Cambridge University Press. 2003

Mutace a rakovina

Mutageneze



Kancerogeneze

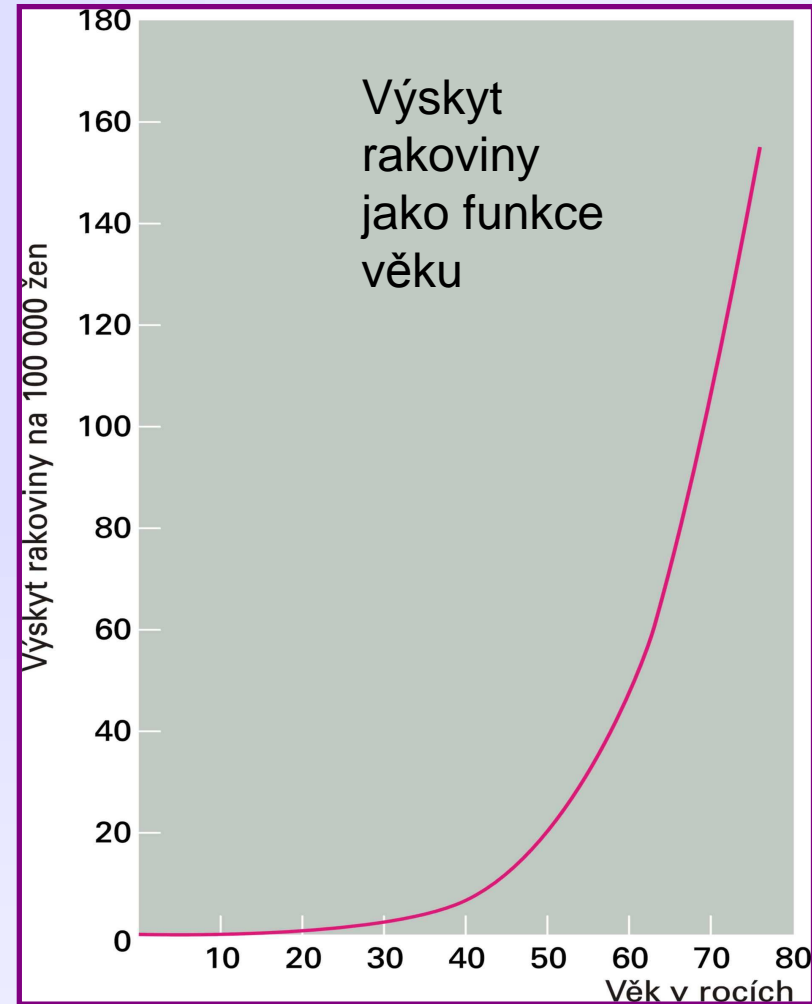
Korelace je zřejmá pro chemické kancerogeny - jednoduché lokální změny sekvencí, ionizační a rentgenové záření (chromozomové zlomy a translokace) a viry (cizorodá DNA v buňce)

Mutace a rakovina

V lidském těle za život -
 10^{16} buněčných dělení

V prostředí bez mutagenů
 10^{-6} pravděpodobnost
vzniku mutace na buněčné
dělení a gen , takže za
život **10^{10}** mutací na
každý gen

!?!Otázka není proč
rakovina vzniká, ale proč
vzniká tak málo často?!?



© Espero Publishing, s.r.o.

!!! 1 mutace nestačí; většina mutací je opravena !!!

Poruchy reparačních systémů

- zvýšený výskyt malignit
- přecitlivělost vůči látkám poškozujícím DNA
- přecitlivělost vůči UV-záření
- onemocnění nervového systému
- některé poruchy imunitního systému

Xeroderma pigmentosum

zvýšená citlivost vůči UV
defektní excize thyminových dimerů,
defektní reparační syntéza DNA
zvýšená frekvence výměny sesterských
chromatid po UV
vyšší mutační rychlost po působení
mutagenů,
zvýšená citlivost vůči ionizujícímu záření,
snížená aktivita apurinové endonukleázy



**Rakovina kůže, zvýšená frekvence
ostatních rakovin**

Epstein. Human Molecular
Biology. Cambridge
University Press. 2003

Dědičné nádory střev - Hereditary non-polyposis colon cancer (HNPCC)

	MutS	MSH1	?	DNA repair in mitochondria
35%	"	MSH2	MSH2	Single mismatch and small loop repair (with MSH6 to form MutS α); loop repair (with MSH3 to form MutS β)
	"	MSH3	MSH3	Loop repair (with MSH2 to form MutS β)
	"	MSH4	MSH4	Meiotic recombination (with MSH5)
	"	MSH5	MSH5	Meiotic recombination (with MSH4)
	"	MSH6	MSH6	Single mismatch and small loop repair (with MSH2 to form MutS α)
60%	MutL	MLH1	MLH1	Forms heterodimeric complexes with the other 3 MutL homologs
	"	PMS1	PMS2	Mismatch repair, especially in S phase
	"	MLH2	PMS1	Minor role in small loop and mismatch repair
	"	MLH3	MLH3	Promotes recombination during meiosis; Small loop repair during mitosis

Výskyt v nízkém věku

AD dědičnost, vysoká penetrance

Asociace s mutacemi genů zúčastněných v mismatch repair (MSH2 a MLH1)

Další choroby

Ataxia teleangiectatica - progresivní mozečková ataxie, teleangiektazie kůže, defekty imunity, častá lymfoproliferativní onemocnění - leukémie, lymfomy

Cockaynův syndrom - postižení kostry, kůže, nervového systému, degenerace sliznic a demyelinizace neuronů, snad vliv zpomalené reparace

Bloomův syndrom - mutace v genu pro helikázu - genetická instabilita, malý vzrůst, defekty imunity, diabetes, rakovina

Fanconiho anemie - aplastická anemie, retardace, akutní myeloidní leukémie

Další choroby

NAME	PHENOTYPE	ENZYME OR PROCESS AFFECTED
MSH2, 3, 6, MLH1, PMS2	colon cancer	mismatch repair
Xeroderma pigmentosum (XP) groups A–G	skin cancer, cellular UV sensitivity, neurological abnormalities	nucleotide excision-repair
XP variant	cellular UV sensitivity	translesion synthesis by DNA polymerase δ
Ataxia–telangiectasia (AT)	leukemia, lymphoma, cellular γ -ray sensitivity, genome instability	ATM protein, a protein kinase activated by double-strand breaks
BRCA-2	breast and ovarian cancer	repair by homologous recombination
Werner syndrome	premature aging, cancer at several sites, genome instability	accessory 3'-exonuclease and DNA helicase
Bloom syndrome	cancer at several sites, stunted growth, genome instability	accessory DNA helicase for replication
Fanconi anemia groups A–G	congenital abnormalities, leukemia, genome instability	DNA interstrand cross-link repair
46 BR patient	hypersensitivity to DNA-damaging agents, genome instability	DNA ligase I