



MASARYKOVA UNIVERZITA

Techniky molekulární biologie a genetiky

3. 3. 2017

Exonové, intronové a promotorové mutace

Mgr. Petra Bořilová Linhartová, Ph.D.

plinhart@med.muni.cz

Obsah

- Opakování terminologie
- Zákony populační genetiky
- Faktory ovlivňující lidský genom
- Mutace a polymorfizmy
- Příklady – u monogenních i polygenních onemocnění

Opakování terminologie

GEN

- jednotka dědičné informace, konkrétní úsek molekuly DNA nesoucí informaci pro tvorbu proteinu nebo NA (rRNA, tRNA...)
- 1909 – zavedení pojmu gen
- geny strukturní
- geny pro RNA
- geny regulační

LOKUS

- konkrétní místo na chromozómu, na kterém se nachází určitý gen

Opakování terminologie

GEN

- **Promotor** – role při zahájení transkripce (vazba RNA polymerázy či jiné součásti transkripčního aparátu tzv. transkripční faktory)
- **Intron** – nekódující oblast genu (splicing: pre-mRNA → mRNA)
- **Exon** – kódující oblast genu

Opakování terminologie

ALELY

- různé varianty téhož genu
- pro jeden gen jsou u diploidního organismu dvě alely (od otce a od matky)
- výjimkou jsou u muže geny na chromozómu X a na chromozómu Y
- Pozn. to ale neznamena, že v populaci jsou vždy jen dvě alely. Známe např. tři alely pro dědičnost krevních skupin, I^A , I^B , i . V konkrétním člověku jsou vždy pouze dvě z nich. V populaci kolují všechny tři.

Opakování terminologie

ALELY

- **dominantní alela** = převládající (A)
- **recesivní alela** = potlačená (a)
- **homozygot** = stejné alely téhož genu v chromozomu (AA, aa)
- **heterozygot** = různé alely téhož genu v chromozomu (Aa)
- **monohybrid** = sledujeme jeden znak
- **dihybrid** = sledujeme dva znaky

Dědičnost vyplývající z mezialelických vztahů

- **Dominance**
- **Recesivita**
- **Neúplná dominance**
- **Kodominance**

Opakování terminologie

GENOTYP

- soubor alel, které má organismus k dispozici
- informaci o genetické konstituci buňky, nebo organismu a/nebo jedince

FENOTYP

- soubor všech vlastností a znaků živého organismu

genotyp + prostředí = fenotyp

GENOM

- kompletní genetický materiál daného organismu

GENOFOND

je soubor všech alel (genů) všech jedinců dané populace

Hardy-Weinbergův zákon

- narušení rovnováhy při nenáhodném párování

Vliv prostředí na lidský genom

- genetická výbava jedince je zadána v okamžiku zplození, ale není pro další život konečná
- v průběhu života se může měnit jak pod vlivem čtených faktorů **epigenetických** (vlivy prostředí), tak pod vlivem **dalších faktorů genetických** (např. mutacemi somatických buněk v průběhu maligní transformace)



Populační variabilita

Genetická proměnlivost

- je zdrojem individuální variability (vytváří se nové kombinace alel):
 - segregace alel při vzniku gamet
 - rekombinace při crossing-overu
 - vznik náhodných kombinací alel při oplození

Genetická uniformita

Science.1983 Jul 29;221(4609):459-62.

The cheetah is depauperate in genetic variation.

O'Brien SJ, Wildt DE, Goldman D, Merrill CR, Bush M.

- A sample of 55 South African cheetahs (*Acinonyx jubatus jubatus*) from two geographically isolated populations in South Africa were found to be **genetically monomorphic** at each of 47 allozyme (allelic isozyme) loci. Two-dimensional gel electrophoresis of 155 abundant soluble proteins from cheetah fibroblasts also revealed a low frequency of polymorphism (average heterozygosity, 0.013). Both estimates are dramatically lower than levels of variation reported in other cats and mammals in general. The extreme monomorphism may be a consequence of a demographic contraction of the cheetah (**a population bottleneck**) in association with a reduced rate of increase in the recent natural history of this endangered species.

Mutace

- náhodné změny v genetickém kódu (v pořadí bází) jedince, poměrně vzácné
- změna procesy, při kterých se mění se kvalita a kvantita genů
- mezi ně nepočítáme takové změny, které mohou být přenášeny vertikálně (např. metylace bází)

- **mutageneze** = proces vzniku mutací

- **hot spots** – na některých místech v genomu se mutace vyskytují častěji než by odpovídalo náhodnosti s rovnoměrnou pravděpodobností v celém genomu

- některé nukleotidy mutují častěji než jiné (např. G a C v savčích jaderných genech)

Mutace

GERMINATIVNÍ MUTACE

- přenášeny na potomstvo (často příčinou zániku plodu), u potomka přítomny ve všech buňkách
- mají vliv na vývoj druhu
- „úspěšnost“ germinativní mutace 1:100000

SOMATICKÉ MUTACE

- vznikají v somatických buňkách v průběhu života (maligní transformace x žádný fyziologický vliv)
- **vliv mutace na „fitness“** organismu je relativní s ohledem na vnější podmínky

Vzácné mutace a polymorfismus

VZÁCNÉ MUTACE

- jsou výrazně patologické, a tudíž jsou z populace odstraňovány selekcí, nebo vznikly nedávno a nestačily se v populaci rozšířit)
- vyskytuje se v populaci méně než v 1 %

Z pohledu Mendelovské genetiky

- Recesivita - jedna fční alela stačí
- Dominance - jedna nefční alela způsobí rozvoj choroby
- Kodominance

Vzácné mutace a polymorfismus

POLYMORFIZMUS

- častá mutace, tyto mutace jsou základem interindividuální variability jedinců
- v jediném genu je často mnoho polymorfizmů, jejich kombinace tvoří haplotypy
- MAF vyskytuje se v populaci více než v 1 %
- **SNP** = jednonukleotidový polymorfismus - bialelické
- **minisatelitní a mikrosatelitní polymorfizmy** - multialelické

Vzácné mutace a polymorfismus

MUTAČNÍ FREKVENCE

- reparační mechanismy
- selekční tlak
- genetický drift je proces, kdy dochází k náhodným změnám ve frekvencích alel v dané populaci. Tyto změny tedy nejsou zapříčiněny selekčními tlaky.
- pro AD choroby platí:

$$\mu = n/2N$$

n= počet nemocných, N=celkový počet porodů

Mutace

FČNÍ VÝZNAM MUTACÍ

- V promotoru - exprese
- V oblasti exon-intron – alternativní splicing, posun čtecího rámce
- V exonu – struktura a fce proteinu

Mutace

- typy mutací (indukované nebo spontánní, ty mají četnost $\sim 10^{-7}$, oprava polymerázou a proteinem p53):

GENOVÉ MUTACE

CHROMOZOMOVÉ MUTACE = ABERACE

GENOMOVÉ MUTACE

Genové mutace

- mění jednotlivé geny (alely), většinou jsou indukované
- podstata je molekulární, mění se struktura DNA, ale nenarušuje se celistvost stavby chromozomu
- v somatických nebo v pohlavních buňkách
- mutace v regulačních genech pro množení a diferenciaci → nádorového onemocnění

- **bodové mutace - substituce** = záměna páru nukleotidu za jiný (→ změna AA sekvence, změna v regulaci, ovlivnění transkripce a translace... nebo tvorba STOP kodonu), transverze/tranzice, spíše v exonech

- **delece/inzerce** = ztráta/zařazení nukleotidů (→ možný posun čtecího rámce), spíše v intronech



Genové mutace

Kódování

	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	STOP	STOP	A
	Leu	Ser	STOP	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

Nomenklatura

DNA

- 52G>C
- 35_38del
- 35_38insA
- 86 bp VNTR intron 2
- -197A/G
- **rs2275913**

Protein

- L25R
- Lys25Arg

Genové mutace

Srpkovitá anemie

- **missense** mutace genu pro hemoglobin na 6. pozici v β -řetězci (hydrofóbní valin místo hydrofilní glutamové kyseliny, tvorba shluků Hb a tím změna tvaru ery) → HbS
- autozomálně recesivní

	ancestral	mutant
DNA	-CTC-	-CAC-
mRNA	-GAG-	-GUG-
AA	-glu-	-val-

- Srpkovité červené krvinky mnohem hůř přenášejí kyslík. Lidé se srpkovitou anémií mají proto ve srovnání s obyčejnými lidmi červených krvinek víc. To jim dává proti malárii velkou výhodu, díky níž mají lepší šanci přežít.

Genové mutace

β^0 thalasemie

- **nonsense** mutace pro Hb – chybná syntéza jednoho z řetězců globinu
- autozomálně recesivní

	ancestral	mutant
DNA	-AGT-	-ACT-
mRNA	-UCA-	-UGA-
AA	-ser-	-STOP

Genové mutace

Nestabilita repetitivních sekvencí

- **netranslatované oblasti genu (promotoru, intronu)**
 - vede ke změně exprese genu, jako je tomu u **syndromu fragilního X** (amplifikován triplet CGG v 5' netranslatované oblasti genu FMR1 = Fragile X Mental Retardation 1)
 - u **myotonické dystrofie** (amplifikován triplet CTG v 3' netranslatované oblasti genu pro proteinkinázu DMPK)
 - u **Friedreichovy ataxie** (amplifikován triplet AAG v intronu genu pro mitochondriální protein frataxin)

Genové mutace

Huntingtonova choroba

- trinukleotidová expanze v **exonu**

	ancestral	mutant
DNA	...TAC-GTC-...	...TAC-(GTC-GTC-GTC) ₂₀ -GTC-...
mRNA	...-AUG-CAG-...	...-AUG-(CAG-CAG-CAG) ₂₀ -CAG-...
AA	...-met-gln-...	...-met-(gln-gln-gln) ₂₀ -gln-...

Hemofilie A

= nedostatek srážecího faktoru VIII

- **inzerce** 3000 bp – snížení tvorby proteinu
- gonozomálně recesivní – vazba na X chromozom
- žena je přenašečka

Genová mutace

Cystická fibróza

- deleční mutací genu produkujícího protein CFTR (chloridový ABC transportér na buň. membráně) → nefunkční protein
- **delece** 3 bp v pozici 1652 až 1655 v exonu 10 (delece phe v kodonu 508)
- autozomálně recesivní

	ancestral	mutant
DNA	-TAG-AAA-CCA-	-TA A-CCA-
mRNA	-AUC-UUU-GGU-	-AUU-GGU-
AA	-ile-phe-gly-	-ile-gly-

Genová mutace

Duchennova svalová dystrofie

- „frameshift“ mutace = posun čtecího rámce v genu pro protein dystrofin
- gonozomálně recesivní – vazba na X chromozom

	ancestral	mutant
DNA	-CAC-TGT	-CAC-TTG-T..-
mRNA	-GUG-ACA-	-GUG-AAC-U..-
AA	-val-thr-	-val-gly-

Genová mutace

Hyperkoagulační stavy

Defekt antitrombinu

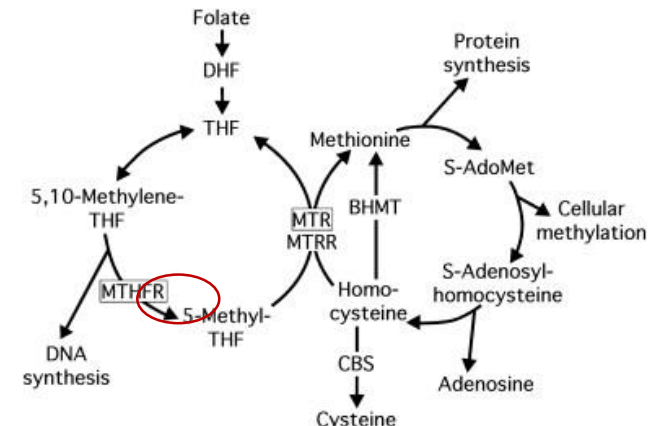
- mutace koagulačního fII zvyšujícího hladinu protrombinu – riziko trombembolie ~70 – 90 %, genová mutace rs1799963 G20210A

Leidenská mutace

- mutace genu pro inhibitor koagulace fV - riziko trombembolie ~30 %, genová mutace rs6025 G1691A, R506Q (arg → gln), AD

Hyperhomocysteinemie

- mutace enzymu konvertujícího kys. listovou = metyltetrahydrofolátreduktáza (MTHFR)
- projeví při nedostatku vitaminů B6, B12 a kys. listové, genová mutace rs1801133 C677T, AR
- nezávislým rizikovým faktorem aterosklerózy a trombembolizmu, poruch fertility a některých vývojových a neurologických abnormalit (rozštěp páteře)
- homocystein způsobuje endotelovou dysfunkci a iniciuje apoptózu



Chromozomové mutace - aberace

- nemění strukturu samotných genů, ale mění strukturu chromozomů
- dají pozorovat ve světelném mikroskopu
- mohou být překážkou normálního průběhu meiózy a jimi postižené gamety mohou být sterilní nebo mohou po splynutí vznikat neživota schopné zygoty

Chromozomové mutace - aberace

Strukturní chromozomové aberace

- následkem chromozomových zlomů, na které navazuje určitá přestavba - primární je tedy porucha struktury
- dělíme je na:
 - **balancované** - je zachováno původní množství genetického materiálu
 - **nebalancované** - část genetického materiálu chybí či přebývá
 - intra- nebo interchromozomální

Chromozomové mutace - aberace

- **deficiencie** = ztráta koncové části chromozomu, oddělený kousek se rozpadne v cytoplazmě, dochází ke ztrátě genů, ztráta důležitých genů vede ke smrti
- **delece** = ztráta vnitřní části chromozomu
- **duplikace** = zdvojení některých částí chromozomů
- **inverze** = převrácení části chromozomu o 180°
- **fragmentace** = rozpad na malé části
- **translokace** = přesun části chromozomu na jiný chromozom, může vést k vytvoření nového znaku
- **transpozice** = změna pořadí

Chromozomové mutace - aberace

Philadelphský chromozom

- chromozomální translokace mezi dlouhými raménky 9. a 22. chrom. $t(9;22)(q34;q11)$,
- u CML je fúzní gen ABL/BCR exprimován jako cytoplazmatický protein p210, ten asociuje s cytoskeletárním aktinem

Chromozomové mutace - aberace

Philadelphský chromozom

- p210 má silnou tyrozin-kinázovou aktivitu → fosforylace více než 50 proteinů → fenotyp. změny b.:
 - ↑proliferační aktivity (mitogenní úč.)
 - ↓adhezivity ke stromatu krvetv. tkáně
 - ↑rezistence k apoptóze
 - ↑nestabilita genomu
-
- CML - chronická myeloproliferativní choroba způsobená poruchou pluripotentní kmenové buňky

Genomové mutace

Numerické chromozomové aberace

- způsobeny abnormálním počtem chromozomů v karyotypu
- struktura chromozomů je neporušená, patologicky se uplatňuje nestandardní množství genů
- vznikají díky chybě při rozchodu chromozomů do dceřiných buněk během buněčného dělení (nondisjunkce) nebo abnormalitami fertilizace či časně embryogeneze

Genomové mutace

Euploidie

- znamená, že se v dané buňce nachází celočíselný násobek **monoploidního čísla** = udává počet chromozomů v jedné sadě
- lidské buňky jsou euploidní, protože obsahují zpravidla 46 chromozomů (tedy 2×23). Stejně tak člověk s 69 chromozomy by byl považován za euploidního.

Aneuploidie

- numerická odchylka se týká pouze určitého chromozomu nebo chromozomů, ne však celé sady
- konkrétní chromozom může být buď znásoben - **trisomie**
($2n + 1$), **tetrasomie** ($2n + 2$)
- nebo naopak ztracen - **monosomie** ($2n - 1$) **nulisomie** ($2n - 2$)

Genomové mutace

Aneuploidie

- **monosomie**

- gonozomální

- Turnerův sy. (45, X0)

- **trisomie**

- autozomální

- Downův sy. (47, XX/XY + 21)
- Edwardsův sy. (47, XX/XY + 18)
- Patauův sy. (47, XX/XY + 13)

- gonozomální

- Klinefelterův sy. (47, XXY)
- Super female = triple X sy. (47, XXX)
- super male = Jakobův sy. (47, XYY)

Downův syndrom

- vrozená mentální retardace, vrozené vady srdce a typický vzhled
- 1866 - anglický lékař **Johnu Langdonu Downovi**

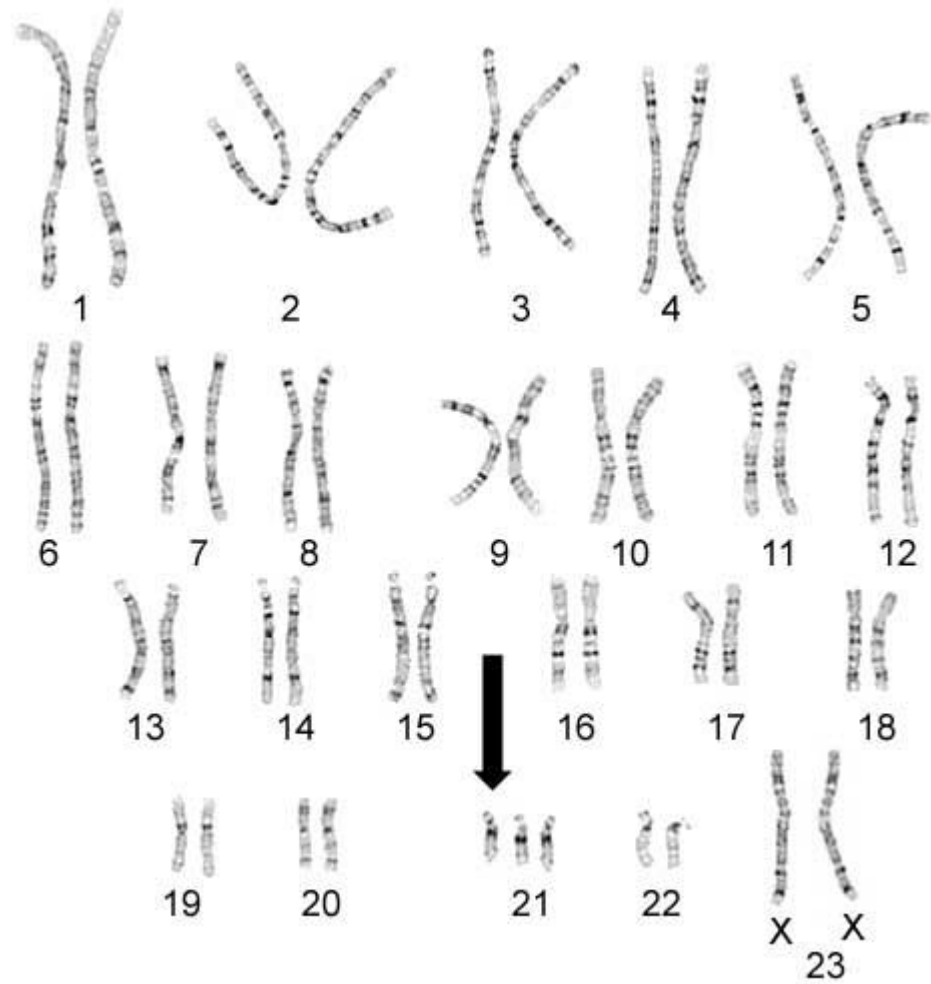
Příčiny

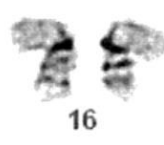
- proces **nondisjunkce** – tedy chybného rozestupu chromozomů v průběhu I. či II. **meiotického dělení**, které nastává nejčastěji **na straně matky** – tedy v průběhu vývoje oocytu

Downův syndrom

- **translokační forma trizomie 21**, u které je nadbytečný chromozom 21 připojen na jiný chromozom. Robertsonské translokace, u kterých došlo k fúzi dvou akrocentrických chromozomů (chromozomu 21 a jiného, například 14 či 15) = balancovaná chromozomální aberaci, která u svého nositele nevede ke klinickým projevům (karyotyp pouhých 45) – riziko přenosu na potomka (karyotyp 46 chromozomů, ovšem celkem tři kopie chromozomu 21 - dvě samostatné a jedna připojená na jiný akrocentr)
- **mozaiková forma** Downova syndromu, kdy nadbytečný chromozom 21 nese pouze určitá linie buněk. V tomto případě došlo buď k chybnému rozestupu chromozomů až v průběhu **mitotického dělení** při vývoji embrya, nebo chromozomální mozaika vzniká z původní kompletní trizomie, kdy u určité části buněk došlo ke ztrátě nadbytečného chromozomu 21 (rozhodují %)

Downův syndrom





47,XYY



1



2



3



4



5



6



7



8



9



10



11



12



13



14



15



16



17



18



19



20



21



22



X



YY



1



2



3



4



5



6



7



8



9



10



11



12



13



14



15



16



17



18



19



20



21



22



X

Y

Genomové mutace

Polyploidie

- znásobena je celá chromozomová sada - porucha rozdělení celých sad nebo oplození spermii (dispermie), u člověka přichází v úvahu zejména triploidie ($3n = 69$ chromozomů) a tetraploidie ($4n = 92$ chromozomů), většinou ale:
 - mola hydatidosa (potrat) – vznik splynutím 1 vajíčka a 2 spermií

Genomové mutace

Polyploidie

- u rostlin polyploidie časté (až 70 % krytosemenných, 95 % kapradin)
- **triploidie** (banány), **tetraploidie** (brambory), **hexaploidie** (pšenice), **oktoploidie** (jahody)
- spojitost mezi růstem a vnitřními hodinami rostlin → hybridní a polyploidní rostliny mají za denního světla sníženou funkci represorů transkripce, kt. regulují aktivitu genů → během dne jsou tak aktivnější geny, jejichž produkty se účastní fotosyntézy a metabolismu škrobu → díky zvýšenému výkonu fotosyntézy i ukládání škrobu pak hybridní a polyploidní rostliny rostou lépe

Genomové mutace

Polyploidie

- **autopolyploidie** – znásobení chromozomových sad u jednoho druhu; známo je to např. u lilku bramboru či vojtěšky
- **alopolyploidie** – znásobení počtu chromozomových sad, ale ty pochází od dvou a více druhů; známo je to např. u banánovníku, bavlníku či kávovníku
- **paleopolyploidní druhy** – ve své evoluční historii prošly polyploidizací, ale dnes se jeví jako diploidní; dnes je taková událost známa v evoluční historii většiny organismů včetně člověka
- člověk - polyploidní buňky: syncytiotrofoblast, hepatocyty (asi 10 %), megakaryocyty, osteoklasty
- **Syncytium (soubuní)** je mnohojaderný buněčný útvar, který vznikne rozrušením buněčných membrán několika sousedních buněk a dojde ke splynutí jejich cytoplazem. Ve výsledku se tedy jedná o buňku obsahující více jader.

Klinická genetika

- **zabývá se diagnostikou, léčením a prevencí genetických nemocí**
- **genetické poradenství**
- **vrozené vady** - poruchy utváření orgánů, které vznikly v období nitroděložního života, i poruchy funkční (např. duševní opoždění) a poruchy na úrovni biochemické a molekulární (např. vrozené vady metabolismu)

Skupina	Příčina	Zastoupení
Primárně (geneticky)	chromozomální aberace	10 %
	monogenní dědičnost	20 %
Sekundárně (prostředí)	léky, infekce, záření	5 %
	porodní poranění	12 %
	infekce po narození	7 %
Neznámé (multifaktoriální)	geny + prostředí	46 %

Klinická genetika

Prenatální diagnostika - vyšetření karyotypu plodu

- **invazivní metody** - amniocentéza, biopsie choriových klků, kordocentéza
- **cytogenetické vyšetření - karyotypizace**
- **FISH** – fluoresceční hybridizace in situ
 - vazba denaturované sDNA se specifickou sondou

Klinická genetiká

Prenatální diagnostika

- **AmnioPCR** – genetické vyšetření plodu
 - porovnání DNA markerů matky i plodu → stanovení počtu jednotlivých chromozomů u plodu
 - výsledek je následně potvrzen klasickým cytogenetickým vyšetřením
 - k dispozici je v současné době vyšetření 21. chromozomu - amnioPCR, nebo sada vyšetřující chromozomy 13, 18, 21, X a Y - tzv. multiamnioPCR

Klinická genetik

Prenatální diagnostika

Stanovení pohlaví plodu

- volné fetální DNA kolující v krvi matky
- neinvazivní s přesností ~98 %
- od 10. týdne těhotenství
- DNA plodu z venózní krve matky

Preimplantační diagnostika

- metodu časně prenatální diagnostiky, která je vázána na techniky umělého oplodnění, za účelem minimalizace chyby genetického vyšetření je třeba k oplozování vajíček použít metody intracytoplazmatické injekce spermie
- buňky pro genetické vyšetření jsou odebírány z embrya nejčastěji ve stadiu 8 buněk nebo blastocysty

Klinická genetika

Novorozenecký screening

- aktivní celoplošné vyhledávání choroby v populaci všech novorozenců v jejím preklinickém stadiu
- princip analýzy tzv. suché kapky krve na filtračním papírku odebrané standardním způsobem

Kritéria

- incidence 1: 50 – 100 000
- včasná diagnóza umožňuje takovou léčbu, která zásadně pozitivně ovlivní průběh nemoci

Stanovení

- metabolitů, substrátů, enzymů, DNA, RNA, protilátky...