

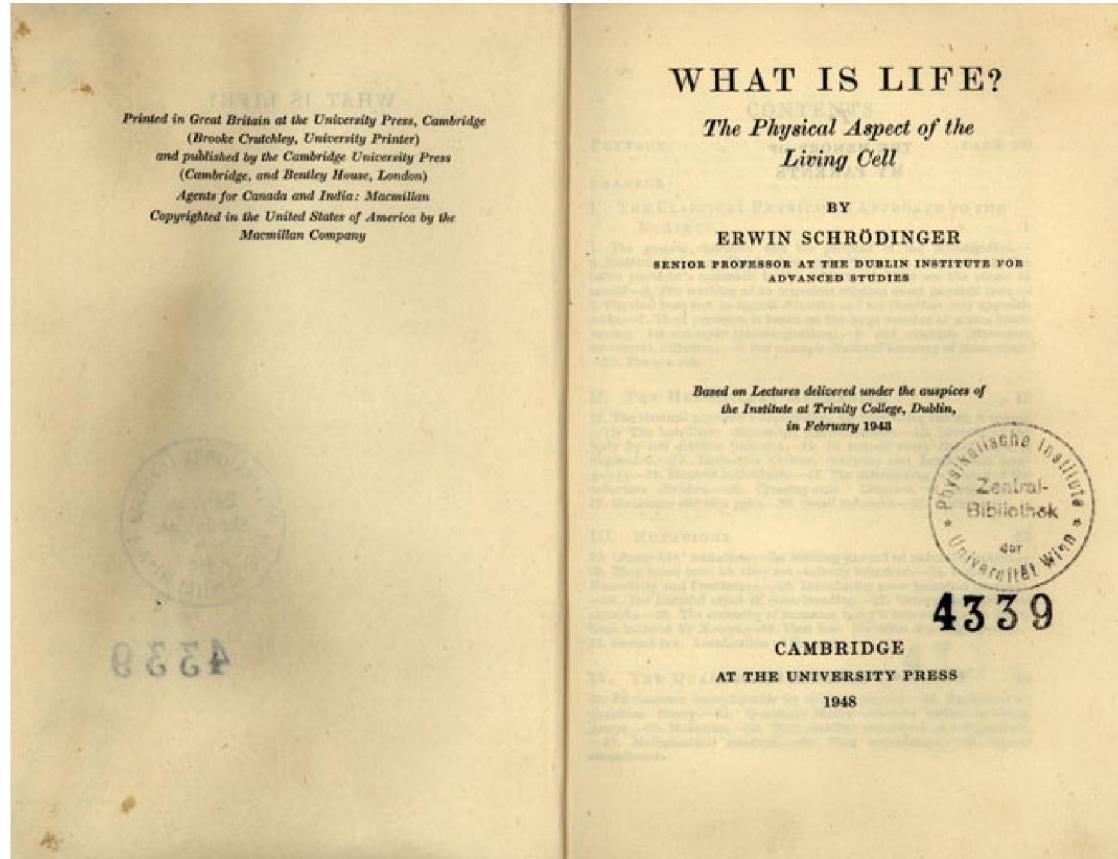
MUTÁCIE, OPRAVA DNA A REKOMBINÁCIA

Erwin Schrödinger: „Makromolekula, v ktorej je zakódovaná genetická informácia, by mala byť výnimočne stabilná.“



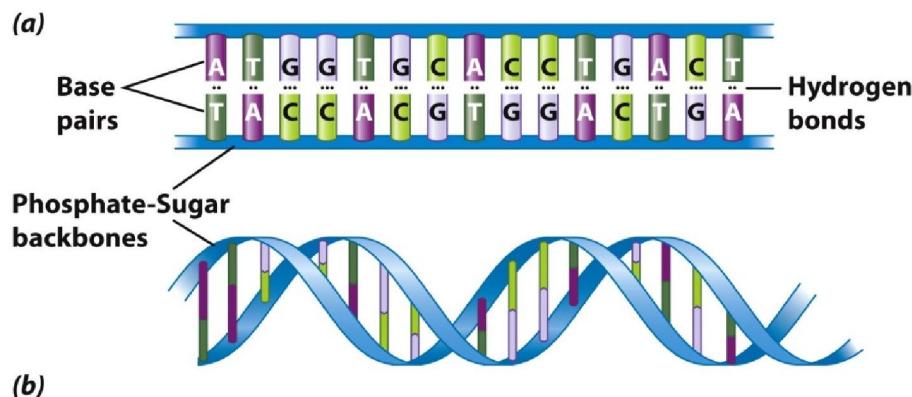
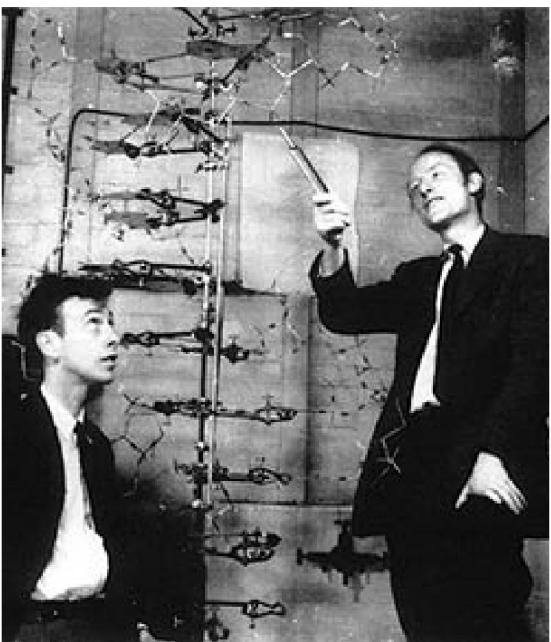
Scanned at the American Institute of Physics

Čo je život? (1944)



1933 Nobelova cena za fyziku (spolu s Paulom Diracom)

DNA nie je statická, ale podlieha zmenám



James D. Watson, Francis Crick - objav štruktúry DNA (1953)



1962 Nobelova cena za fyziológiu a medicínu (spolu s Mauricom Wilkinsom)

Genetika – veda o dedičnosti a **PREMENLIVOSTI**

Mutácia

- Zmena v genetickom materiáli
- Proces, ktorým ku zmene došlo

Mutácia: zdroj genetickej variability – dôležitý z evolučného hľadiska



Mutácia – základné znaky procesu

Mutácie sa vyskytujú vo všetkých organizmoch (vírusy, baktérie... až po človeka).

Môžu vznikať spontánne alebo byť vyvolané mutagénnymi agensami.

Mutácia je zvyčajne náhodný, neadaptívny proces.

Typy mutácií

- ❑ Zmeny počtu a štruktúry chromozómov – aberácie
- ❑ bodové mutácie—zmeny v určitých miestach génu (substitúcia, inzercia alebo delécia)

Mutácie: v somatických alebo zárodočných bunkách

- **Mutácie v zárodočných bunkách** - prenášajú sa cez gaméty do nasledujúcich generácií.
- **Somatické mutácie** - mutantný fenotyp sa prejaví iba v bunkách, ktoré vznikli delením bunky nesúcej mutáciu a neprenáša sa do potomstva.

Somatická mutácia vytvorená u jabĺk Delicious



- Pôvodná mutácia vznikla v somatických bunkách – somatická mozaika
- Vegetatívne rozmnожovanie umožnilo zachovanie mutácie

Mutácia: spontánna alebo indukovaná

- **Spontánne mutácie** sa vyskytujú bez známej príčiny (metabolická chyba alebo vplyv neznámych agensov prostredia).

- **Indukované mutácie** vznikajú ako výsledok vystavenia organizmu mutagénom, fyzikálnym, chemickým alebo biologickým, ktoré spôsobujú zmeny v DNA.

Faktory ovplyvňujúce množstvo spontánnych mutácií

- Presnosť DNA replikačnej mašinérie
- Účinnosť opravných mechanizmov DNA
- Stupeň vystavenia mutagénnym agensom v prostredí

Frekvencia mutácií

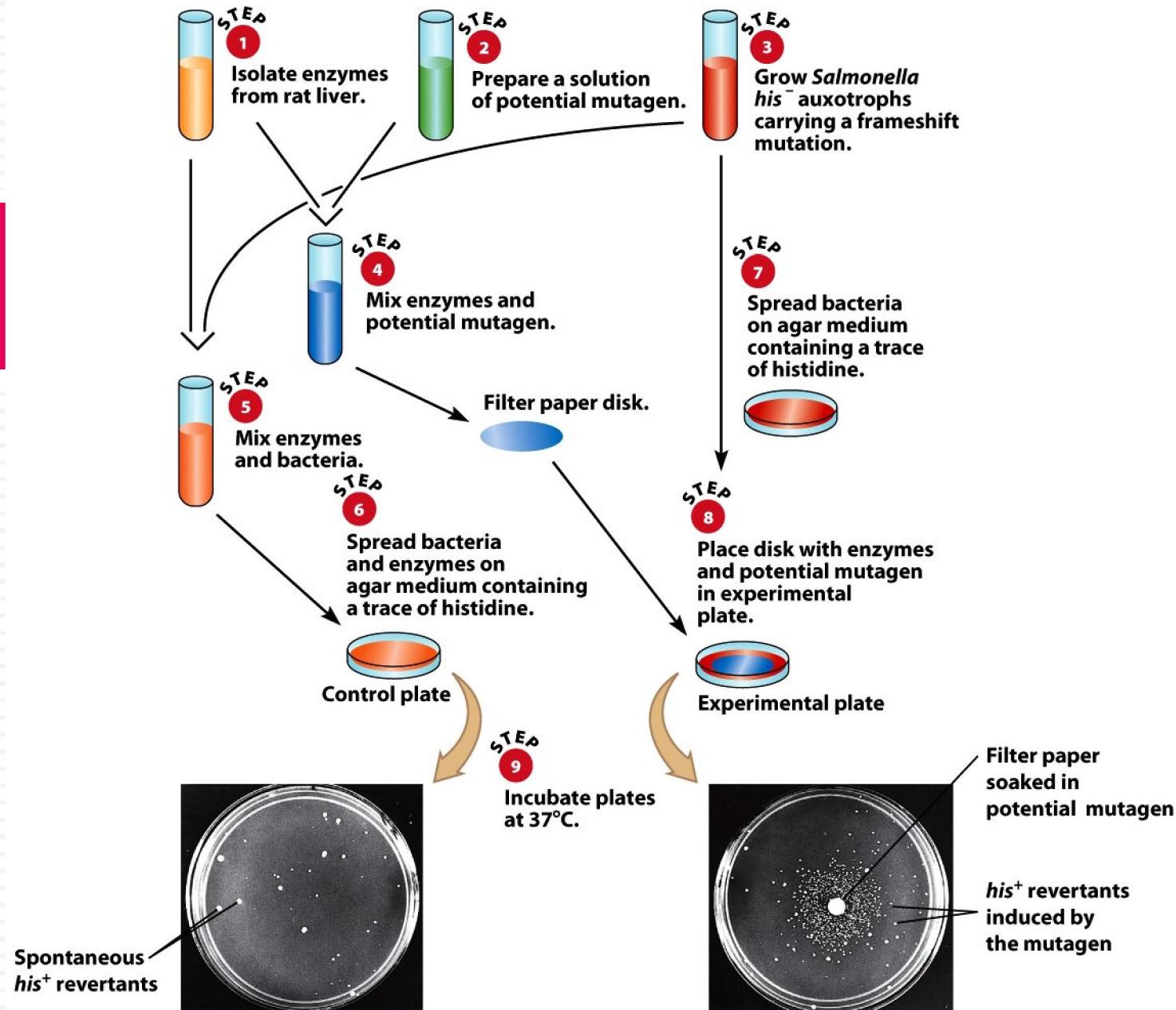
- Spontánne mutácie nie sú časté
 - Baktérie a fágy: 10^{-8} to 10^{-10} na nukleotidový pár na generáciu
 - Eukaryoty: 10^{-7} to 10^{-9} na nukleotidový pár na generáciu alebo 10^{-4} to 10^{-7} na gén na generáciu

Ovplyvnenie organizmu mutagénom zvyšuje frekvenciu mutácií.

Testovanie mutagenity:

Amesov test

- jednoduchá a finančne nenáročná metóda na detekciu mutagénov



Mutácia: zvyčajne náhodný, neadaptívny proces

- Je mutácia náhodná alebo riadená prostredím?

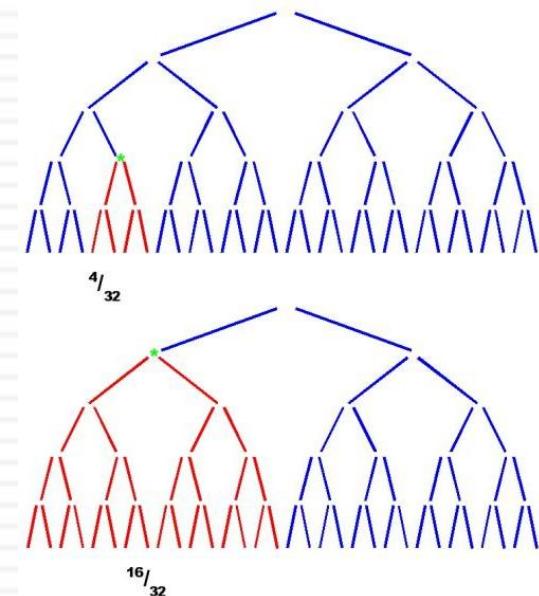
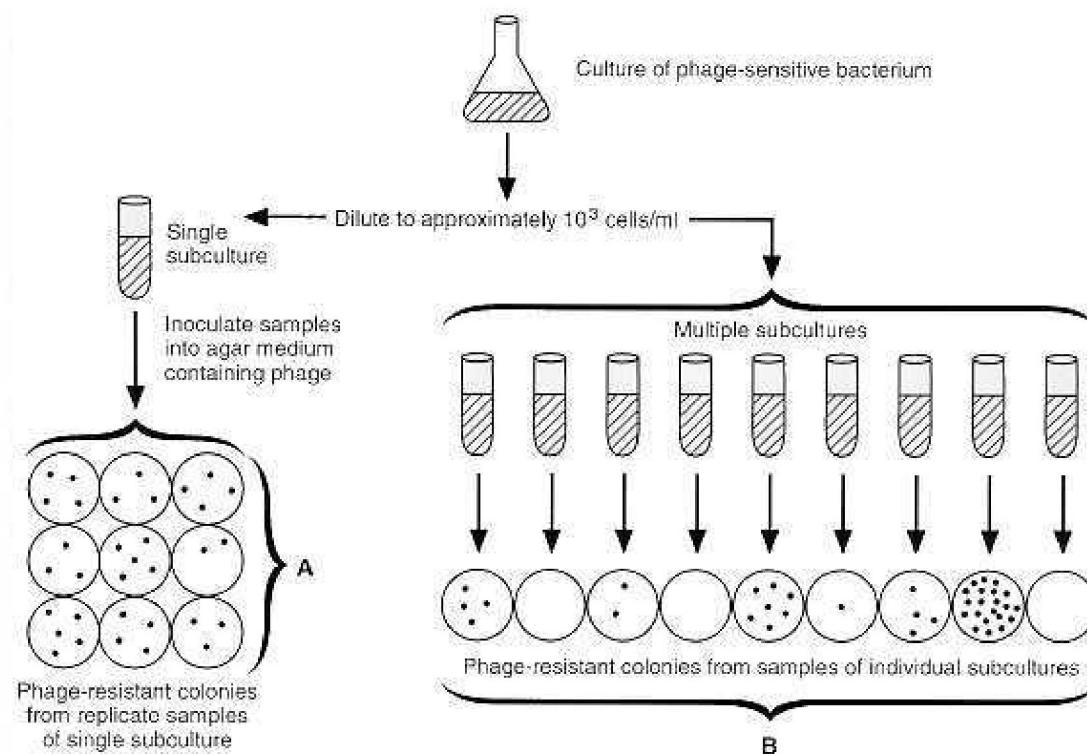
- Fluktuačný test - Luria a Delbrück

- Razítkovacia metóda – Joshua a Ester Lederbergovci

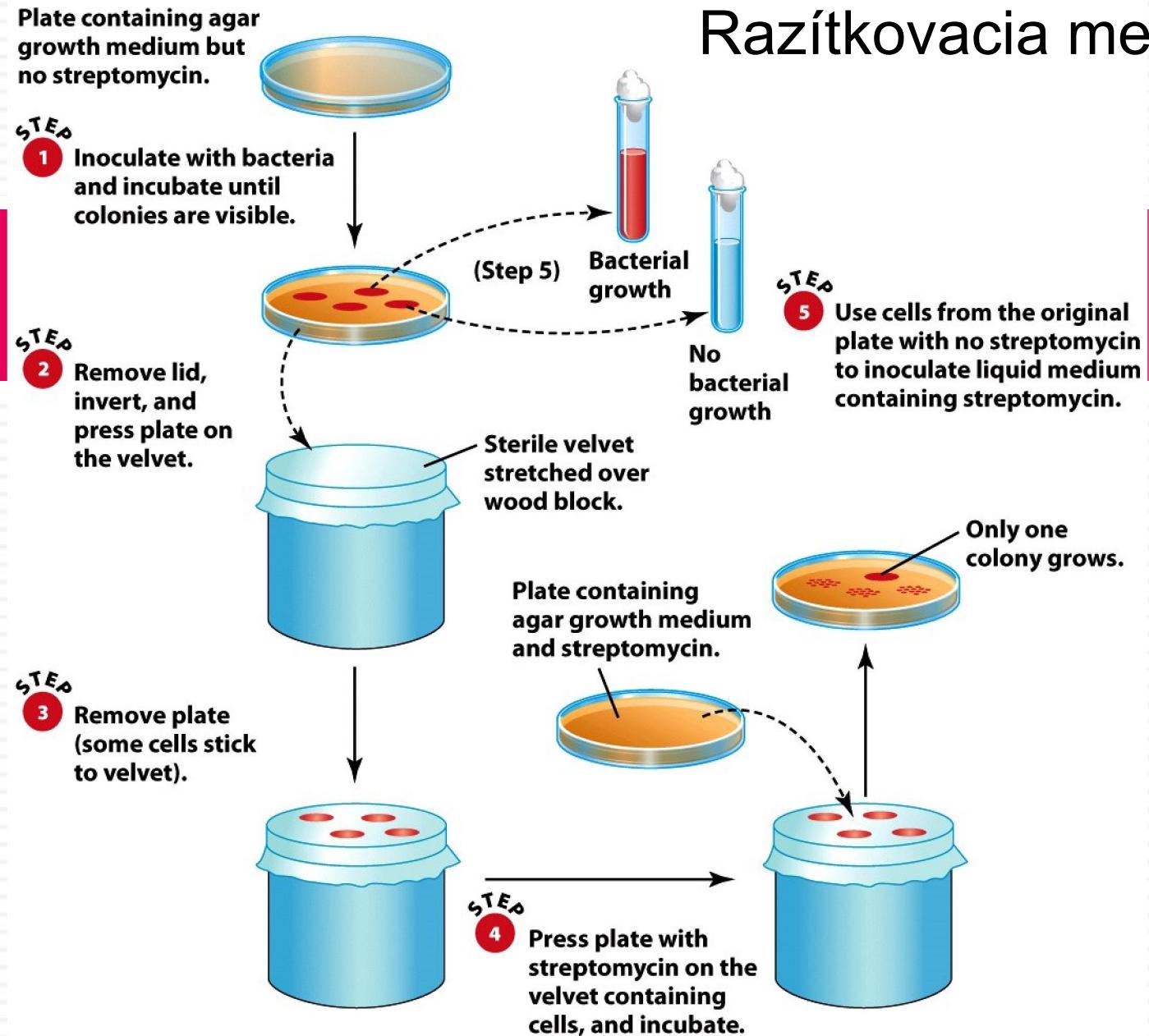


Salvador Luria a Max Delbrück

Fluktuačný test



Razítkovacia metóda

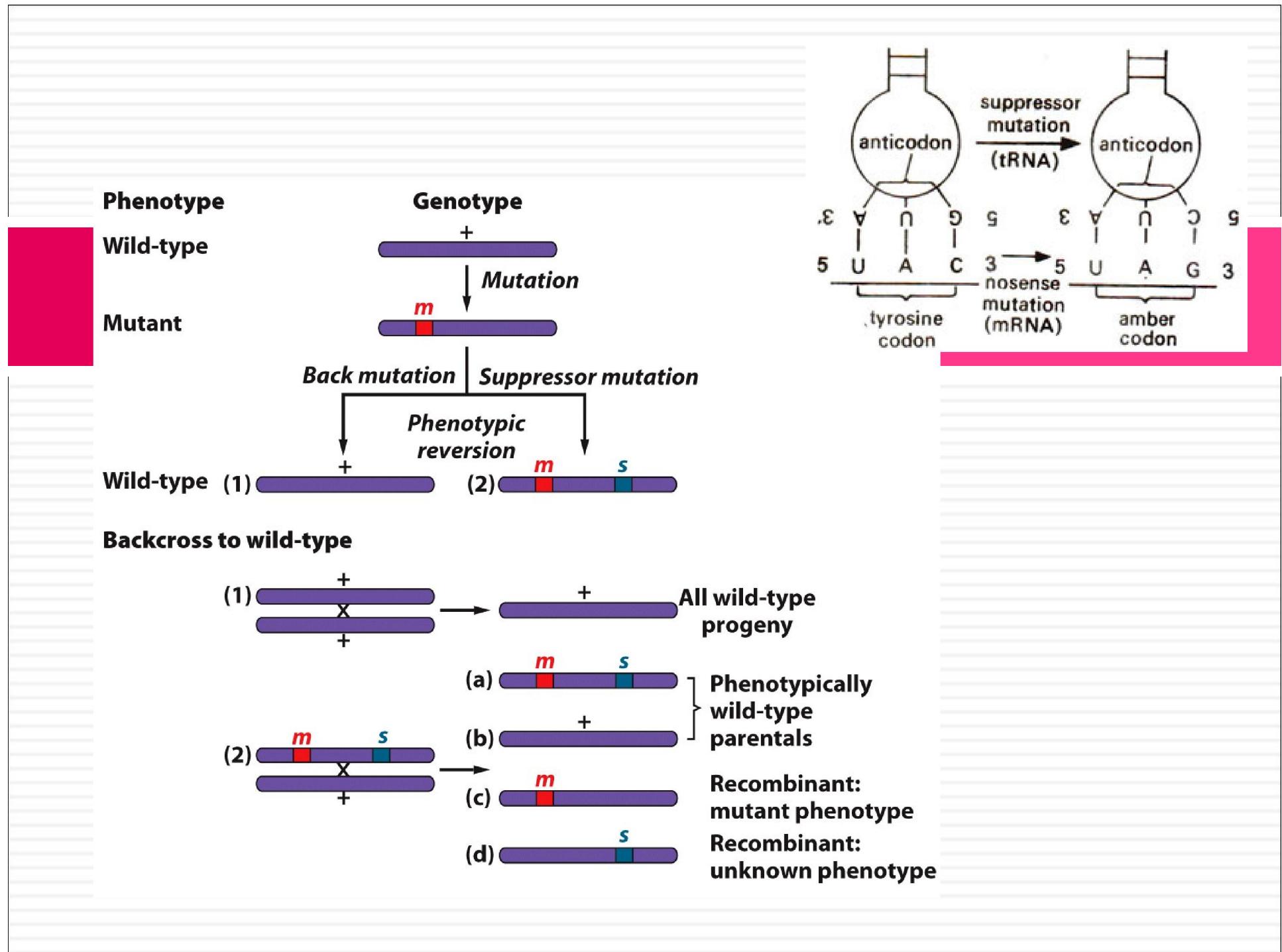


Razítkovacia metóda

- Environmentálny stres nevyvoláva tvorbu mutácií, ale selektuje mutantov, ktorí sú najlepšie prispôsobené environmentálnemu stresu.

Mutácia: Reverzibilný proces

- **Priama mutácia**—mutácia zo štandardnej alej na mutantnú.
- **Spätná, reverzná mutácia (reverzia)**—druhá mutácia, ktorá obnoví pôvodný, štandardný fenotyp.
 - **Pravá spätná mutácia**—mutácia vznikla v rovnakom mieste ako pôvodná
 - **Supresorová mutácia**—mutácia vznikla na odlišnom mieste v genóme.



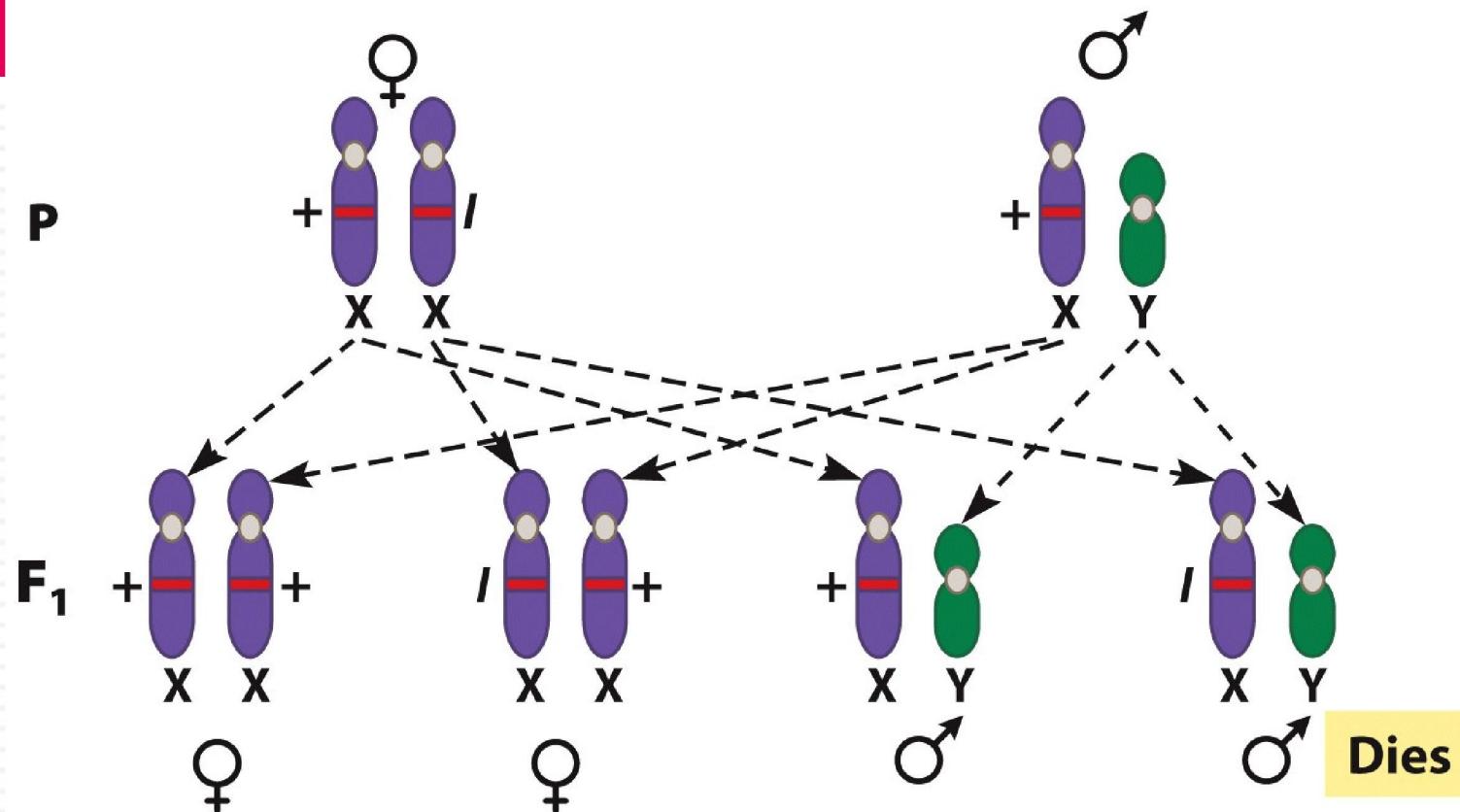
Mutácia: Fenotypový účinok

Účinok mutácií na fenotyp môže byť od nepozorovateľnej zmeny až letálny účinok.

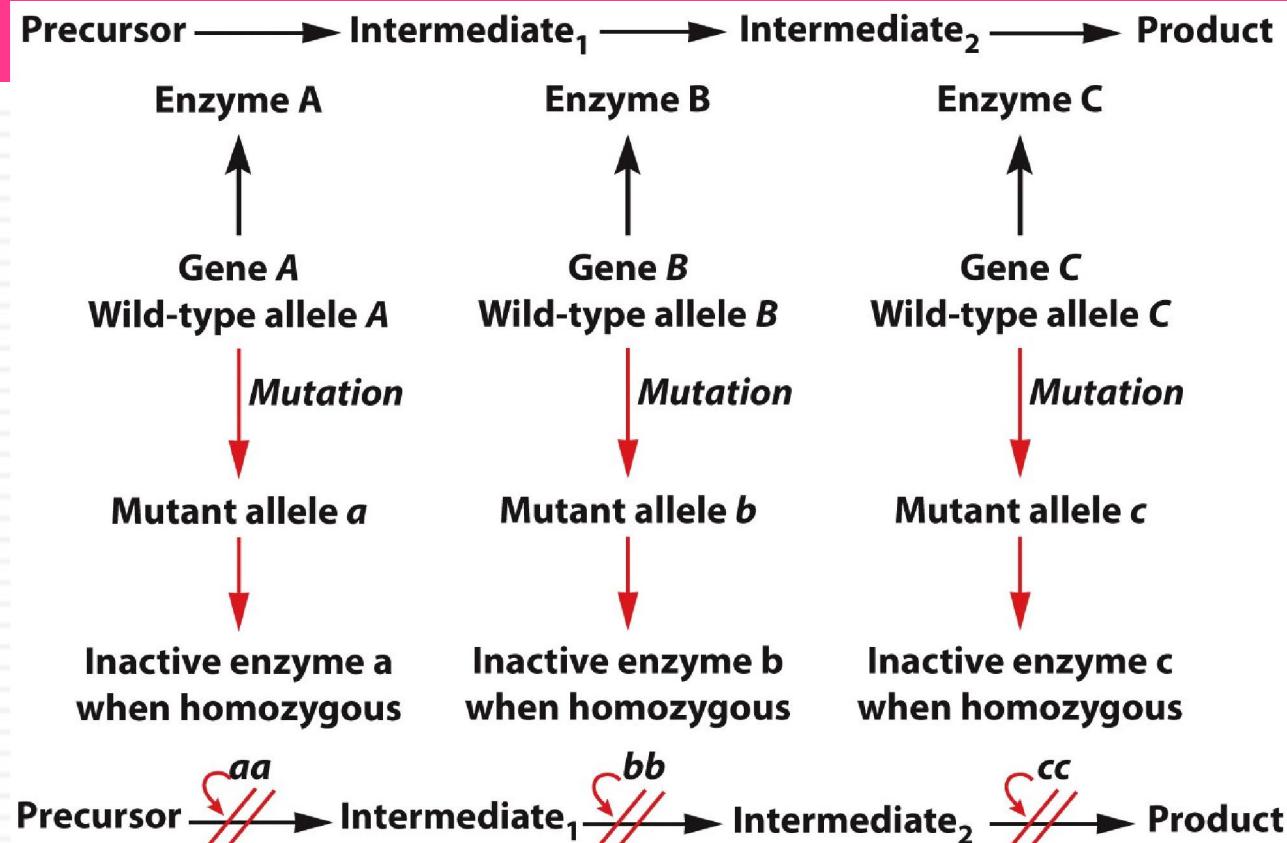
Typy mutácií

- **Izoalely** nemajú žiadnen vplyv na fenotyp, resp. malý vplyv sa môže detektovať špeciálnymi metódami (napr. sekvenovanie).
- **Nullové alely** – produkty mutovaných génov nie sú funkčné alebo sa vôbec netvoria.
- **Recesívne letálne mutácie** – mutácie vyskytujúce sa v génoch potrebných pre rast a vývin organizmu, v homozygotnom stave sú letálne.
- **Dominantné alebo recesívne mutácie.**

Recesívne letálne mutácie viazané na X-chromozóm menia pomer pohlaví

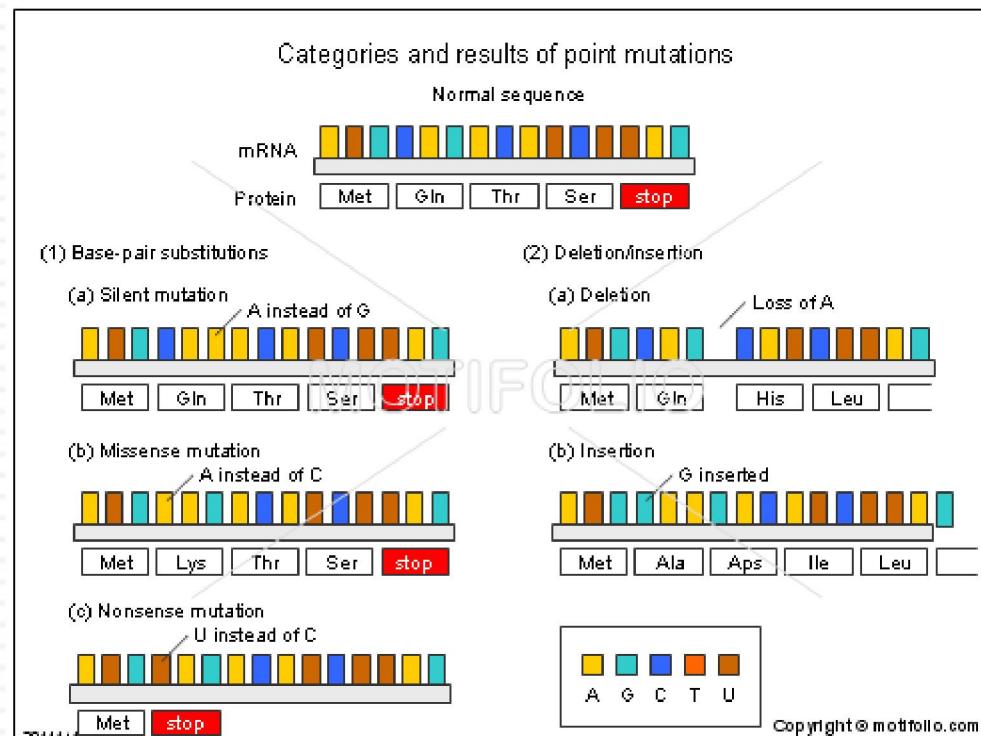


Recesívne mutácie často blokujú metabolické dráhy



Neutrálne mutácie

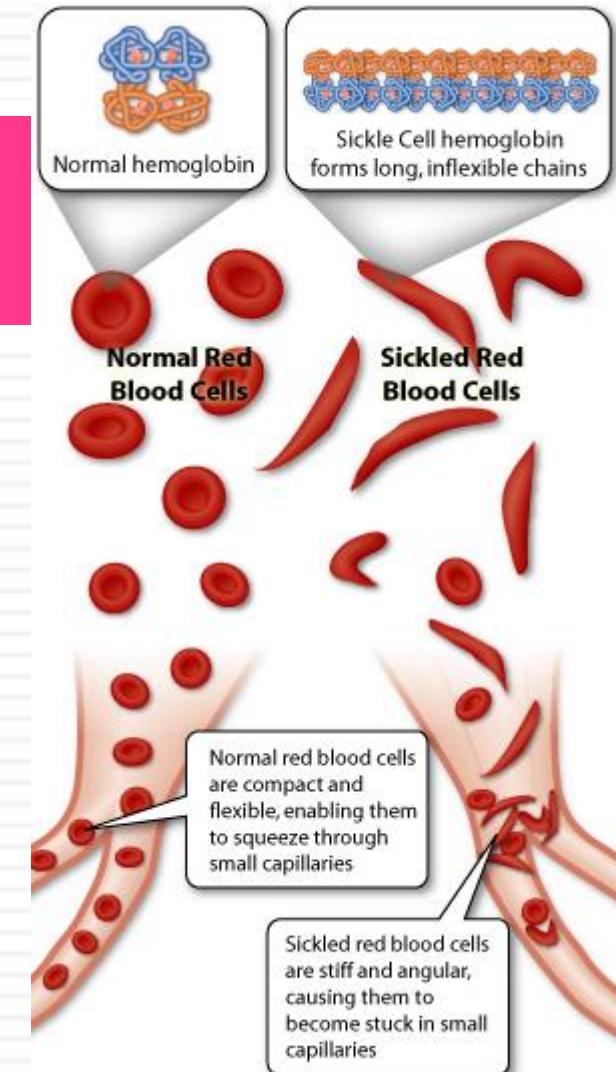
- Vďaka degenerovanosti genetického kódu mnoho mutácií nemá vplyv na fenotyp. Označujeme ich ako **neutrálne mutácie**.



		Second Letter					
		U	C	A	G		
1st letter	U	UUU Phe UUC UUA UUG	UCU Ser UCC UCA UCG	UAU Tyr UAC UAA UAG	UGU Cys UGC UGA UGG	CYS STOP STOP TRP	U C A G
	C	CUU Leu CUC CUA CUG	CCU Pro CCC CCA CCG	CAU His CAC CAA CAG	CGU Arg CGC CGA CGG	ARG GLN	U C A G
	A	AUU Ile AUC AUA AUG	ACU Thr ACC ACA ACG	AAU Asn AAC AAA AAG	AGU Ser AGC AGA AGG	SER ARG	U C A G
	G	GUU Val GUC GUA GUG	GCU Ala GCC GCA GCG	GAU Asp GAC GAA GAG	GGU Gly GGC GGA GGG	GLY	U C A G

Mutácie v génoch kódujúcich globíny u človeka

- Hemoglobín A obsahuje dva α a dva β reťazce.
- Hemoglobín u pacientov s kosáčikovitou anémiou (hemoglobín S) sa od hemoglobínu A líši iba jednou bodovou mutáciou.
- Šiesta aminokyselina v β reťazci je v hemoglobíne A kyselina glutámová a v hemoglobíne S valín.



Podmienečne letálne mutácie

- Letálne len za restrikčných podmienok, ale životaschopné v permisívnych podmienkach
- Mutanti s podmienečne letálnymi alelami sa môžu udržiavať v permisívnych podmienkach a ich fenotyp sa študuje v restrikčných podmienkach.

Podmienečne letálne mutácie

- **Auxotrofné organizmy** nie sú schopné syntetizovať esenciálny metabolit, ktorý sa syntetizuje u prototrofov. Auxotrof môže rásť iba na médiu s pridaným metabolitom.

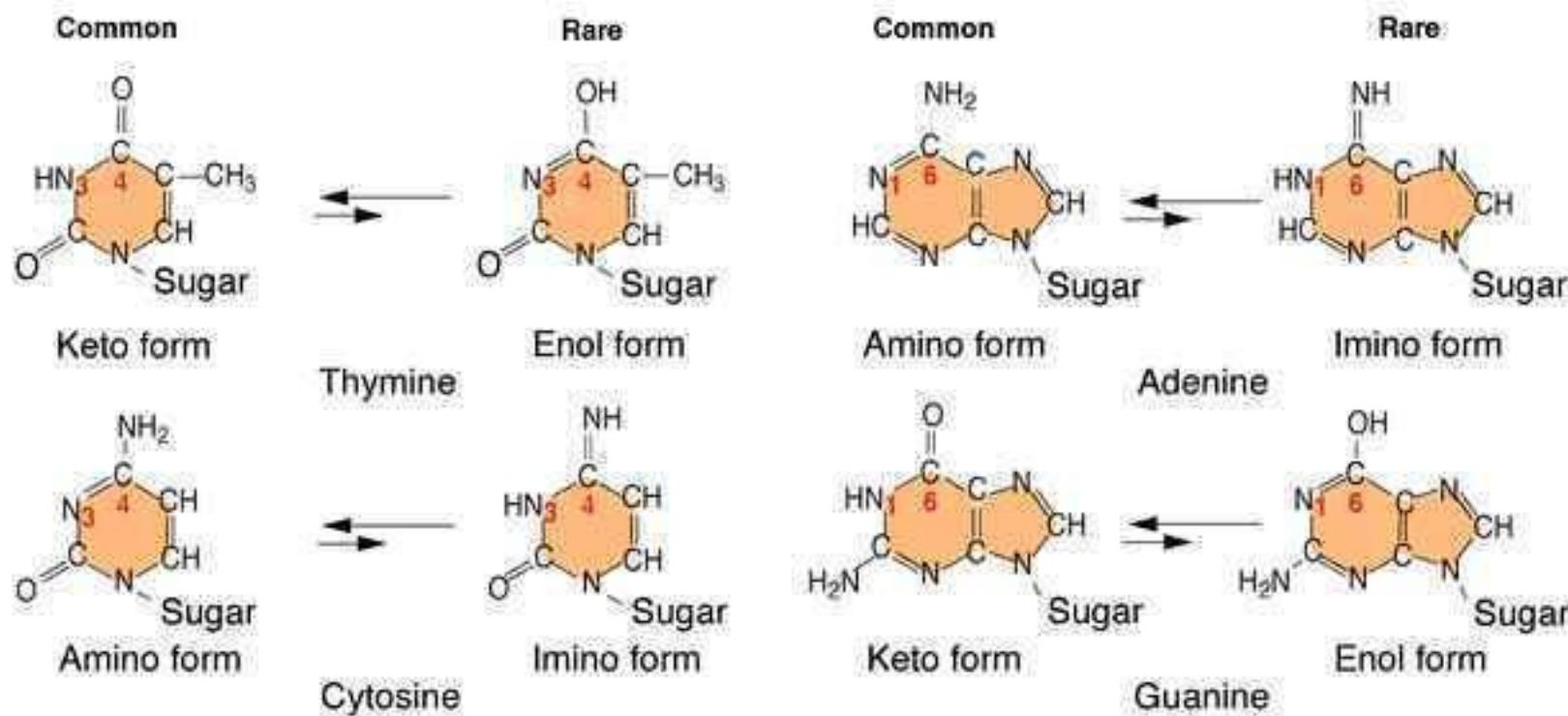
- **Teplotne-senzitívne mutanty** rastú len pri určitej teplote, jej zmena zabraňuje rastu.



Molekulárna podstata mutácií

Mutácie menia sekvencie nukleotidov v génoch niekoľkými spôsobmi, napr. substitúciou, adíciou alebo deléciou jedného alebo viacerých nukleotidových párov.

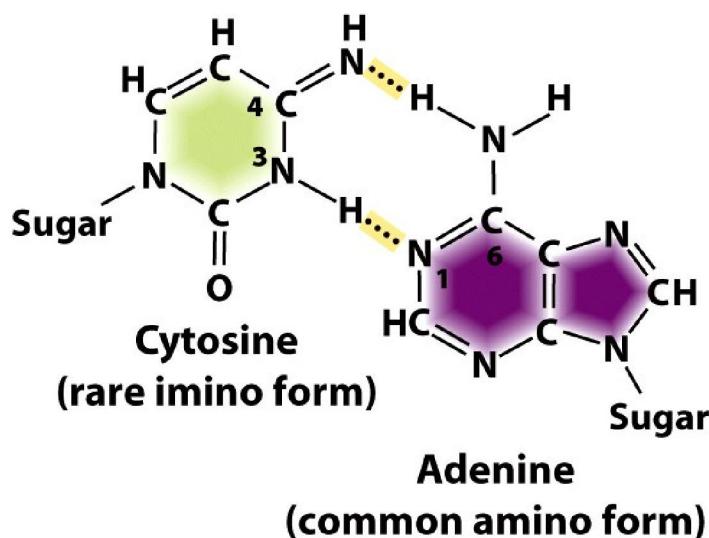
Tautomérne prešmyky menia párovanie báz



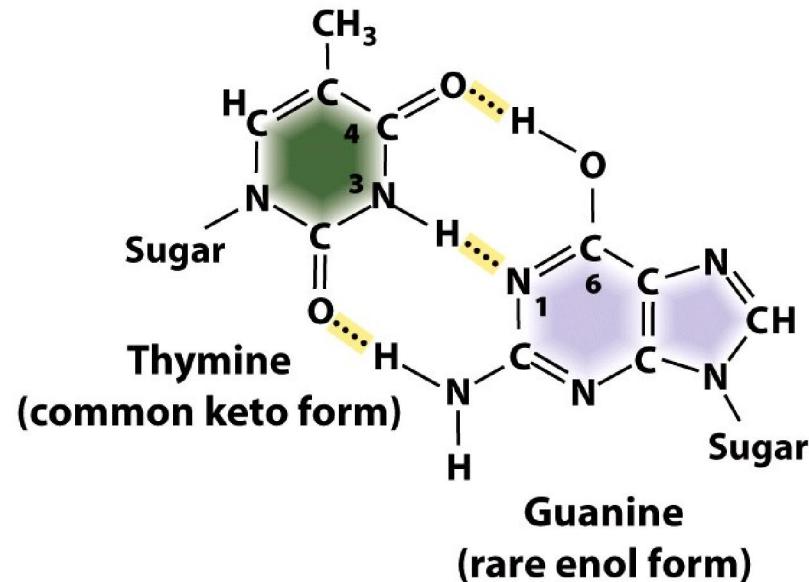
Tautomérne prešmyky menia párovanie báz

Cytozín v imino forme sa páruje s adenínom a guanín v zdriedkavej enol forme sa páruje s tymínom.

Rare A:C base pair

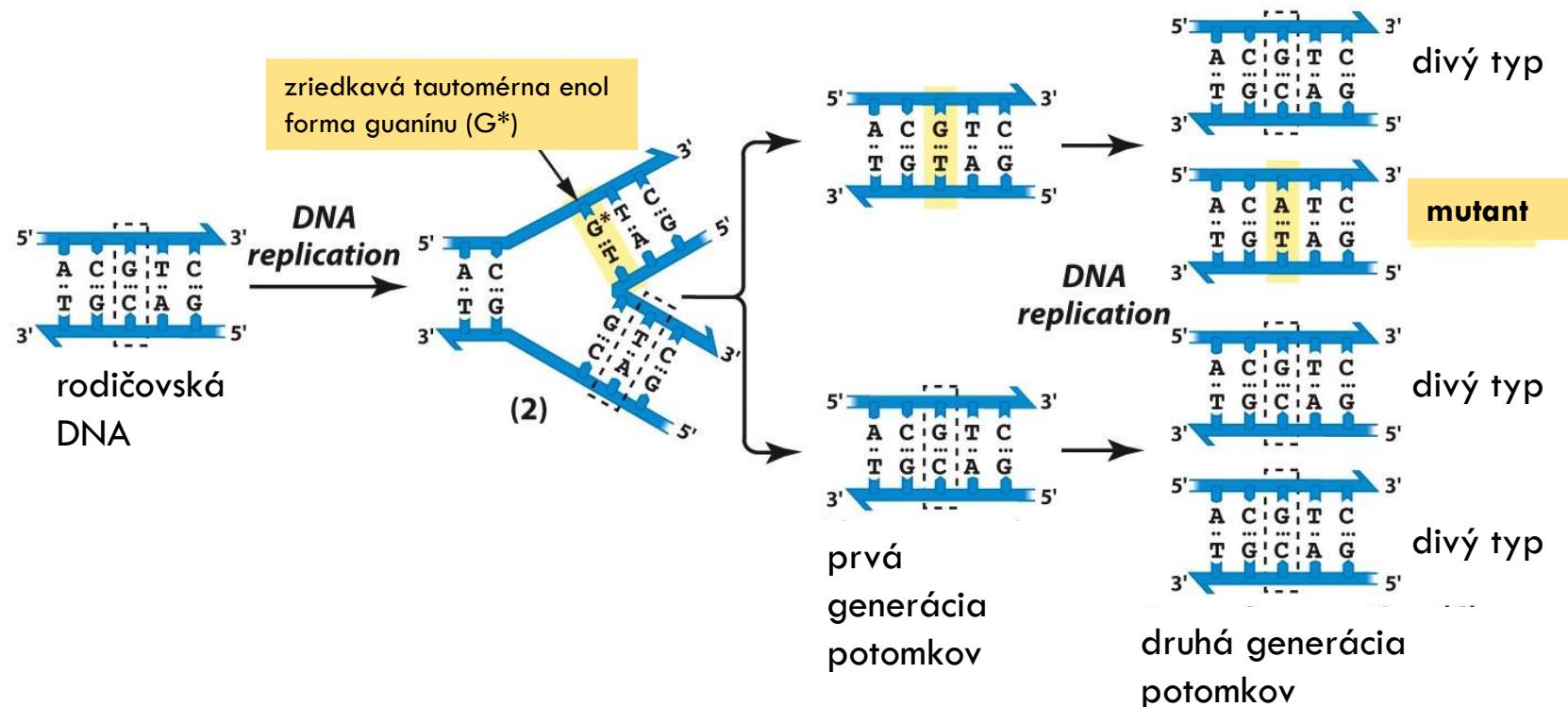


Rare G:T base pair



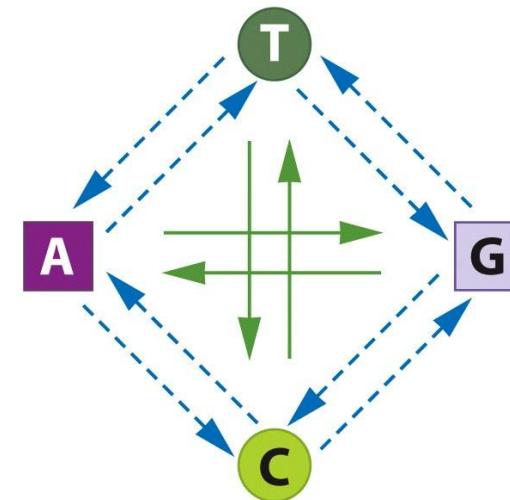
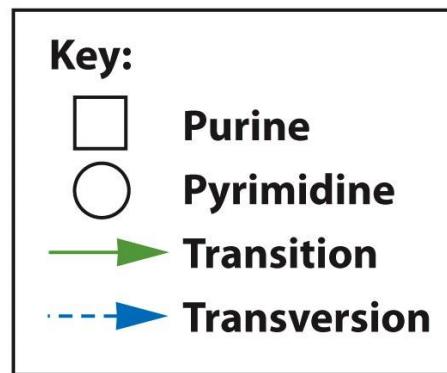
Mutácia spôsobená tautomérnym prešmykom

Mechanizmus, akým tautomérne prešmyky v bázach spôsobujú mutácie.



Substitúcia báz

12 rôznych substitúcií, ktoré môžu vzniknúť v DNA

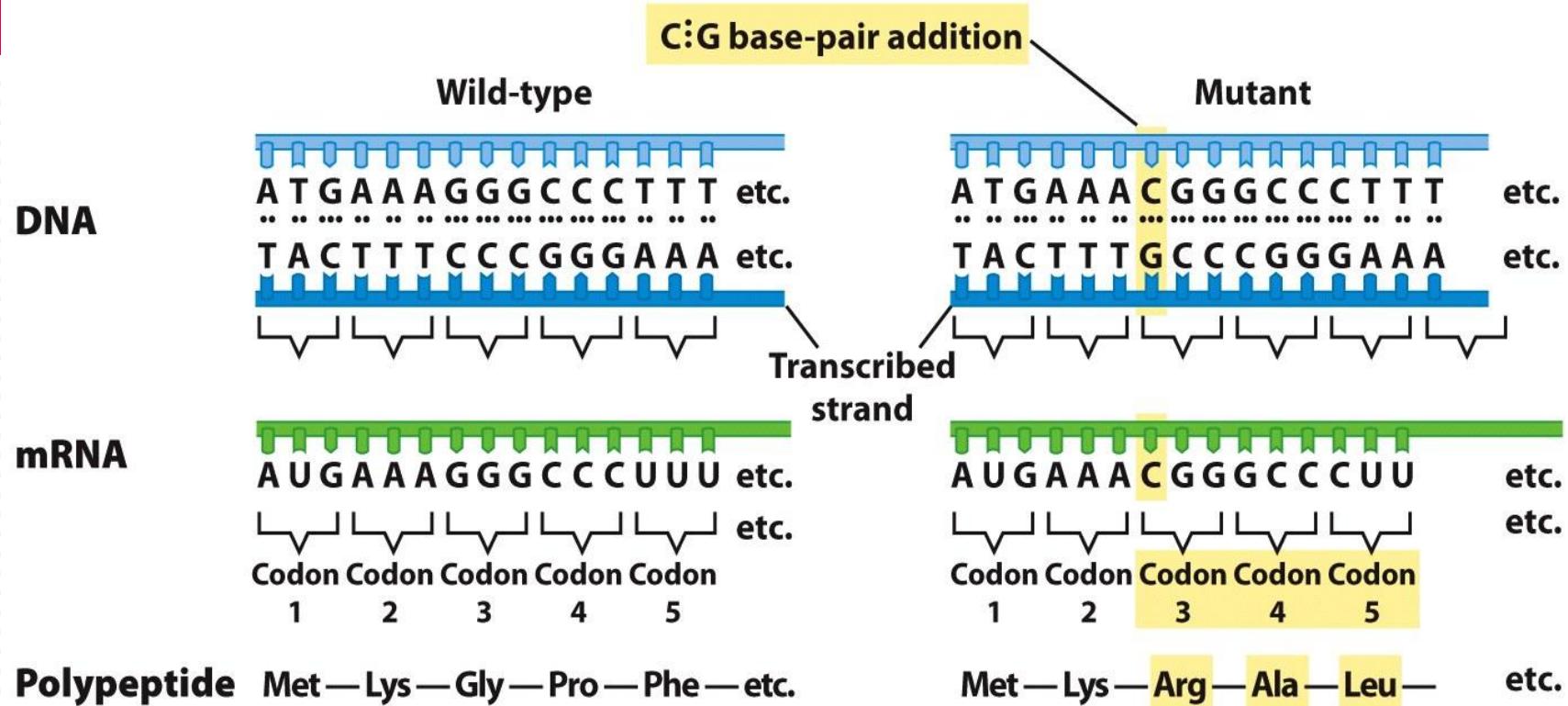


Tranzícia – nahradzuje pyrimidín za iný pyrimidín alebo purín za purín.

Transverzia nahradzuje pyrimidín za purín alebo purín za pyrimidín.

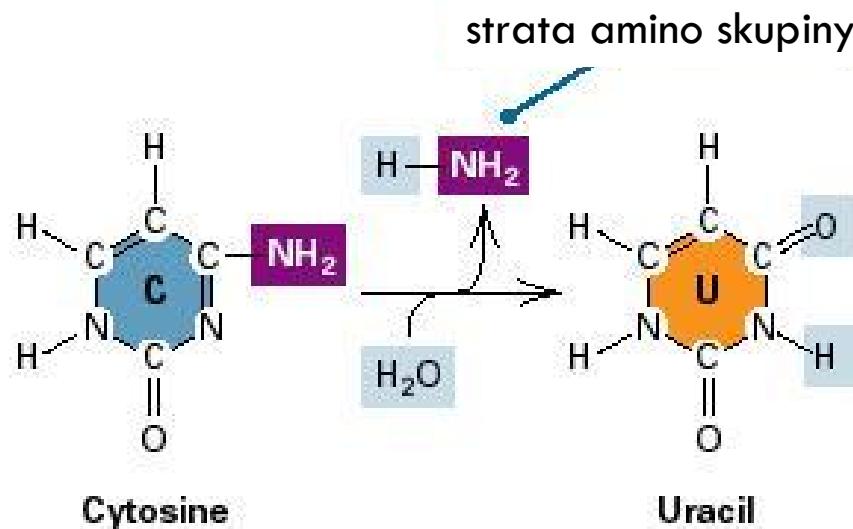
Posunové mutácie

Insertions or deletions of one or two base pairs alter the reading frame of the gene distal to the site of the mutation.



Deaminácia báz

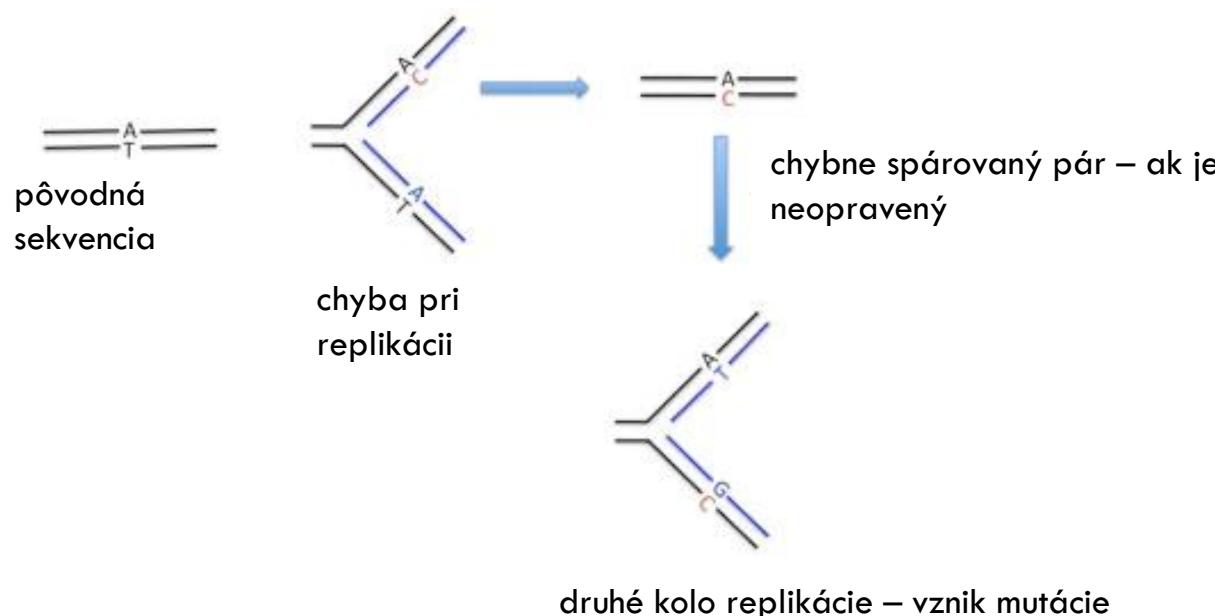
(A)



Deaminácia cytozínu vedie k zámene báz: GC → AT

Chyby pri replikácii

- DNA polymeráza zarádí nesprávny nukleotid, alebo jeden pridá alebo vynechá



Poškodenia DNA vznikajúce produktami metabolizmu bunky

- najnebezpečnejšie sú **oxidačné zmeny** v DNA spôsobené reaktívnymi kyslíkovými metabolitmi
- narušenie rovnováhy medzi prooxidantami a antioxidantami – **OXIDAČNÝ STRES**

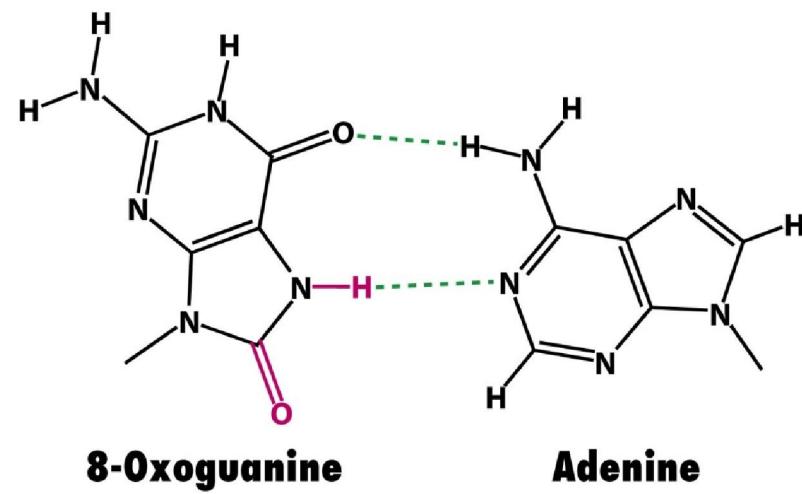
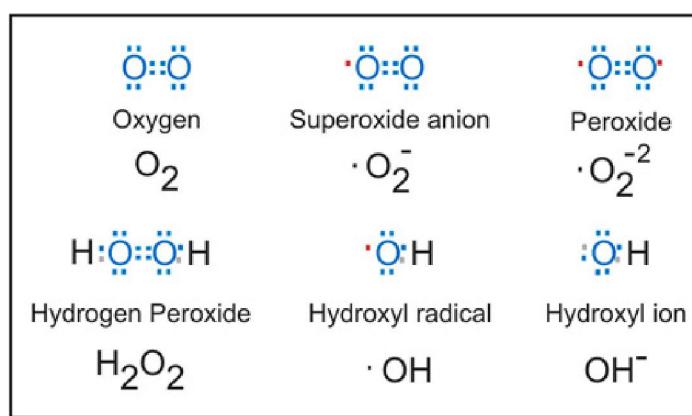


Figure 28-36
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W.H. Freeman and Company

Indukované poškodenia DNA

3 skupiny mutagénov:

- ▶ Fyzikálne – UV žiarenie, ionizačné žiarenie
- ▶ Chemické – alkylačné látky, interkalačné agensy ...
- ▶ Biologické – vírusy, transpozóny ...

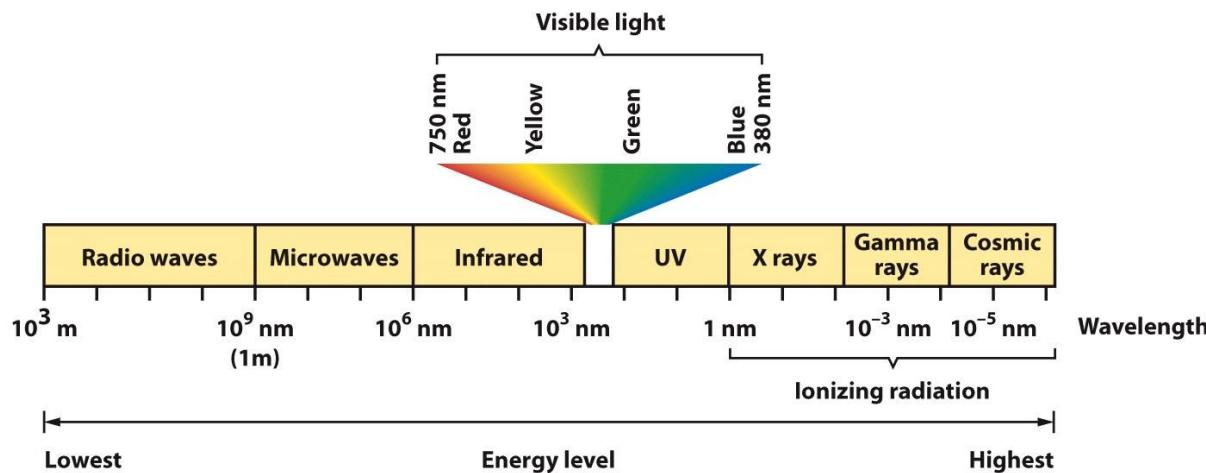
Hermann Joseph Müller



objav, že dedičné zmeny – mutácie môžu vznikať pôsobením X žiarenia (Nobelova cena za fyziológiu a medicínu 1946)



Fyzikálne mutagény



Obr.: Elektromagnetické spektrum

- Ionizačné žiarenie (X-žiarenie, gama) spôsobuje mutácie ionizáciou molekúl
- UV žiarenie spôsobuje mutácie excitáciou molekúl.

Žiarenie nevytvára nové typy mutácií, ale len zvyšuje frekvenciu tých istých mutácií, ktoré vznikajú spontánne.

-elektromagnetické vlnenie
-nízka penetračná schopnosť - nevyvolávajú ionizáciu atómov a molekúl, ale len ich excitáciu (presun e^- na orbitály s vyššou energetickou hladinou),

UV žiarenie

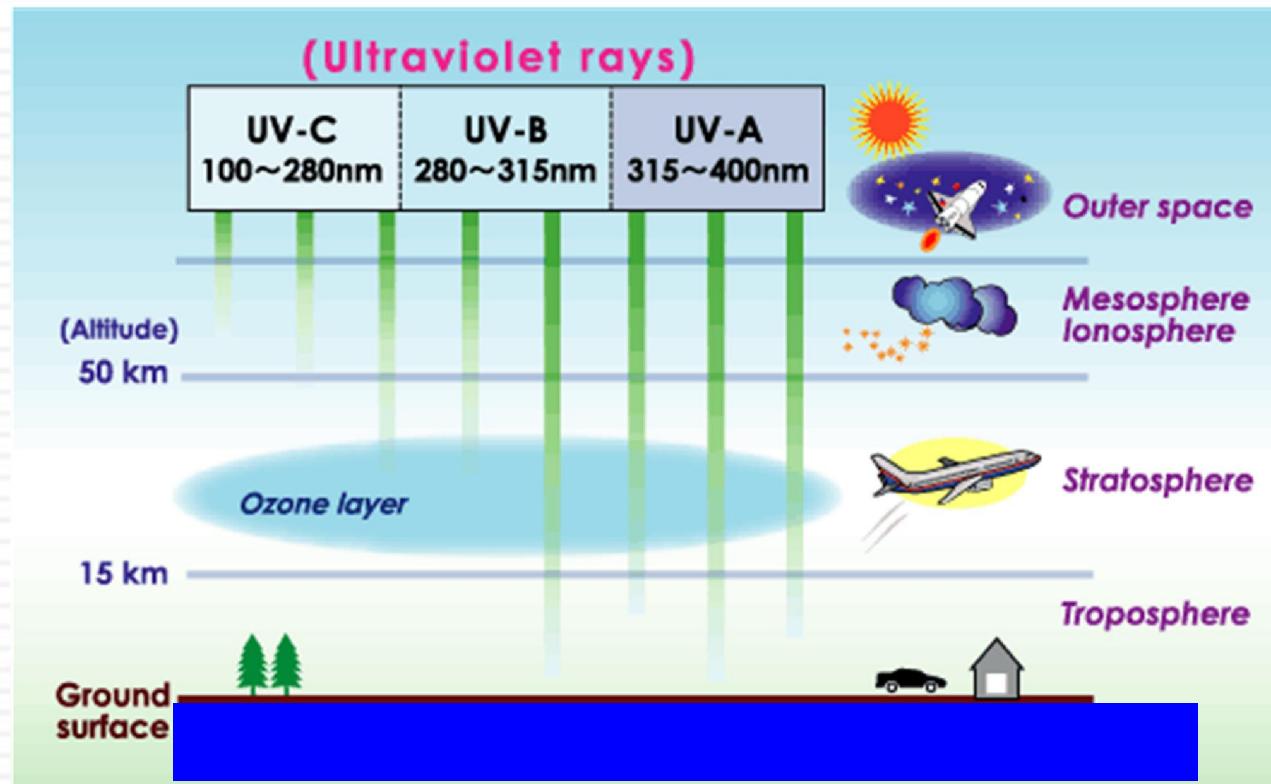
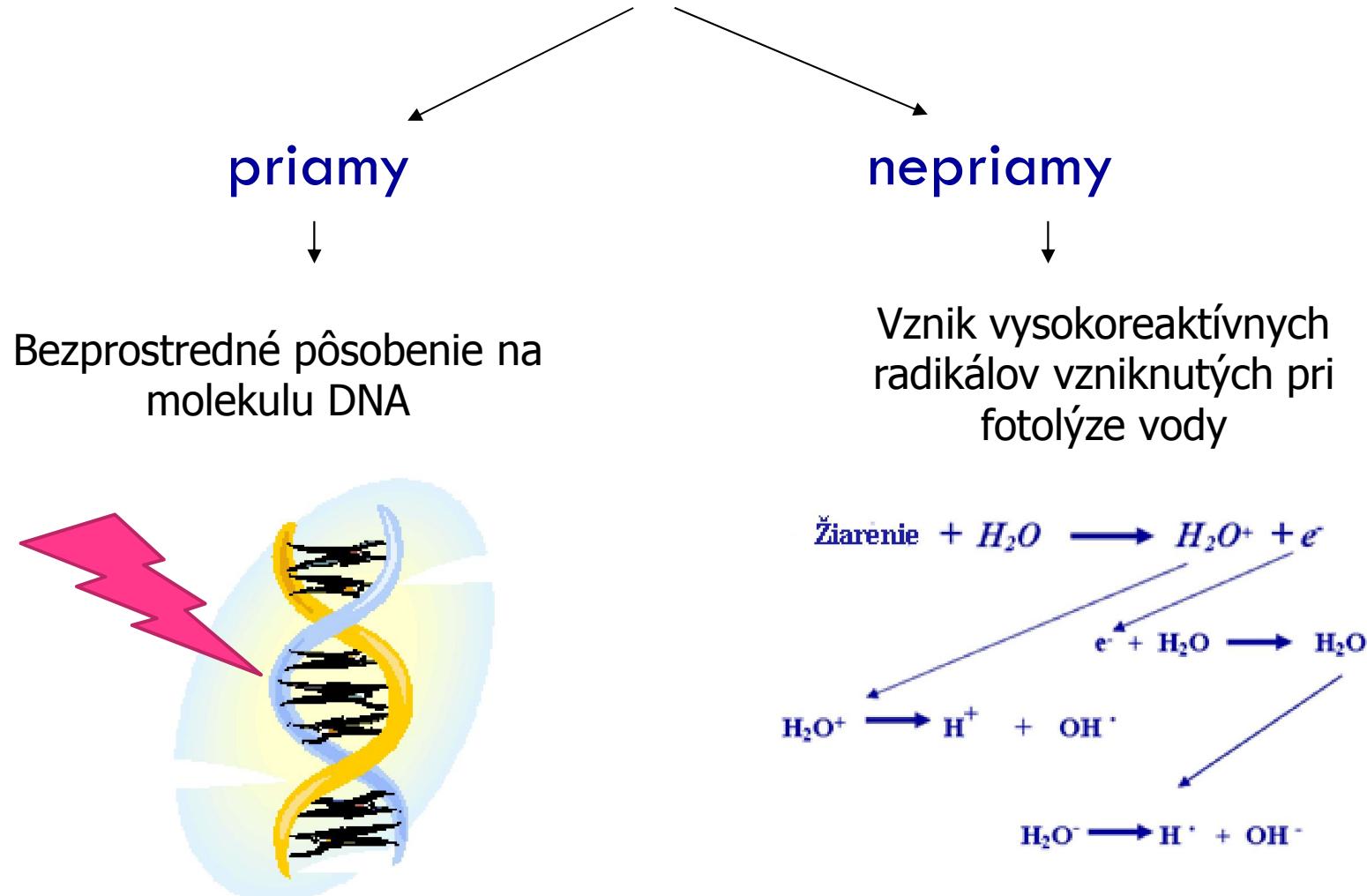


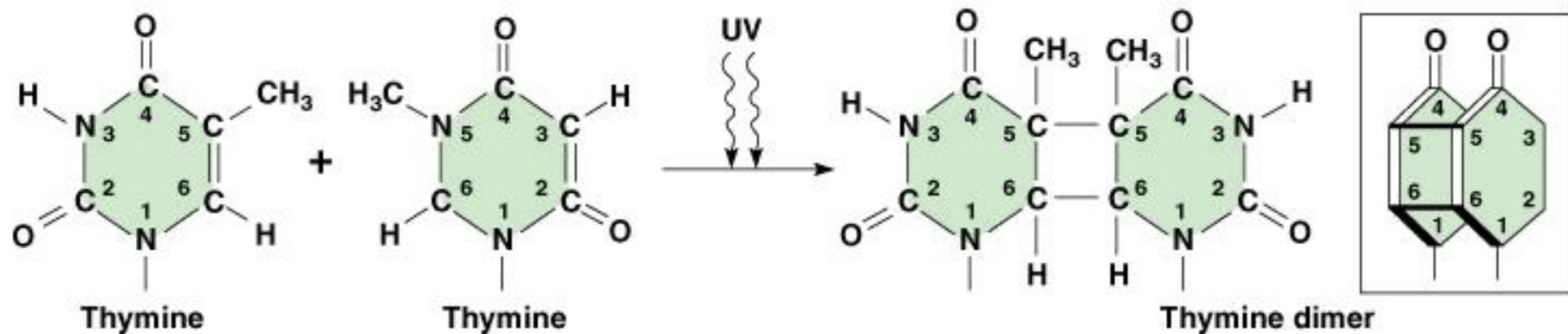
Figure 1. UV radiation at ground level

Fyzikálne mutagény – účinok na DNA



UV žiarenie

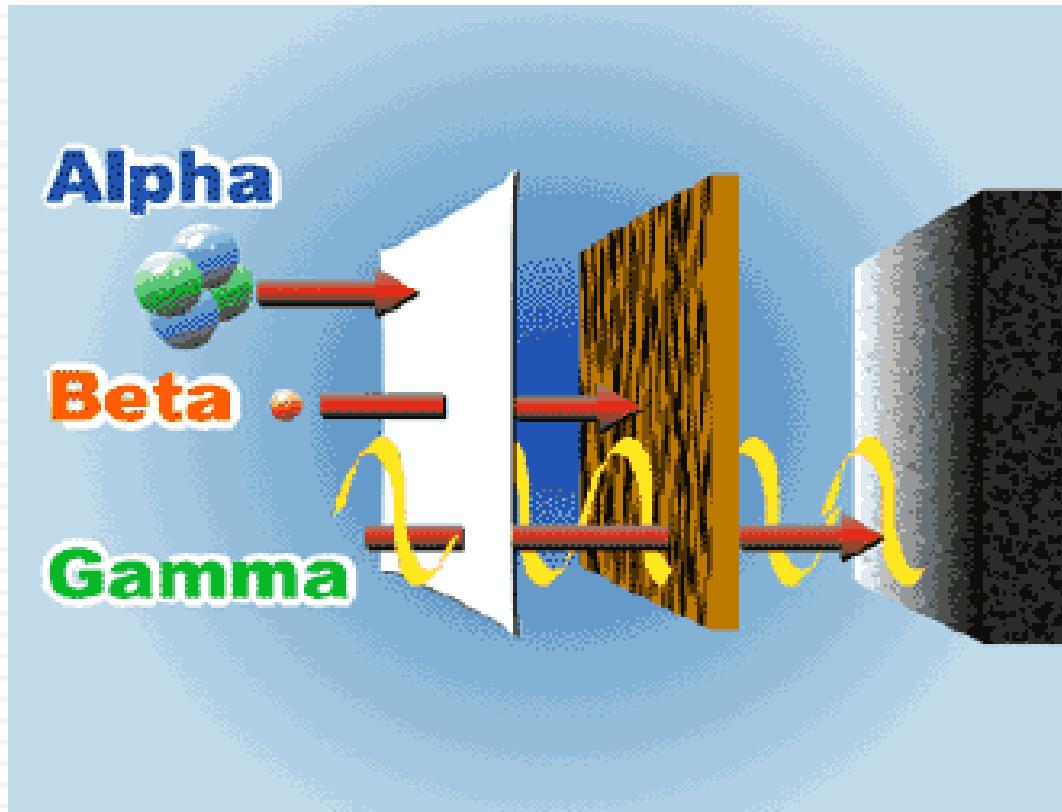
- pyrimidínový dimér



- reťazcové zlomy
- DNA-proteínové krížové väzby

Ionizačné žiarenie

■ Pri prechode látkou vyvoláva tvorbu excitovaných a ionizovaných atómov a molekúl.



Energia

nízka

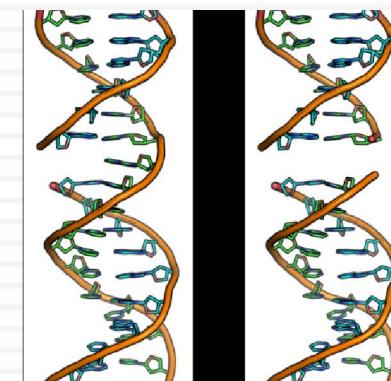
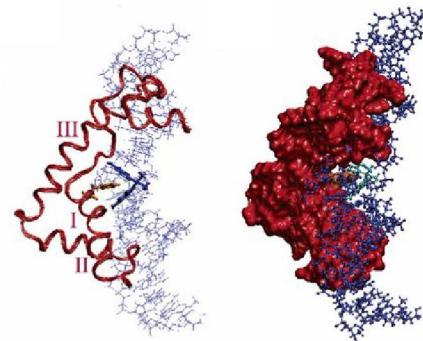
stredná

vysoká

Ionizačné žiarenie

Hlavné typy poškodení DNA spôsobených ionizačným žiareniom

- reťazcové zlomy
- DNA-proteínové krížové väzby



Chemické mutagény

1942 Auerbachová – dokázala, že chemické látky (dusíkatý yperit) spôsobuje mutácie v bunkách

Typy:

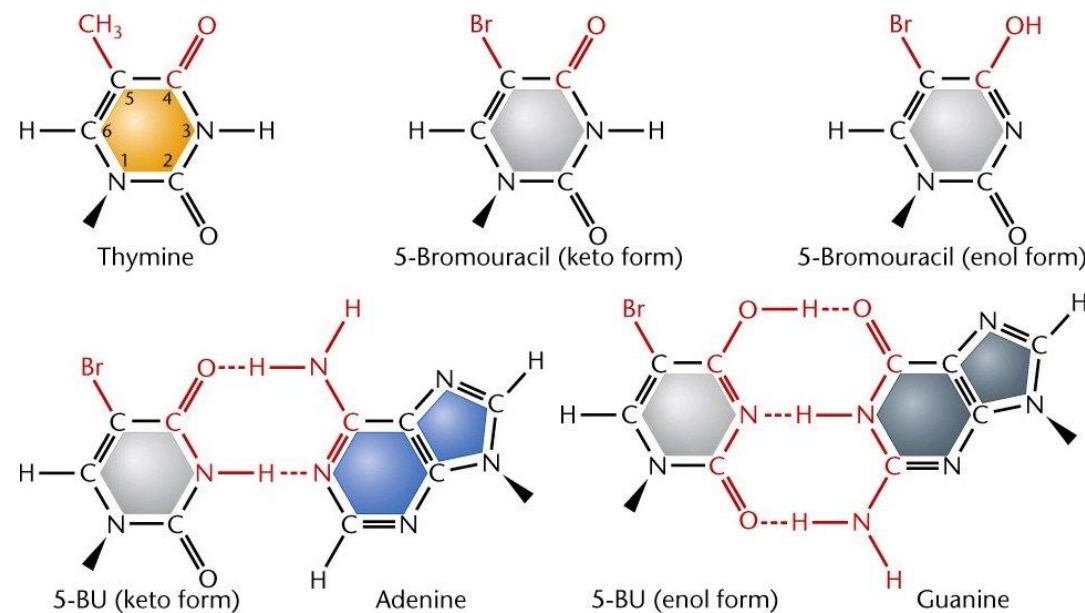
- Analógy báz
- Interkalačné činidlá
- Látky, ktoré chemicky menia DNA
- Látky, ktoré vytvárajú reťazcové väzby
- Alkylačné látky



Chemické mutagény

- analógy báz

5 bromouracil

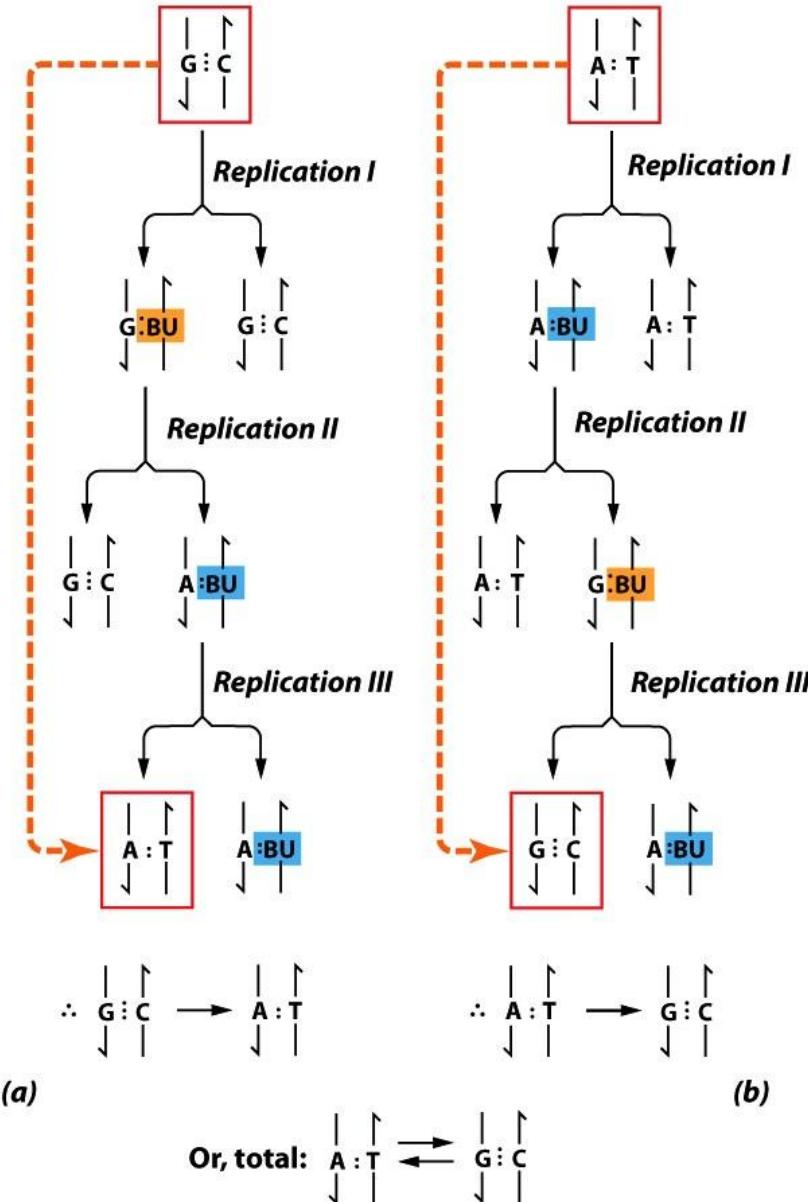


Mutagénný účinok 5-bromouracilu

Effect of enol form of 5-bromouracil during:

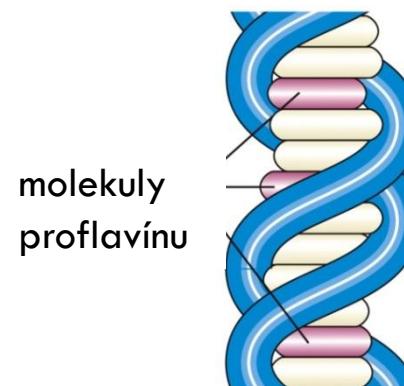
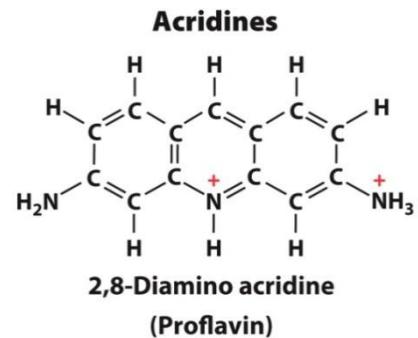
Incorporation

Replication after incorporation

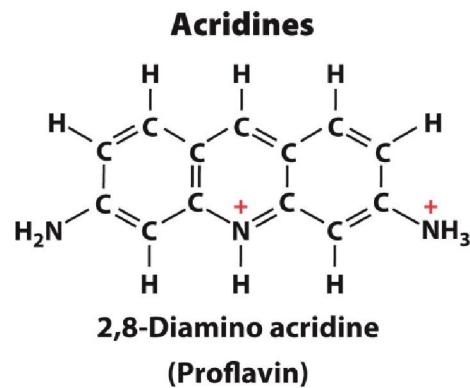


Chemické mutagény

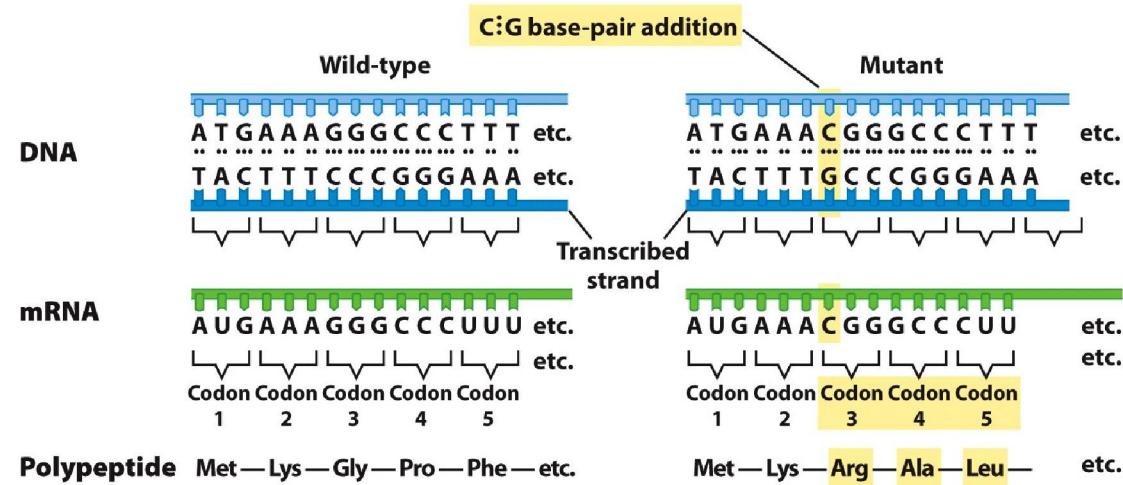
- interkalačné činidlá



Interkalácia akridínových farbív spôsobuje frameshift mutácie



Insertions or deletions of one or two base pairs alter the reading frame of the gene distal to the site of the mutation.

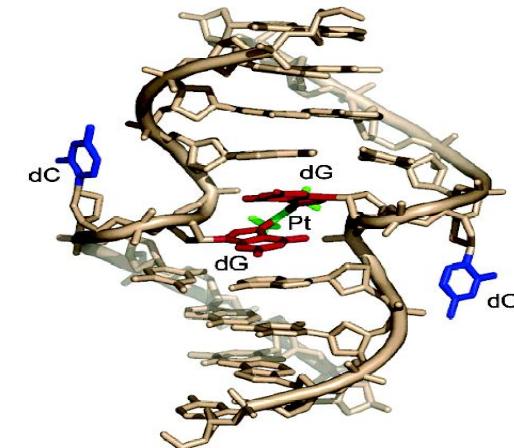


Interkalačné činidlá - látky, ktoré sa štruktúrne podobajú nukleotidom, včleňujú sa medzi dva páry zásad, čím sa predlžuje molekula DNA → delécia alebo adícia nukleotidov, posunové mutácie.
- Akridín oranž, proflavín, etídium bromid (používajú sa v laboratóriách ako farbivá a mutagény)

Chemické mutagény

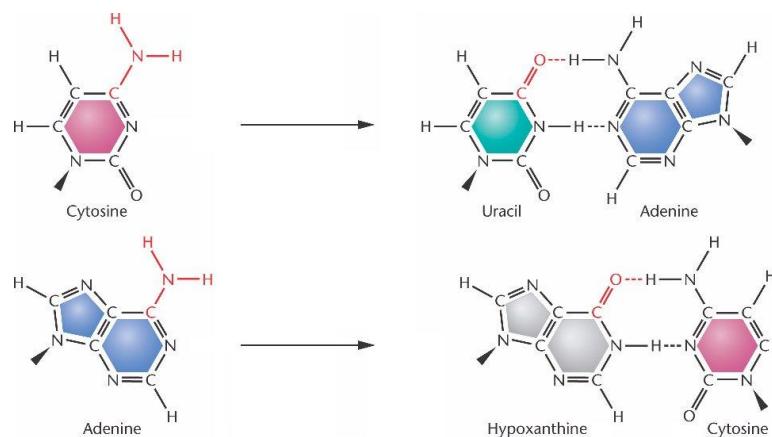
- látky, ktoré vytvárajú
ret'azcové väzby

cis-platina - cytostatikum



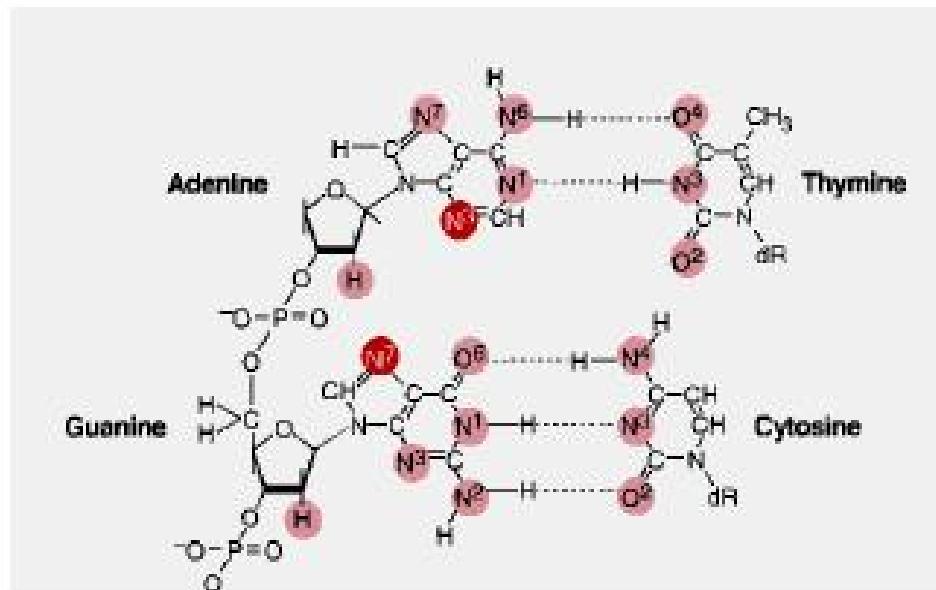
- látky, ktoré chemicky menia DNA

kyselina dusitá
spôsobuje oxidačnú
deamináciu báz



Chemické mutagény – alkylačné látky

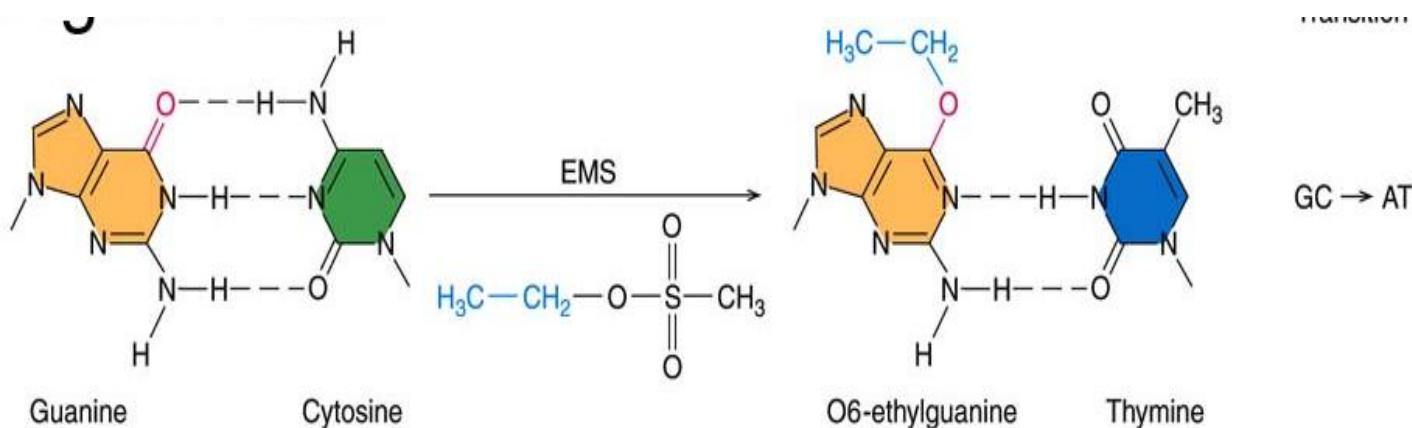
- silné elektrofily – reagujú s nukleofilnými centrami na molekule DNA (N, O, P, S)
- tvorba kovalentnej väzby



Chemické mutagény – alkylačné látky

Najzávažnejšie alkylácie: O6 pozícia guanínu, O4 pozícia tymínu

- mutácie typu záměny báz



Biologické mutagény

- Mobilné genetické elementy – 40. roky 20. stor., Barbara Mc Clintock u kukurice spôsobujú inzercie, delécie a translokácie



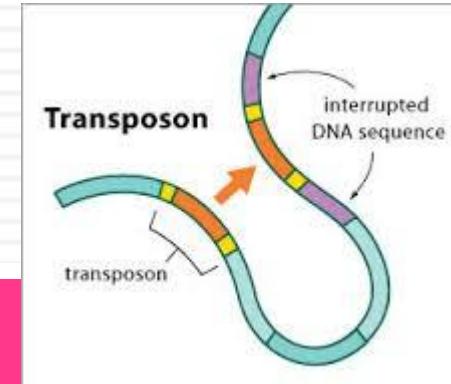
- Vírusy



B. Mc Clintock (1902-1992) 1983
Nobelova cena za objav mobilných genetických elementov

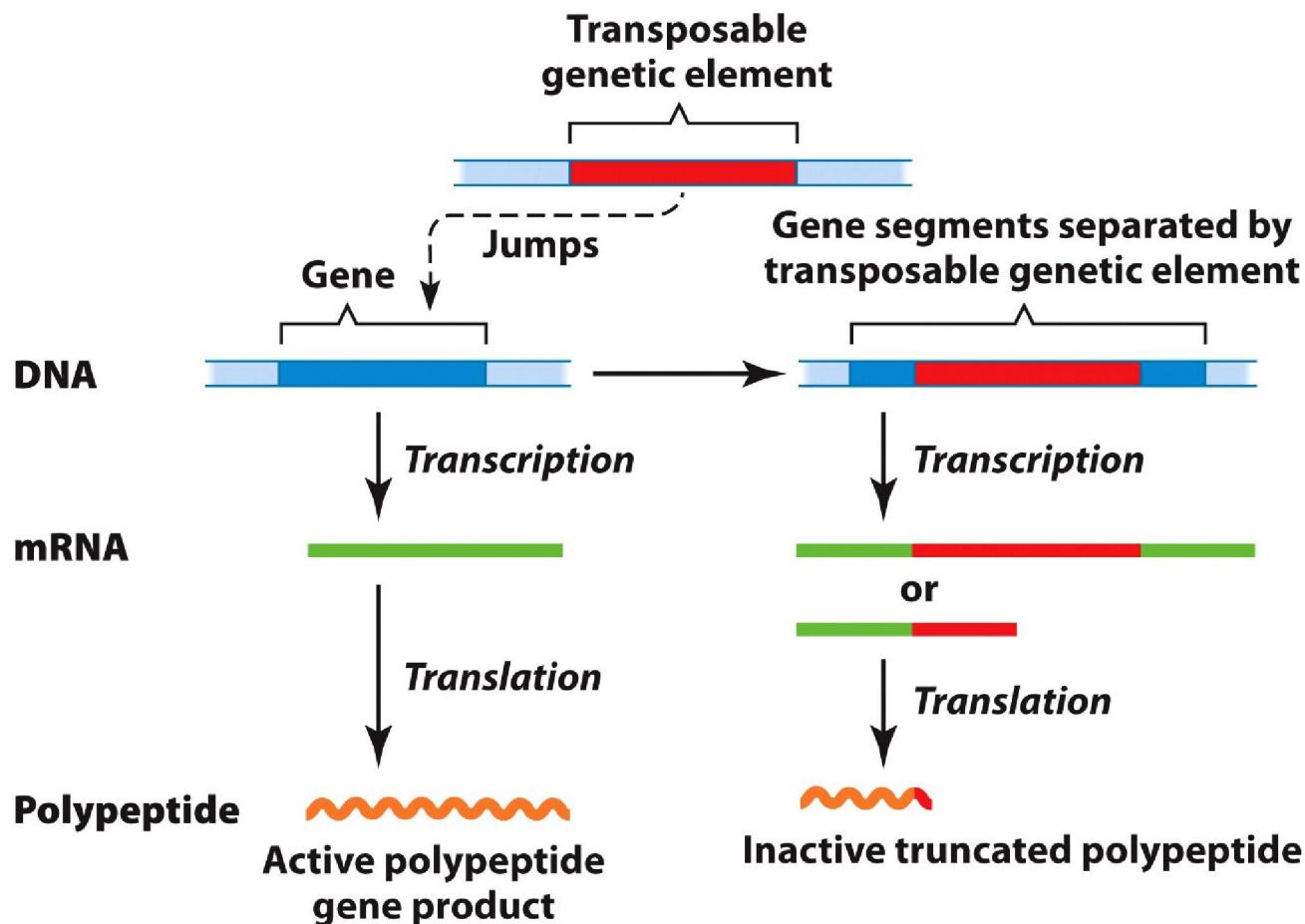


Transpozóny

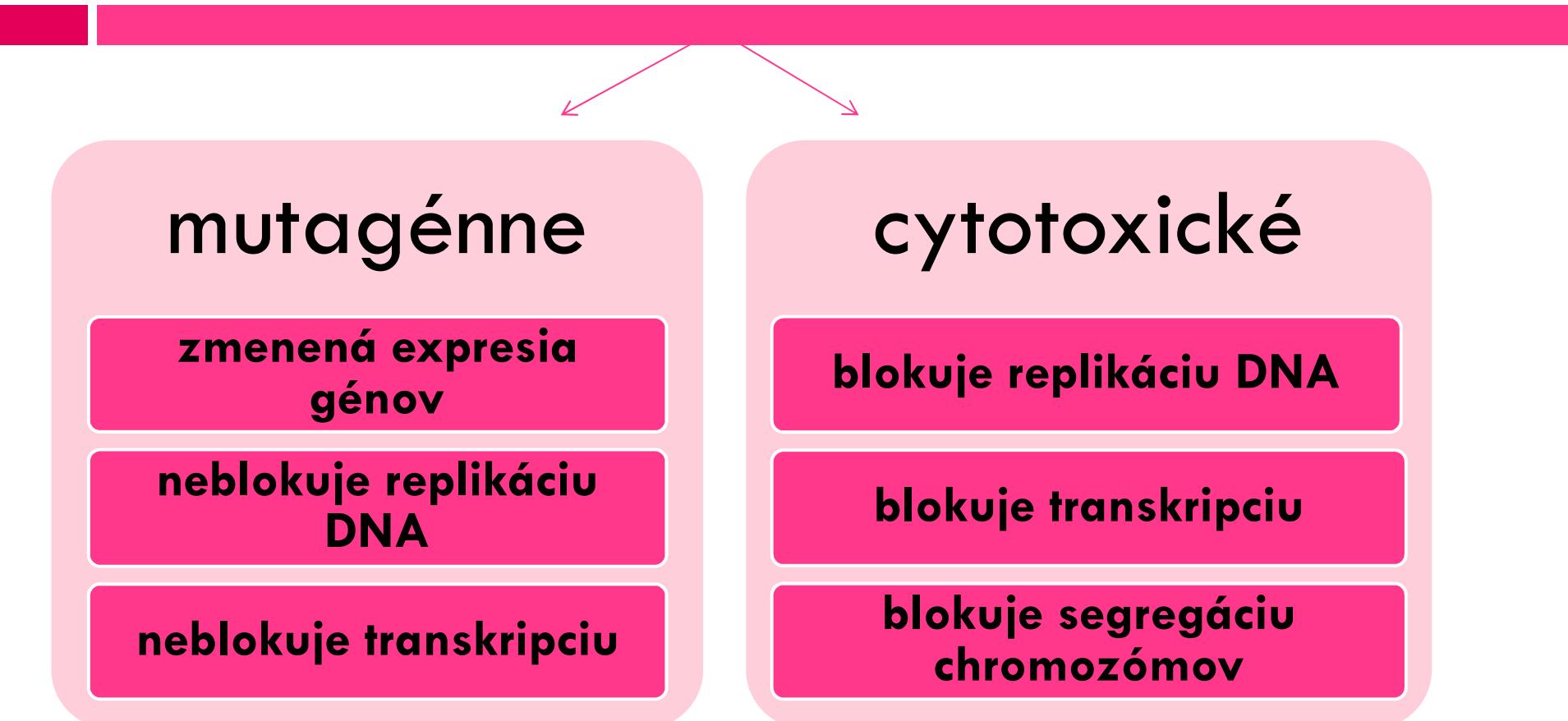


- Úseky DNA, ktoré sú schopné pohybovať sa na rôzne miesta v genóme bunky
- účinok závisí od miesta inzercie, transpozón môže prerušiť alebo zmeniť expresiu génov hostiteľa,
- u drozofily 50-85% mutácií spôsobených inzerciou transpozónov

Biologické mutagény - mutácie indukované transpozónmi



Typy poškodenia DNA



presnosť replikácie ↓

mutácie ↑

karcinogenéza↑

zastavenie delenia

smrť bunky

starnutie

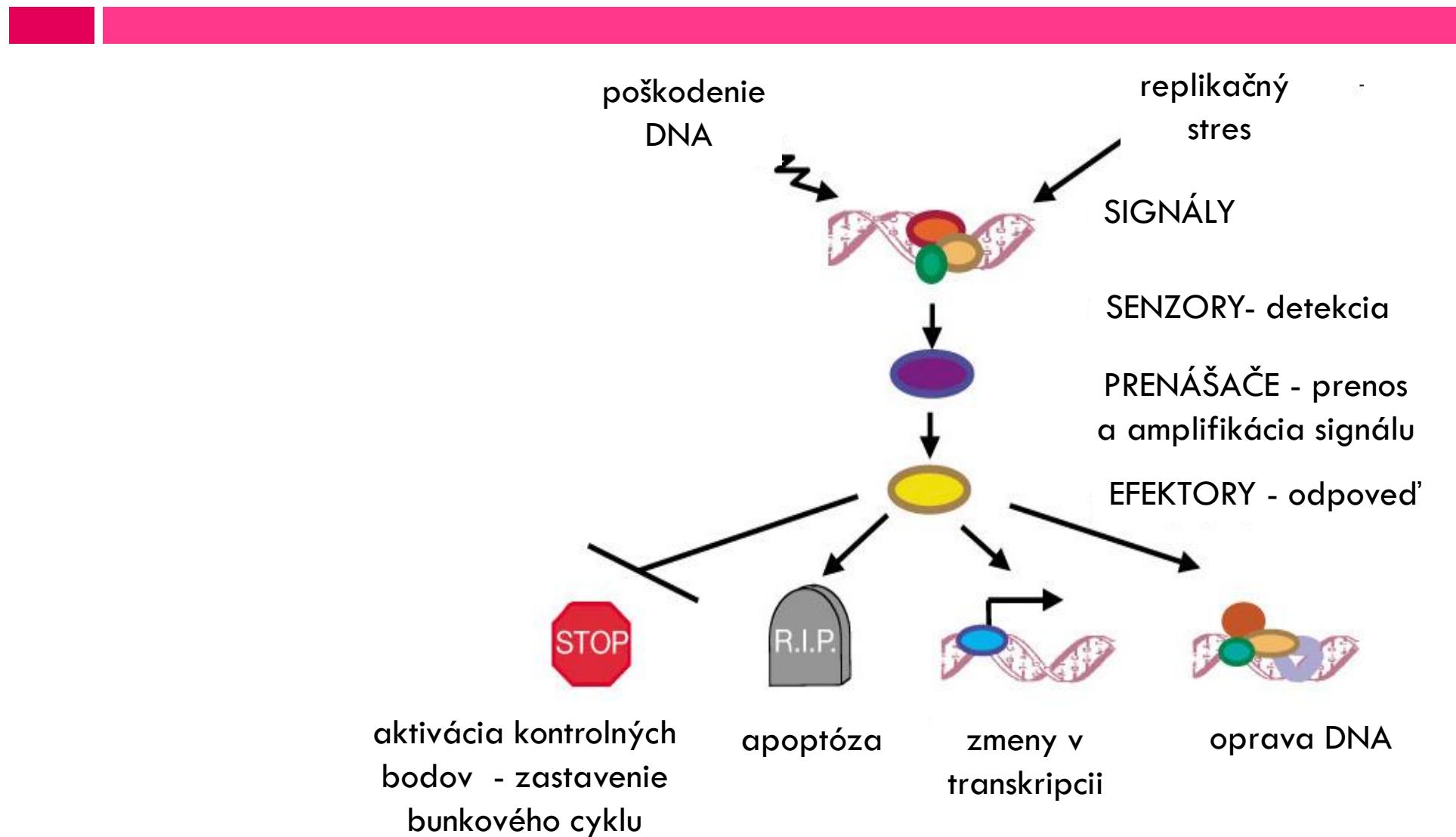
Potreba eliminácie DNA poškodení

V bunke vznikne každý deň 10000 - 20000 ($1-2 \times 10^4$) poškodení DNA .

V ľudskom tele (10^{12} buniek) treba denne opraviť približne **1 000 000 000 000 000** DNA poškodení ($1 \times 10^{16} - 10^{18}$).

Napriek tomu, že bunka má mechanizmy na elimináciu takýchto poškodení, niektoré z nich nie sú opravené , čoho dôsledkom dochádza k vzniku mutácií, starnutiu a rôznym ochoreniam, vrátane karcinogenézy a neurodegenerácie.

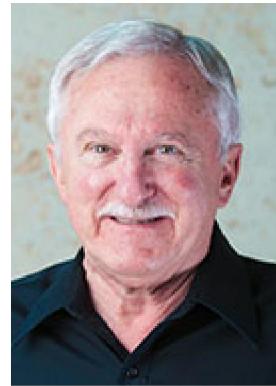
Odpoveď bunky na poškodenie DNA



Reparačné mechanizmy DNA



Tomas Lindahl



Paul Modrich



Aziz Sancar



Nobelova cena za chémiu 2015 za „*mechanistic studies of DNA repair*“.

Reparačné mechanizmy DNA

- Organizmy majú mnoho enzýmov, ktoré monitorujú prítomnosť poškodenia v ich DNA a v prípade poškodenia iniciujú opravné procesy.
- Evolučná konzervovanosť opravných procesov.

1. Jednokrokové opravné procesy

- Na svetle závislá oprava (fotoreaktivácia)
- Oprava alkylovaných báz pomocou alkyltransferáz



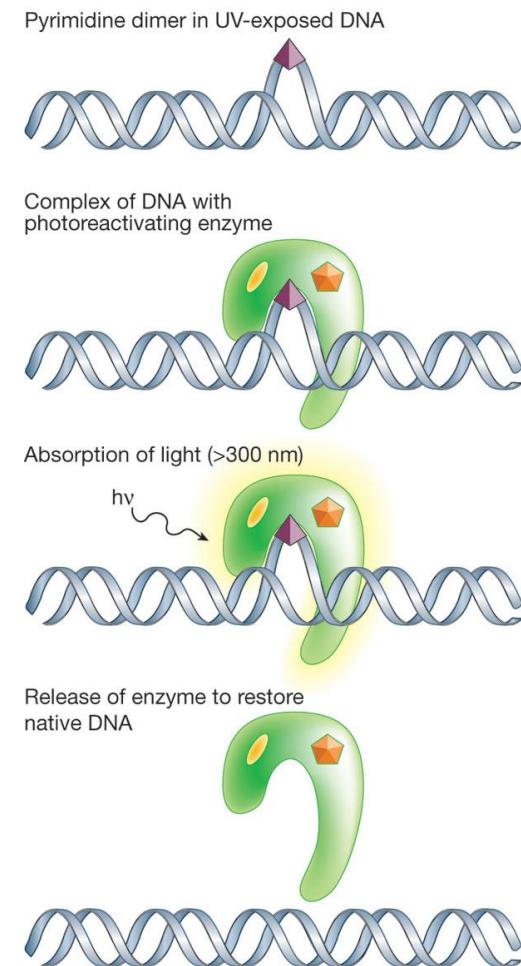
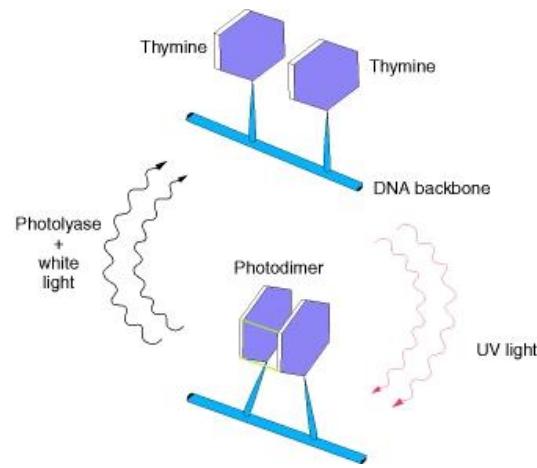
2. Viackrokové opravné procesy

- Excízna oprava
- Oprava chybne spárovaných báz - mismatch oprava
- Postreplikačná oprava
- Translézna syntéza (SOS odpoved')



Fotoreaktivácia

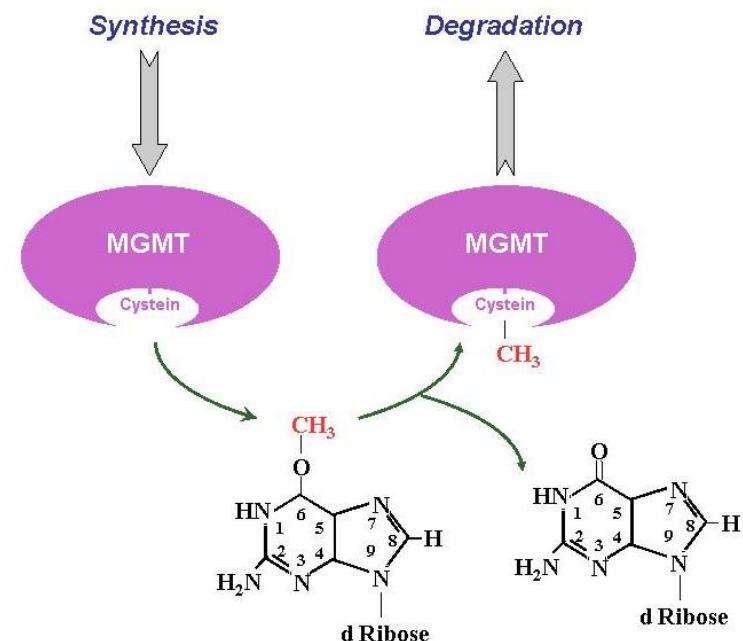
enzým fotolyáza
štiepi pyrimidínové
diméry — oprava cez foto-
indukovaný prenos elektrónov



Oprava alkylovaných báz

Alkyltransferáza (O^6 methylguanín DNA methyltransferáza, MGMT) prenáša alkyl skupinu na cysteínový zvyšok vlastnej molekuly

- u *E.coli* (adaptívna odpoved' – *ada*, *aidB*, *alkA*, *alkB*), kvasiniek, hmyzu, rýb, cicavcov
- Doteraz nebola dokázaná u rastlín
- V našom laboratóriu – prvýkrát dôkaz alkyltransferázy u fotoautotrofného organizmu u *C. reinhardtii*



2 gény u *E.coli*:

- **ADA gén** – inducibilný, 39 kDa proteín
- **OGT gén** – konštitutívny, 19 kDa,

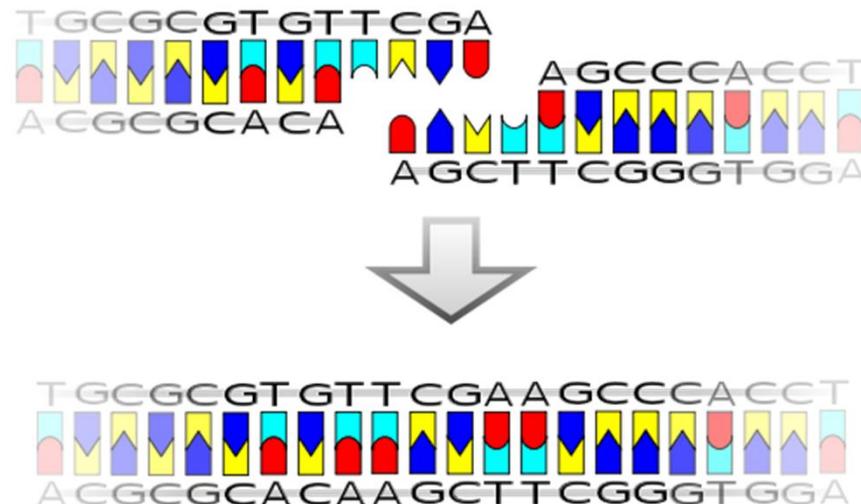
Iné jednokrokové opravné dráhy

Oprava spórových fotoproduktov

- V spórach *B. subtilis* po UV vznik spórových fotoproduktov (A konformácia DNA)
- Produkt *spl* génu – fotoreverzia poškodenia – homológia s DNA fotolyázami baktérií a húb

Ligácia zlomov

- ▶ Ak dôjde k zlomu, DNA ligáza v jednom kroku zlom spojí a obnoví integritu DNA



Viackrokové opravné procesy

Excízna oprava

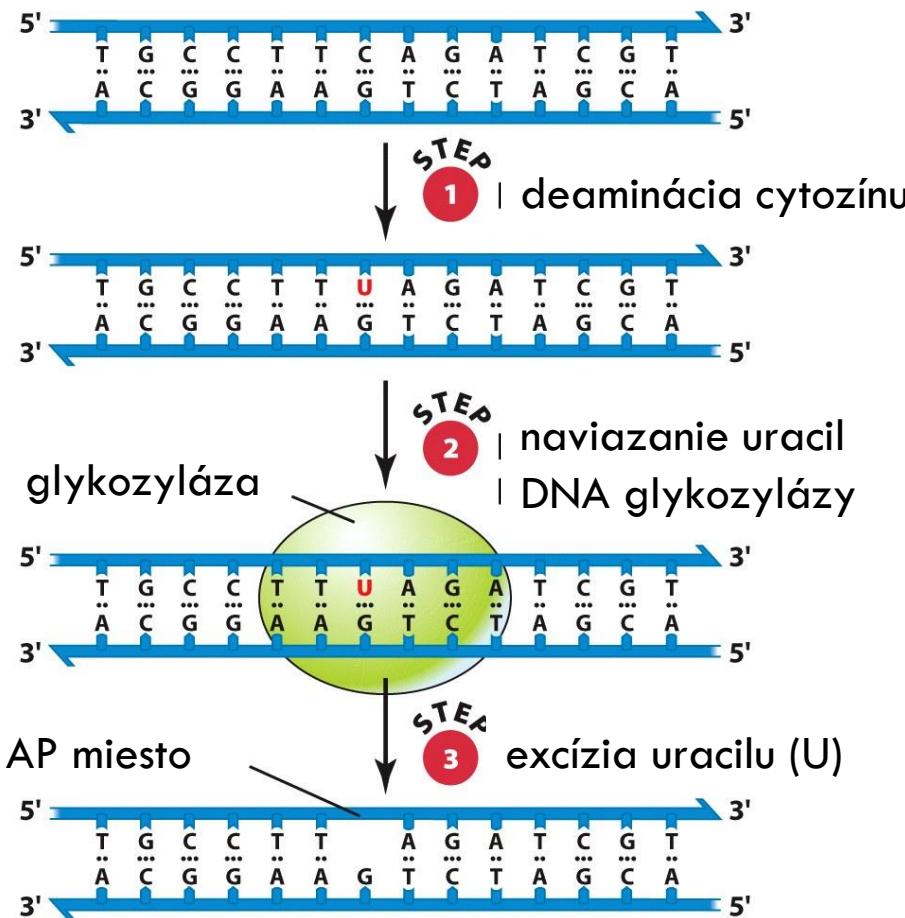
- Bázová excízna oprava
- Nukleotidová excízna oprava
- Oprava chybne spárovaných báz - *mismatch* oprava

Tolerancia poškodenia

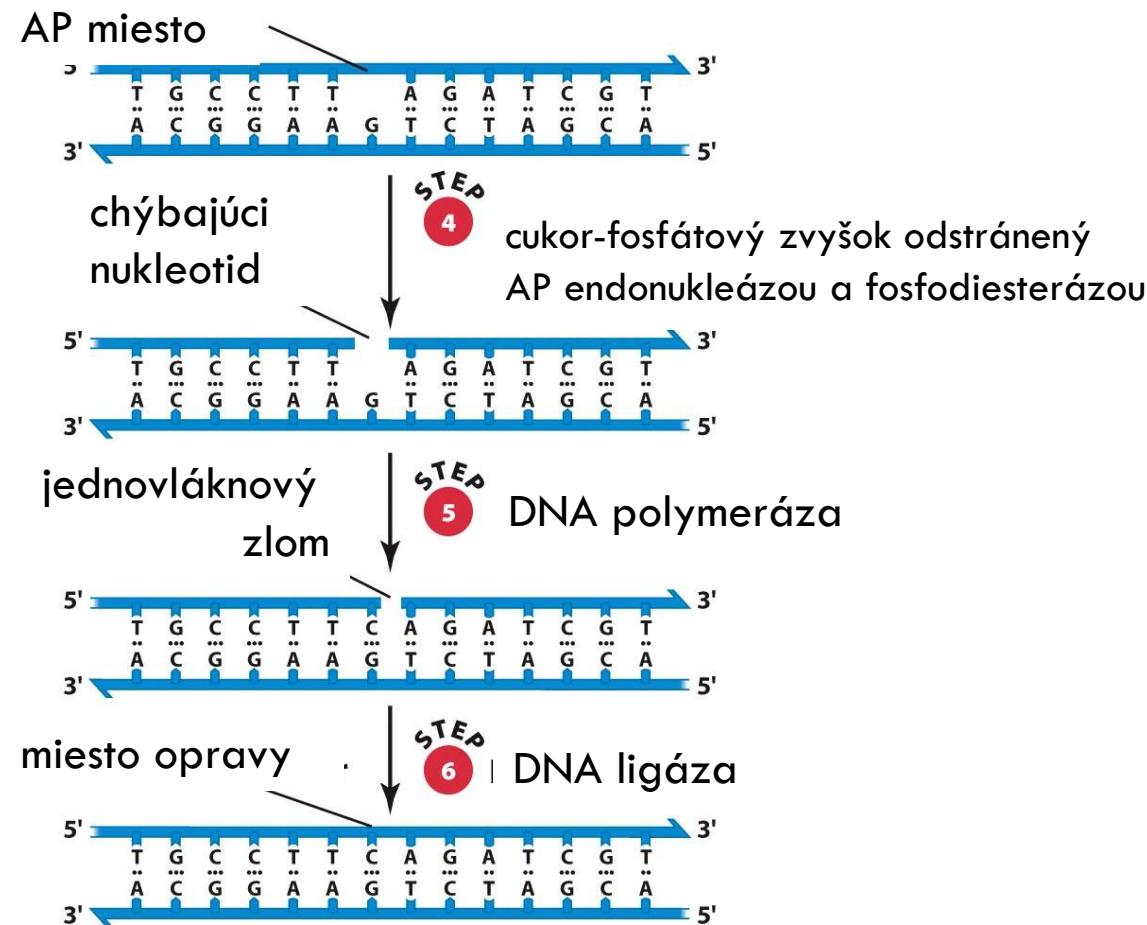
- Postreplikačná oprava
- Translézna syntéza (SOS odpoved')



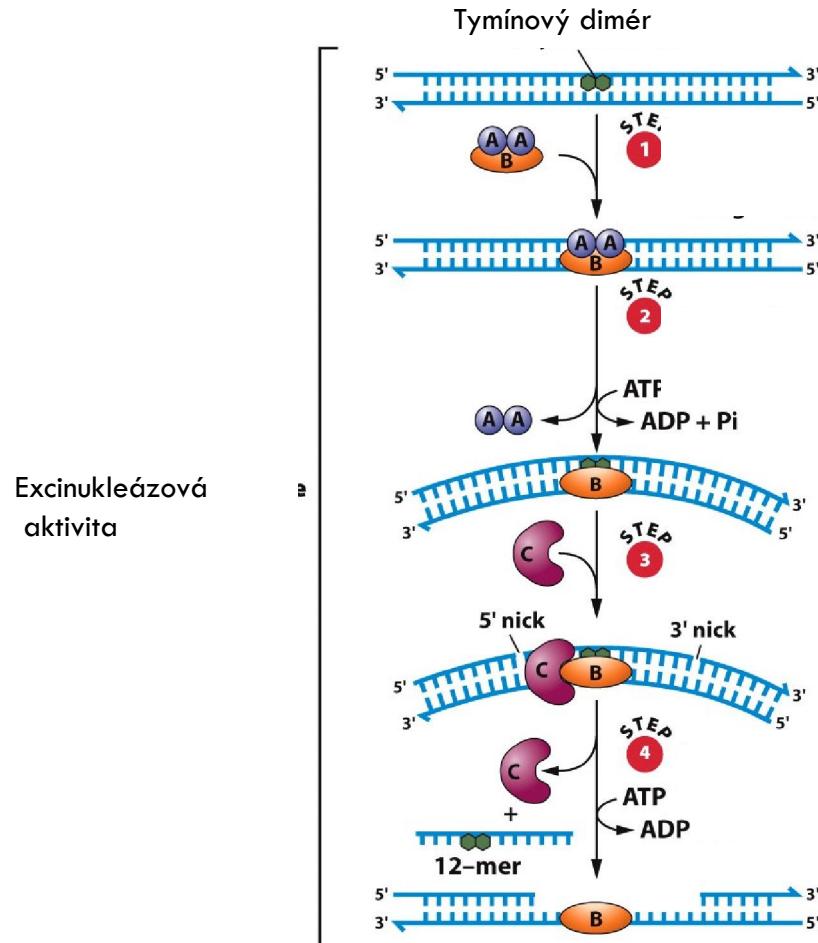
Bázová excízna oprava



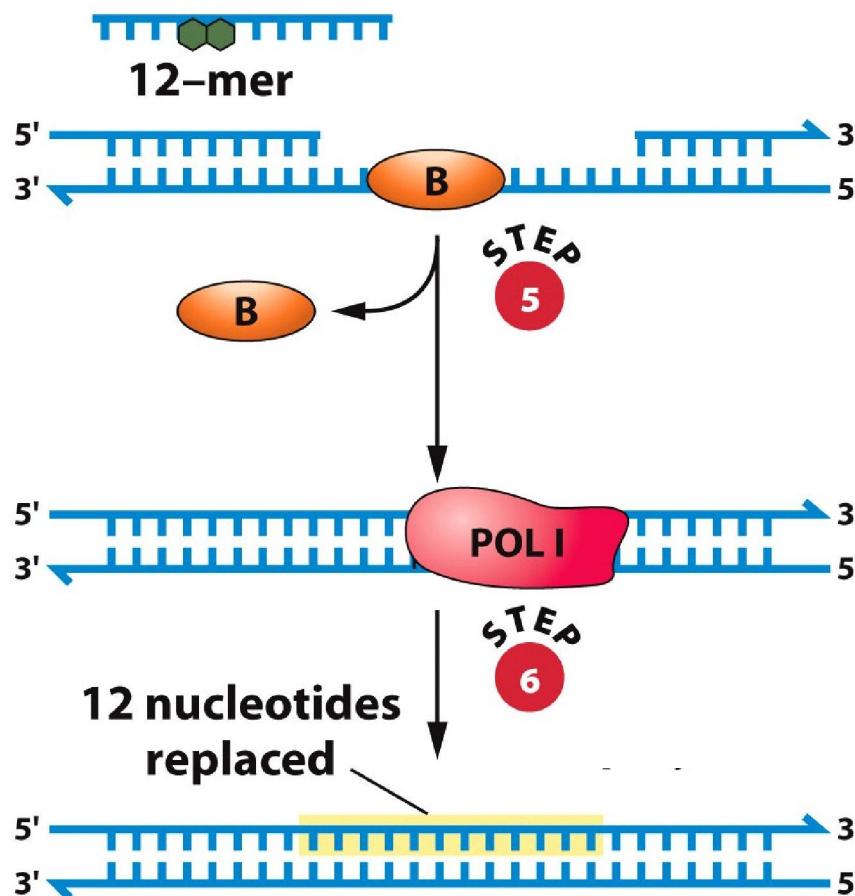
Bázová excízna oprava



Nukleotidová excízna oprava



Nukleotidová excízna oprava



Dôsledky porúch NER u ľudí



Xeroderma Pigmentosum (XP)

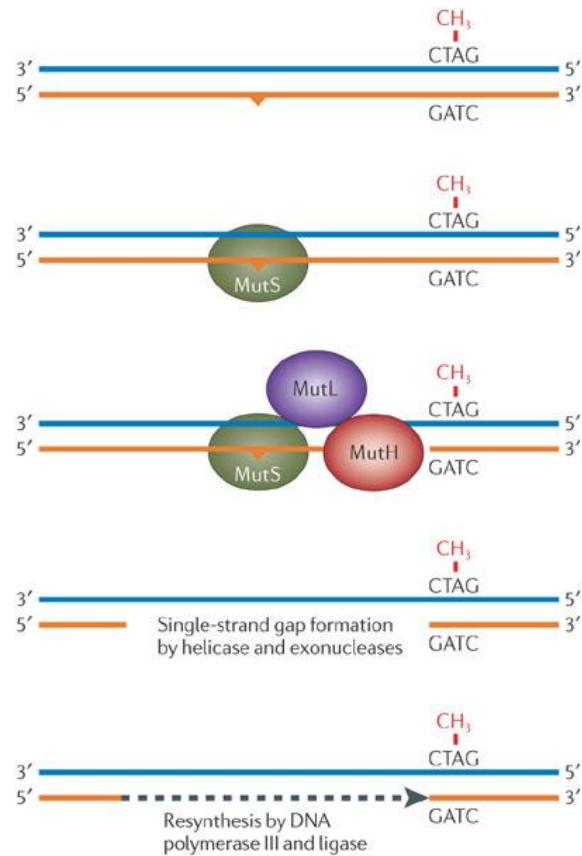
- UV senzitivita
- nízky vzrast
- neurologické abnormality
- častá rakovina



Cockaynov syndróm (CS)

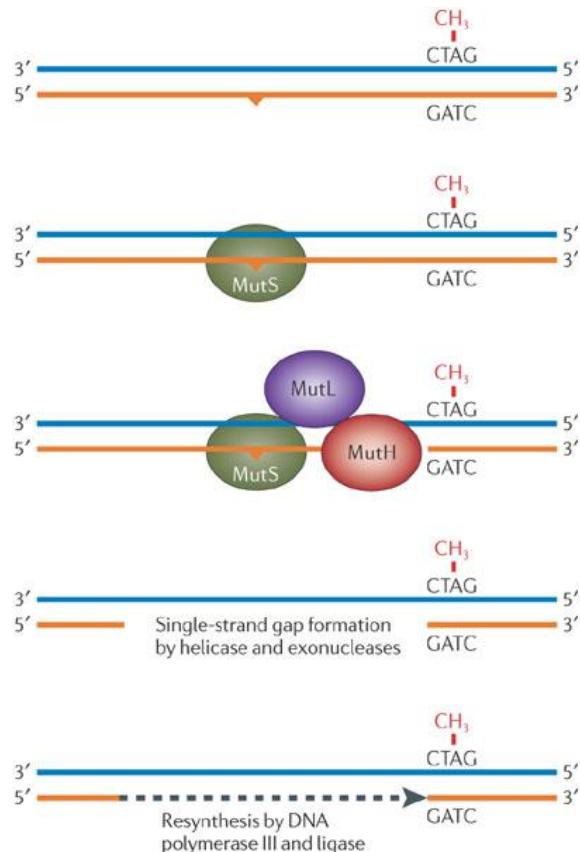
- UV senzitivita
- mentálna retardácia
- neurologické a vývinové poruchy
- predčasné starnutie

Postreplikačná mismatch oprava



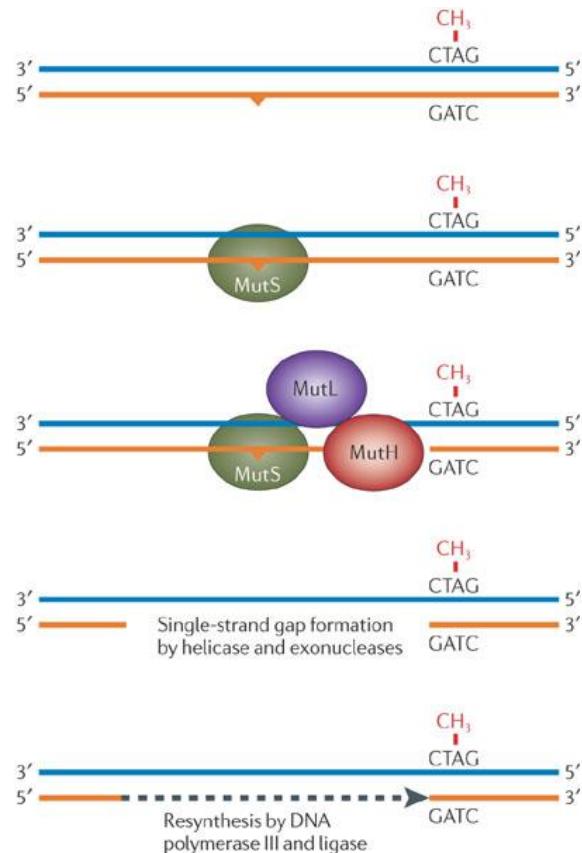
- Oprava chybne spárovaných báz
- A je po replikácii v sekvenciach GATC metylovaný
- V novosyntetizovanej DNA je teda rodičovský reťazec metylovaný, zatiaľčo novosyntetizovaný reťazec nie je metylovaný. Tento mechanizmus umožňuje odlíšiť nový reťazec od starého.
- Chybne spárovaný nukleotid je vyštiepený z novosyntetizovaného reťazca a nahradený príslušným nukleotidom na základe komplementarity s pôvodným reťazcom.

Postreplikačná mismatch oprava

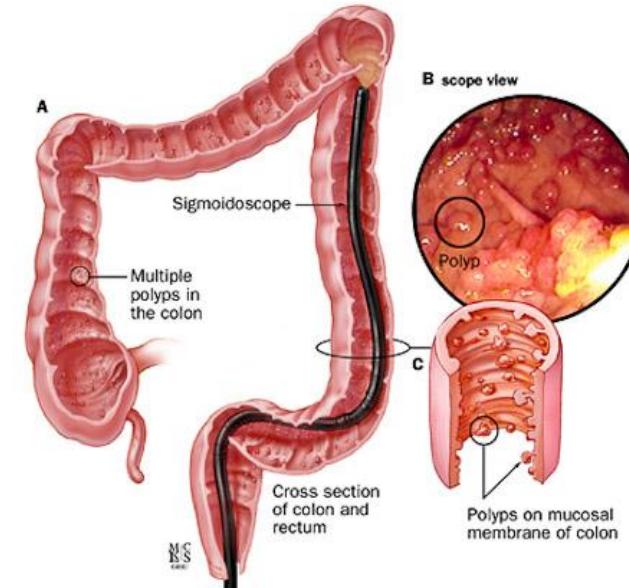


- **Proteín MutS** rozoznáva chybne spárované bázy a naviaže sa na ne, čím iniciuje opravný proces.
- **MutH** a **MutL** sa pripoja k tomuto komplexu.
- **MutH** štiepi nemetylovaný reťazec v sekvenciach GATC po oboch stranách chybne spárovanej bázy.
- Excízia vyžaduje **MutS**, **MutL**, **MutU** (DNA helikáza II) a **exonukleázu**.
- **DNA polymeráza III** zaplní medzeru a **DNA ligáza** spojí zlomy.

Postreplikačná mismatch oprava



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Microbiology

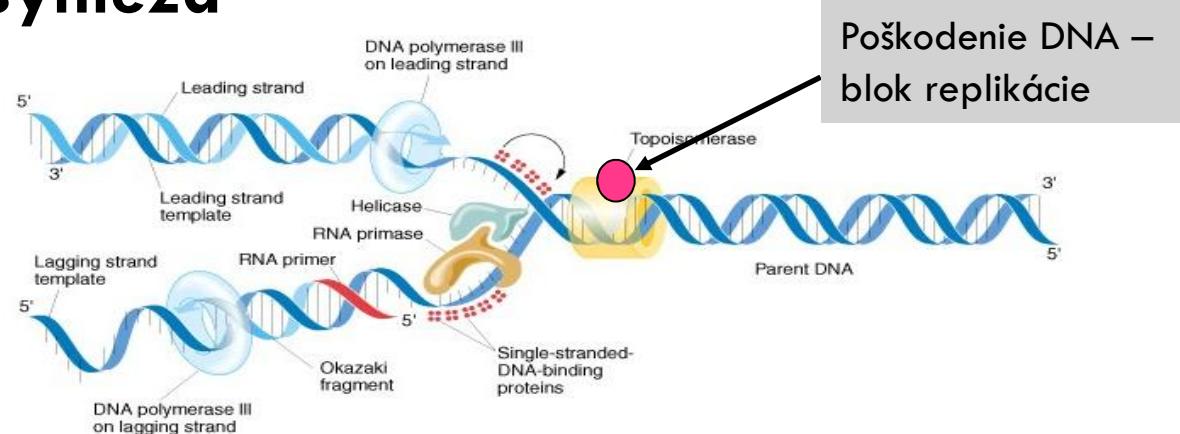


Hereditárny nonpolypózny
kolorektálny karcinóm

Tolerancia poškodenia

- Také mechanizmy, pri ktorých dôjde k uvoľneniu zastavenej replikácie
- Výsledkom teda nie je odstránenie poškodenia

- Rekombinačná oprava
- Translézna syntéza



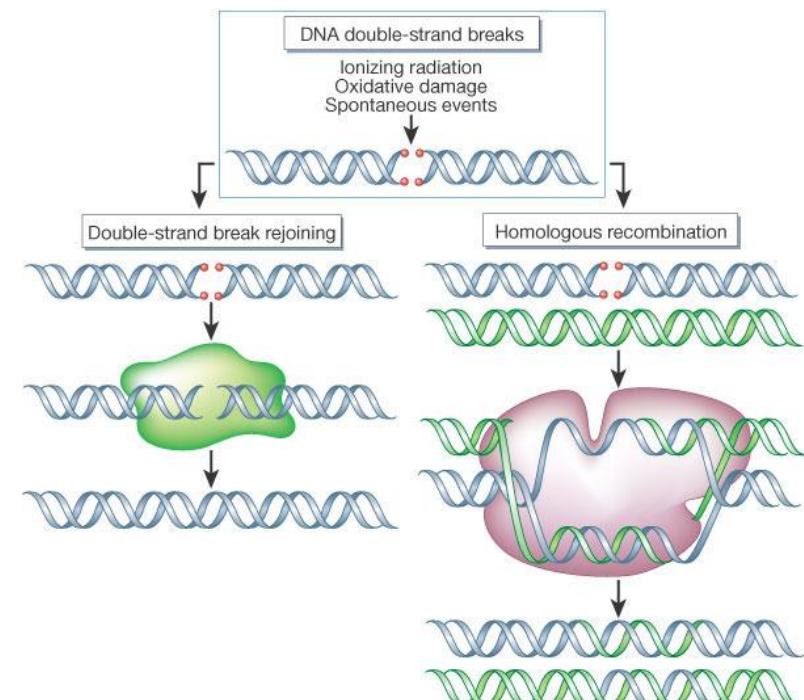
Rekombinačná oprava

□ Vyhľadávanie a oprava dvojvláknových zlomov

2 dráhy:

□ Homologická rekombinácia (HR) – u baktérií, jednoduchých eukaryotov (kvasinky)

□ Spájanie nehomologických koncov (NHEJ)

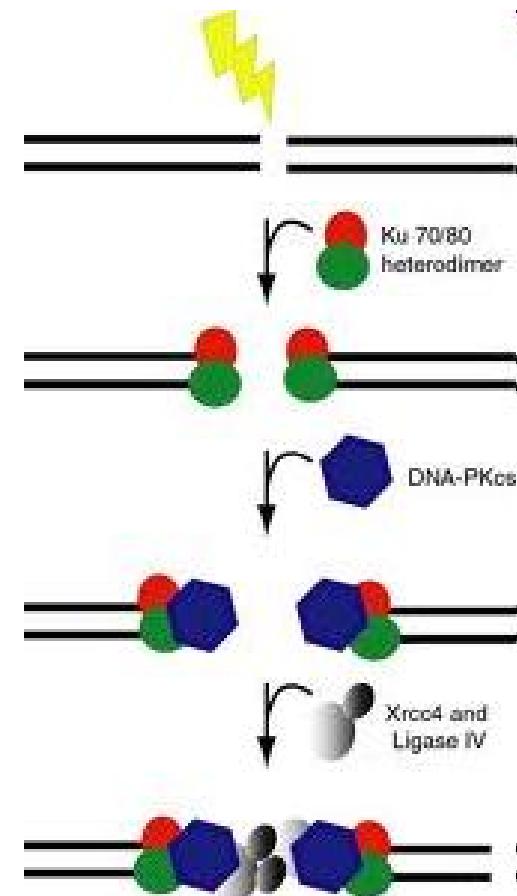


http://www.nature.com/nature/journal/v421/n6921/fig_tab/nature01408_F3.html

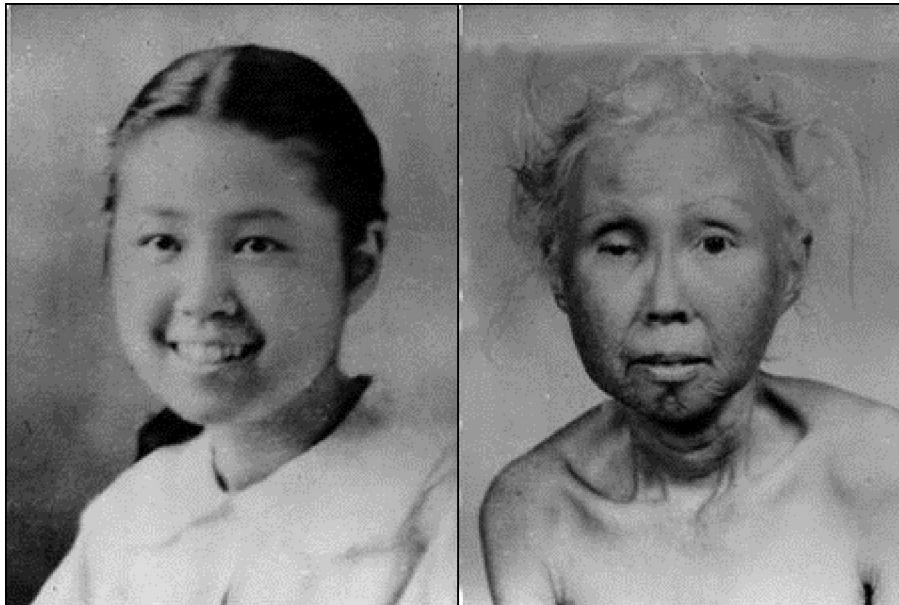
Nehomologické spájanie koncov

Error prone systém.

Dôležitú úlohu hrajú proteíny Ku70 a Ku80 – zodpovedajú za rozpoznanie poškodenia a chránia DNA pred exonukleázami.



Dôsledky porúch v rekombinačnej opravy u ľudí



WS patient age 15 yrs

WS patient age 48 yrs



Wernerov syndróm

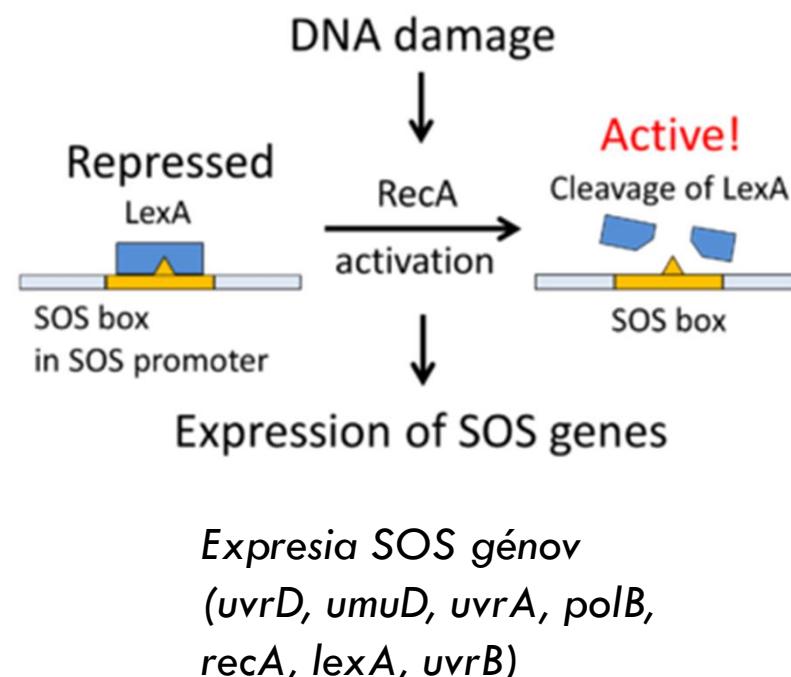
- chromozómová instabilita
- predčasné starnutie

Bloomov syndróm

- chromozómová instabilita
- porucha rastu

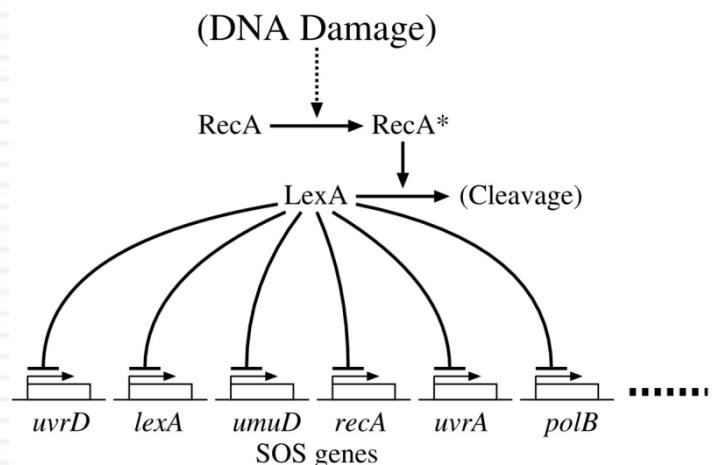
Indukcia SOS odpovede

- Ak je poškodenie DNA veľmi závažné, aktivuje sa tzv. SOS odpoved', ktorá využíva mnoho DNA opravných, rekombinačných a replikačných proteínov.
- Error-prone systém.
- Dva klúčové proteíny - LexA a RecA
- LexA (represor) reguluje transkripciu génov zahrnutých v SOS oprave a udržiava ich expresiu na veľmi nízkej úrovni
- Ak sa vyskytne závažné poškodenie DNA, RecA sa viaže na jednovláknové oblasti DNA v poškodených miestach.
- Väzba RecA s DNA stimuluje vlastnú inaktiváciu LexA. Po inaktivácii LexA sú exprimované gény SOS odpovede (*umuC, umuD* – podjednotky DNA polymerázy V).



Indukcia SOS odpovede

- Dva kľúčové proteíny - LexA a RecA
- Za normálnych podmienok (ak nie je prítomné poškodenie DNA), LexA (represor) sa viaže na oblasti DNA, ktoré regulujú transkripciu génov zahrnutých v SOS oprave a udržiava ich expresiu na veľmi nízkej úrovni.
- Ak sa vyskytne závažné poškodenie DNA, RecA sa viaže na jednovlákновé oblasti DNA v poškodených miestach.
- Väzba RecA s DNA stimuluje vlastnú inaktiváciu LexA. Po inaktivácii LexA sú exprimované gény SOS odpovede (*umuC*, *umuD* – podjednotky DNA polymerázy V).



Záver

Základné vlastnosti genetického materiálu:

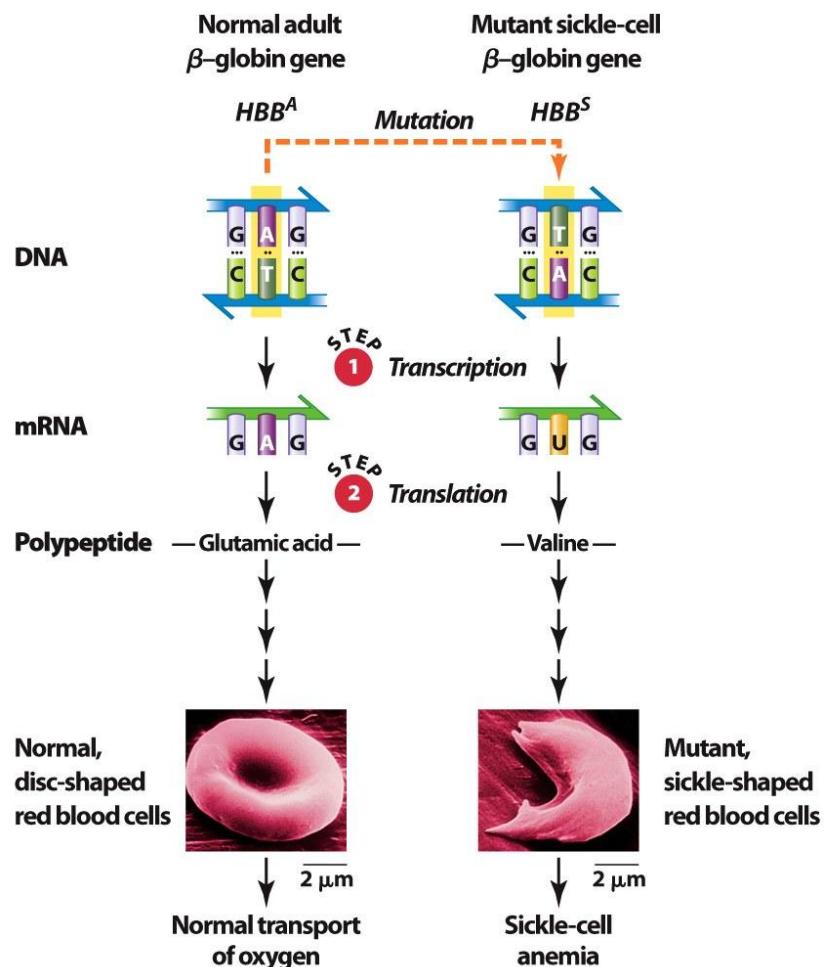
- Musí byť schopný replikácie
- Musí obsahovať informáciu
- Musí byť schopný meniť sa.

Úloha reparačných mechanizmov - rovnováha medzi stabilitou a premenlivosťou genetickej informácie.

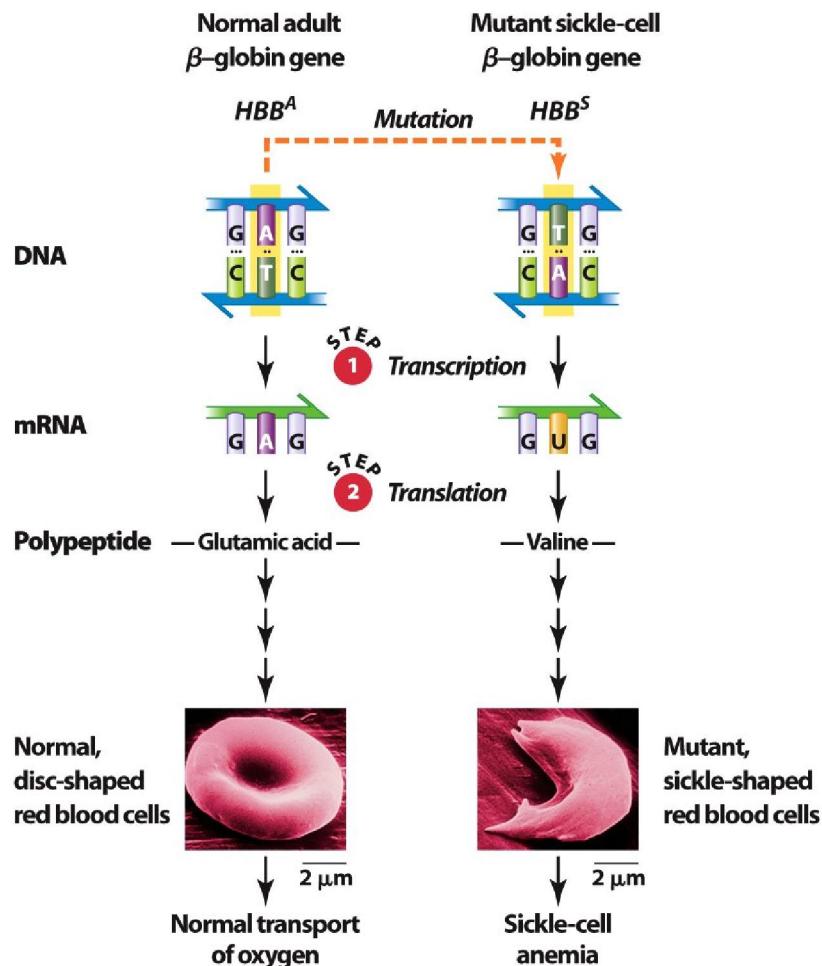
Porozumenie procesu opravy DNA poškodení.

Starnutie, liečba ochorení (rakovina, dedičné ochorenia....) .

Niekteré mutácie môžu poskytovať selekčnú výhodu



Niekteré mutácie môžu poskytovať selekčnú výhodu



© Snustad & Simmons, 2009

