

Molekulare Pathologie 1: Mutationen

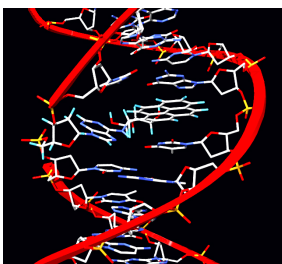
Peter N. Robinson

Institut für medizinische Genetik
Charité Universitätsmedizin Berlin

23. Juni 2008

Einfache Mutationen

- Mutationen in der DNA können durch eines der zahlreichen Mutagene in der Umwelt hervorgerufen werden
 - ▶ z.B. Mutationsrate der hypervariablen Minisatellitenloci war verdoppelt bei Menschen, die den radioaktiven Niederschlägen von Tschernobyl ausgesetzt waren
- Unter normalen Bedingungen rühren die meisten Mutationen jedoch von **endogenen** Effekten her, z.B: spontan auftretende Fehler bei der DNA-Replikation.



Benzopyren, ein Mutagen in Tabakrauch (Wikipedia)



Tschernobyl

Einfache Mutationen

- $\sim 10^{17}$ Zellteilungen im Leben eines Menschen
- Jede Zellteilung erfordert Neusynthese von 6×10^9 Nukleotiden
- Fehlerfreie DNA-Replikationen würde $\sim 10^{26}$ richtige Syntheseschritte erfordern ...
- Tatsächliche Genauigkeit der DNA-Polymerasen: Ein Replikationsfehler pro $10^9 - 10^{11}$ eingebauten Nukleotiden
- Gene: $\sim 1,5\%$ der DNA $\Rightarrow 1,65 \times 10^{-6} - 1,65 \times 10^{-8}$ Mutationen pro Gen pro Zellteilung
- Bei 10^{16} Mitose $\Rightarrow 10^8 - 10^{10}$ Mutationen pro Gen
- Schädliche Mutationen in somatischen Zellen bleiben meist ohne Folgen

Transversionen und Transitionen

- Transition:
 - ▶ Pyrimidin zu Pyrimidin: $C \leftrightarrow T$
 - ▶ Purin zu Purin : $A \leftrightarrow G$
- Transversion
 - ▶ Pyrimidin zu Purin $C \rightarrow A, C \rightarrow G$
 - ▶ Pyrimidin zu Purin $T \rightarrow A, T \rightarrow G$
 - ▶ Purin zu Pyrimidin $A \rightarrow C, A \rightarrow T$
 - ▶ Purin zu Pyrimidin $G \rightarrow C, G \rightarrow T$

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

Beobachtete Mutationen

- In der DNA entstehen wohl die meisten Mutationen rein zufällig
- Beim menschlichen Genom macht die kodierende DNA etwa 1,5%, die konservierte DNA insgesamt etwa 5% aus
- Die (für Krankheiten und Gesundheit) bedeutsamen Mutationen betreffen vermutlich vor allem diese Sequenzen, Mutationen in anderen Bereichen haben vermutlich wenig oder keine medizinische Bedeutung

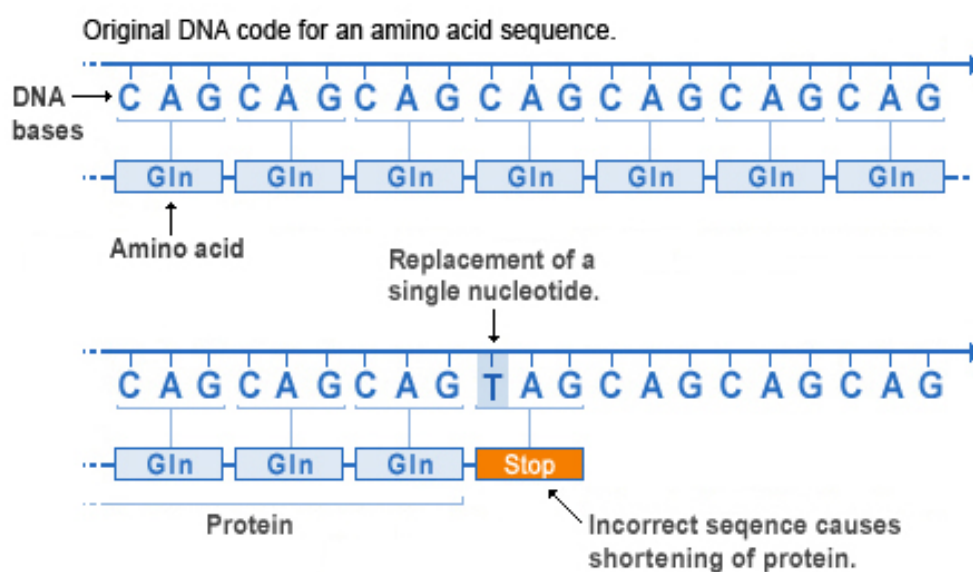
Synonyme (stille) Mutationen

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

Synonym = Keine Veränderung der Aminosäuresequenz

Nonsense Mutationen

Nonsense mutation



U.S. National Library of Medicine

US National Library of Medicine

- Vorzeitiger Abbruch der Translation
- Nonsense-vermittelter Abbau (NMD)

Nonsense-mediated decay

- Das NMD-System überwacht die mRNA und baut Transkripte ab, welche ein vorzeitiges Stoppcodon enthalten, um die Translation unnötiger bzw. aberranter Transkripte zu verhindern

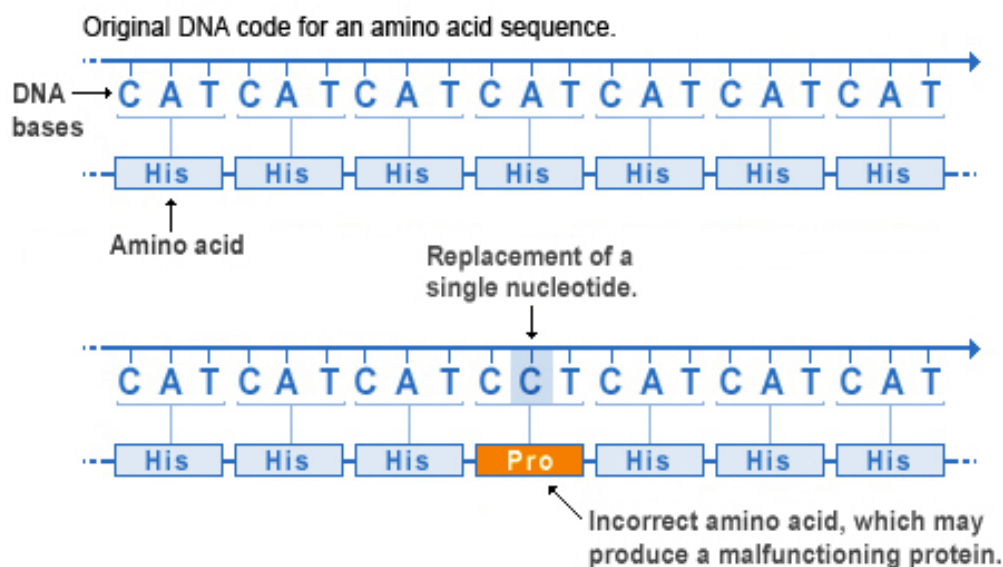
Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

exon-junction complex (EJC): "Marke" nach Entfernung eines Introns → Abbau von Transkripten mit Stoppcodon vor dem letzten Exon

Khajavi M et al (2006) *Eur J Hum Genet.* 14:1074–81

Missense Mutationen

Missense mutation



U.S. National Library of Medicine

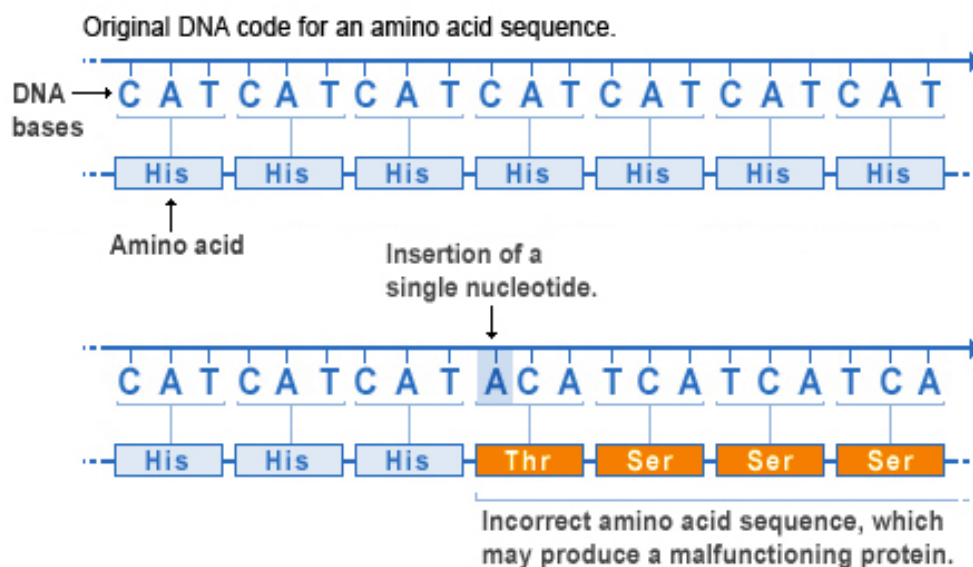
US National Library of Medicine

Missense Mutationen: Konservativ vs. Nichtkonservativ

- Durch eine konservative Substitution wird eine Aminosäure durch eine chemisch ähnliche Aminosäure ersetzt
- Der genetische Code hat sich offenbar so entwickelt, dass der Effekt von Basensubstitutionen häufig eine konservative Aminosäuresubstitution ist

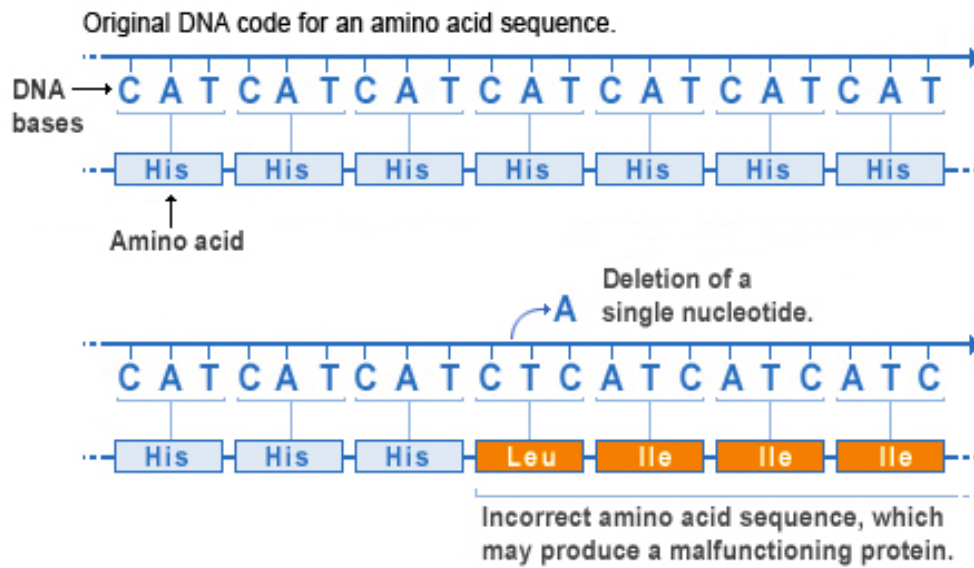
Insertionen

Insertion mutation



Deletionen

Deletion mutation



U.S. National Library of Medicine

US National Library of Medicine

Punktmutationen

Wildtyp

MAX HOL MIR EIN EIS

Substitution

"Konservativ"

MAX HOL DIR EIN EIS

"Nichtkonservativ"

MAX HOL MIR EIN EFS

Deletion

1 bp

MAX HOM IRE INE IS

3 bp

MAX HOL EIN EIS

Insertion

1 bp

MAX HOL ADI REI NEI S

a) heterozygote Mutation

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

b) Insertion einer einzelnen Base (3659delC)

Sequenzkonservierung

- Neutrale Substitutionsrate beim Menschen von ca. 2×10^{-9} pro Position und Jahr
- Diese Substitutionsrate gilt z.B. für die "Wobble"-Positionen der Codons und in vielen nichtkodierenden Sequenzen
- Eine geringere Divergenz zwischen z.B. Mensch und Maus deutet auf eine negative Selektion hin

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

- Mutationsrate von Mikrosatellitenloci ca. 10^{-4} pro Locus/Generation
- Fehlpaarung von gegeneinander verschobenen DNA-Strängen (slipped strand mispairing)

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

blau: Ursprüngliche DNA

rot: die neu synthetisierte DNA

Homologe Rekombination

- Austausch zwischen identischen Sequenzen während der Meiose bei einem Paar homologer Chromosomen
- Der Austausch ist normalerweise ausgeglichen: Spaltung und Neuverknüpfung erfolgen an der gleichen Position

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

Ungleiches Crossing-over

- Eine Form nichtalleler homologer Rekombination
- Crossing-over zwischen nichtallelen Sequenzen auf Nichtschwesterchromatiden von einem Paar homologer Chromosomen

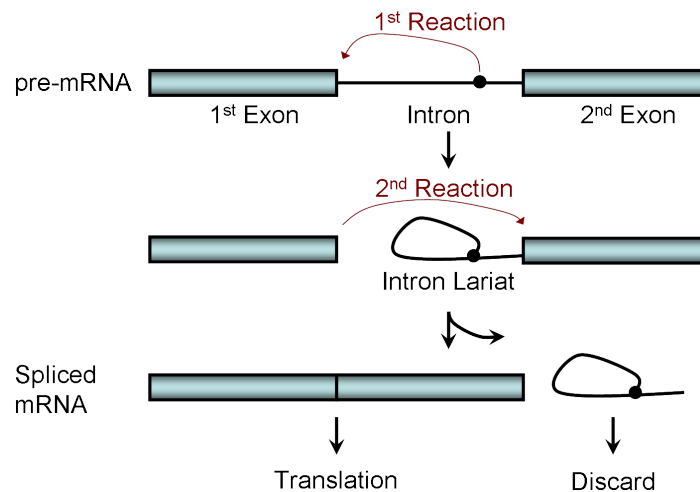
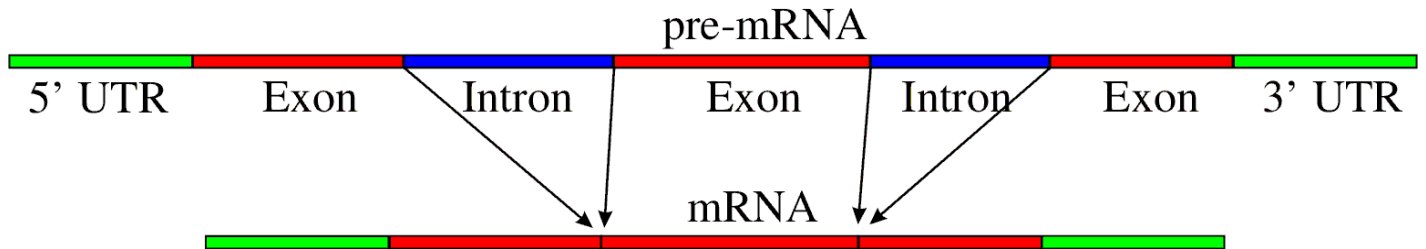
Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

Genkonversion

- Nicht reziproker Austausch
- Starke Homologie zw. nicht allelen Sequenzen
- Heteroduplexbildung → Fehlpaarungsreparatur beim Akzeptor

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

RNA-Speißen



Wikipedia

- GT-AG-Regel

Exon-Skipping vs. Intronretention

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

Aktivierung einer kryptischen Spleißstelle

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

Beispiel: Aktivierung einer kryptischen Spleißstelle

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

- "Stille" Mutation: GGC = Gly, GGC = Gly
- Durch die Mutation wird jedoch eine kryptische Spleißstelle aktiviert, die Spleißreaktion verläuft fehlerhaft
- Eine der bei der Gliedergürtel-Muskeldystrophie Typ 2A nachgewiesenen Mutationen

Beispiel: Aktivierung einer kryptischen Spleißstelle

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

- Aktivierung einer kryptischen Spleißstelle innerhalb eines Introns

Kurze repeats und indels

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

- Kurze tandemartige Wiederholungssequenzen sind für Deletionen/Insertionen besonders anfällig

Kurze repeats und indels

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

- Die Randbereiche vieler pathogener Deletionen im mitochondrialen Genom sind durch kurze, direkt repetitive Sequenzen gekennzeichnet (z.B: Kearns-Sayre-Syndrom).
- Die Deletionen sind wahrscheinlich auf eine Fehlpaarung gegeneinander verschobener DNA-Stränge zurückzuführen

Instabile Verlängerungen von tandem-repeats

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

- Morbus Huntington resultiert von einer Expansion einer CAG-Triplett-Wiederholung von 10–26 bis > 36 mit einer entsprechenden Expansion der Polyglutaminsequenz (Q=CAG) im Protein Huntingtin

Instabile Verlängerungen von tandem-repeats

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

- Fragiles X-Syndrom
- Expansion von CGG-Sequenzen in der 5'-UTR mit Inaktivierung der Promoteraktivität

Instabile Verlängerungen von tandem-repeats

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

- Fragiles X-Syndrom
- Schweregrad der Erkrankung korreliert mit der Anzahl der CGG-Repeats

Instabile Verlängerungen von tandem-repeats

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

- Zahlreiche Repeatexpansionserkrankungen
- Die meisten betreffen vorwiegend das Nervensystem

”Genomische Krankheiten”

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

- Low-copy-repeats mit $> 97\%$ Sequenzidentität
- Smith-Magenis-Syndrom-Region

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

- NAHR: Nichtallelische homologe Rekombination
- NHEJ: Nichthomologes End-Joining

Mikrodeletionssyndrome

- Die Deletionen sind so klein (< 5 Mb), dass sie in der Regel nicht durch routinemäßige konventionelle Zytogenetik erfasst werden.
- Meist *Contiguous Gene Syndrome*: Merkmale bedingt durch Deletion von multiplen nebeneinander liegenden Genen.
- Der klinische Phänotyp ist relativ spezifisch.
- Es muss durch FISH gezielt gesucht werden.

- Nachweis mittels FISH

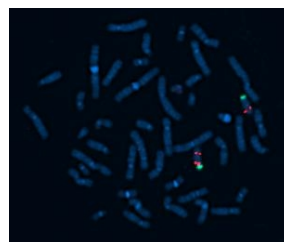
Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

Zytogenetische Mutationen

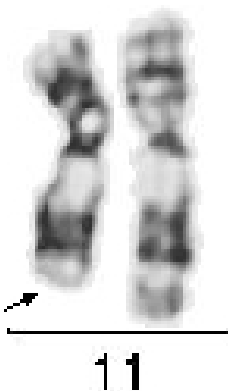
Unterschiedliche Auflösungen ...



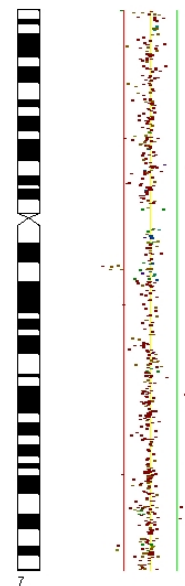
Trisomie 21
322 Gene
46 Mb



Prader-Willi-Syndrom
> 30 Gene Nachweis per FISH
4 Mb



Deletion 11q
> 40 Gene
ca. 10 Mb

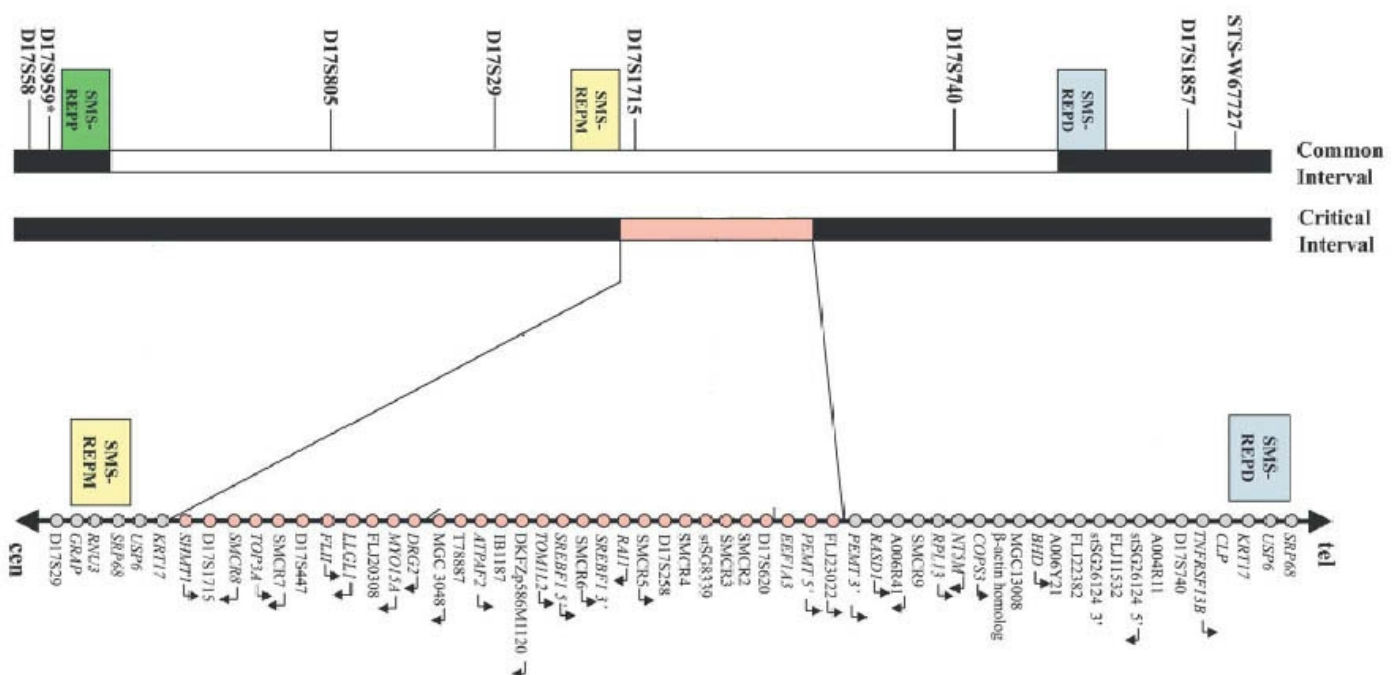


Deletion 7q
> 15 Gene (Nachweis mittels Array-CGH)
ca. 1,5 Mb

Beispiel: Smith-Magenis-Syndrom

- Erstbeschreibung 1982
- Inzidenz 1:25.000 (> 100 Fallbeschreibungen)
- Mikrodeletion auf Chromosom 17p11.2
- Kraniofaziale Dismorphie: zeltförmige Oberlippe, Brachyzephalie
- Mentale Retardierung
- Verhaltensauffälligkeiten: Selbstaggression, Selbstumarmungen, Polyembolokoilomanie
- Hypercholesterolämie

Beispiel: Smith-Magenis-Syndrom



- Haploinsuffizienz für insbesondere *SREBF1*, *MYO15A*, *RAI1* für Hauptmerkmale verantwortlich

Williams-Beuren-Syndrom	7q11.23
CATCH-22	22q11.2
Neurofibromatose 1	17q11
Prader-Willi-Syndrom	15q11-13
Angelman-Syndrom	15q11-13
Wolf-Hirschhorn-Syndrom	4p16.3
Cri-du-Chat-Syndrom	5p15.3
Smith-Magenis-Syndrom	17p11.2
Miller-Dieker-Syndrom	17p13.3
Alagille-Syndrom	20p11.23
Rubinstein-Taybi-Syndrom	16p13.3
...	...

Standardisierte Nomenklatur für Mutationen

- DNA: A,C,G,T
 - ▶ c.435C>A
- Protein: 1- oder 3-Buchstabencode
 - ▶ p.A212P, Ala212Pro
- HGNC¹-Gensymbole verwenden, z.B. *FBN1* für Fibrillin-1
- Nettes Tool: <http://www.humgen.nl/mutalyzer/1.0.1/>

¹HUGO Gene Nomenclature Committee

DNA ...

- Einfache Substitution c.123A>G
- Deletion c.123delA
- Duplication c.123dupA
- Insertion c.123_124insC

Deletionen & Insertionen

- c.546delT
- c.546del
- c.586_591del
- c.586_591delTGGTCA **oder** c.586_591del6
- c.546_547insT (**Nicht** c.546insT **da** zweideutig)
- c.1086_1087insGCGTGA

- Um (z.B. bei rezessiven Erkrankungen) Veränderungen in zwei Allelen zu bezeichnen:
- [...], +
- c . [546C>T] + [2398delT]

Frameshift

- Kurzform p.Arg83fs
- Alternativ: p.Arg83SerfsX15
 - ▶ Erste Aminosäuresubstitution (Arg83Ser)
 - ▶ Länge des verschobenen Leserasters bis zum vorzeitigen Stoppcodons (X15)

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

- Spleißmutationen: z.B. 36+1G>C, 37-2A>G

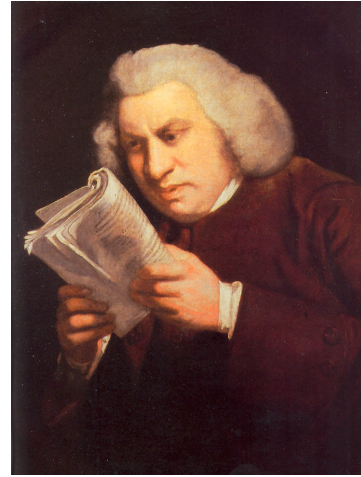
Nomenklatur: Zusammenfassung

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

The End of the Lecture as We Know It

- Diese Vorlesungsdias stehen unter der GNU-Lizenz für freie Dokumentation^b
- Kontakt:
peter.robinson@charite.de
- Strachan & Read, Kapitel 11

^b<http://www.gnu.org/licenses/fdl.txt>



Lectures were once useful; but now, when all can read, and books are so numerous, lectures are unnecessary. If your attention fails, and you miss a part of a lecture, it is lost; you cannot go back as you do upon a book... People have nowadays got a strange opinion that everything should be taught by lectures. Now, I cannot see that lectures can do as much good as reading the books from which the lectures are taken. I know nothing that can be best taught by lectures, except where experiments are to be shown. You may teach chymistry by lectures. You might teach making shoes by lectures!

Samuel Johnson, quoted in Boswell's Life of Johnson (1791).