

## Mutacije, mutageneza, vpliv polimorfizmov/mutacij na izražanje genov

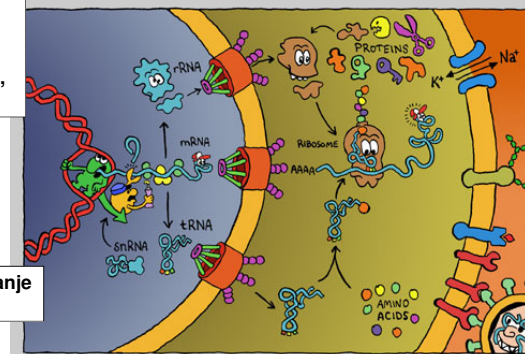
Celična biologija z genetiko  
LBM  
kozmetologija  
šol. leto 2012/13  
Prof. dr. Irena Mlinarič-Raščan



## Do sedaj ste spoznali:

Struktura DNA/RNA, gen, kromosom, genom

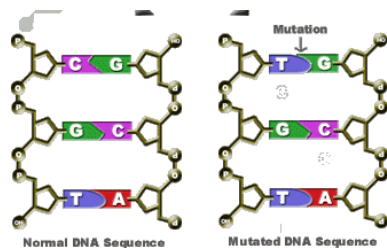
Podvojevanje DNA



Izražanje genov

Nadzor nad izražanjem genov

## Mutacija: sprememba v zaporedju DNA



Lat.: mutare = spremeniti (se)

## Posledice mutacij

- **Spremembe v sekvenci DNA:**
  - spremenjen protein
  - nefunkcionalen protein
  - ni proteina
- **Spremembe v izražanju genov**
  - preveliko izražanje → preveč proteina
  - prenizko izražanje → premalo proteina

To je lahko direkten vzrok za bolezen (npr. prirojene bolezni) ali vodi v razvoj bolezni (npr. rak).



## Kje se lahko pojavijo mutacije?

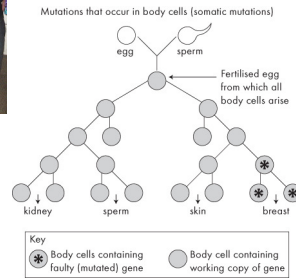
- v spolnih celicah - **dedne**  
(se prenašajo na potomce)

Primer: ahondroplazija  
(mutacije v genu FGFR3)

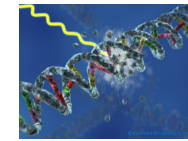


- v somatskih celicah - **ne-dedne/somatske**  
(se ne prenašajo na potomce)

Primer: rak  
(mutacije v tumor-supresorskem genu p53)






## Mutageneza



- Nastanek strukturnih sprememb v DNA molekuli.
- 1 000 – 10<sup>6</sup> mutacij na celico na dan.
- Poznamo dva tipa poškodb DNA:
  - **Endogena**, ki jo povzročajo produkti normalnega metabolizma in napake pri podvajanju DNA.
  - **Eksogena**, ki jo povzročajo zunanji dejavniki (mutageni).

## Mutageni

- Ionizirajoče sevanje (γ in X-žarki)
- UV svetloba  
- Kemijske snovi:
  - Snovi, ki se vgrajujejo v DNA (5-bromouracil)
  - Snovi, ki spremenijo kemijsko strukturo nukleotidov (hidroksilamin, snovi, ki tvorijo proste radikale)
  - Snovi, ki se vgrajujejo v DNA vijačnico (nekateri antibiotiki, EtBr in težke kovine)
- Virusni genomi 

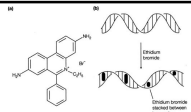
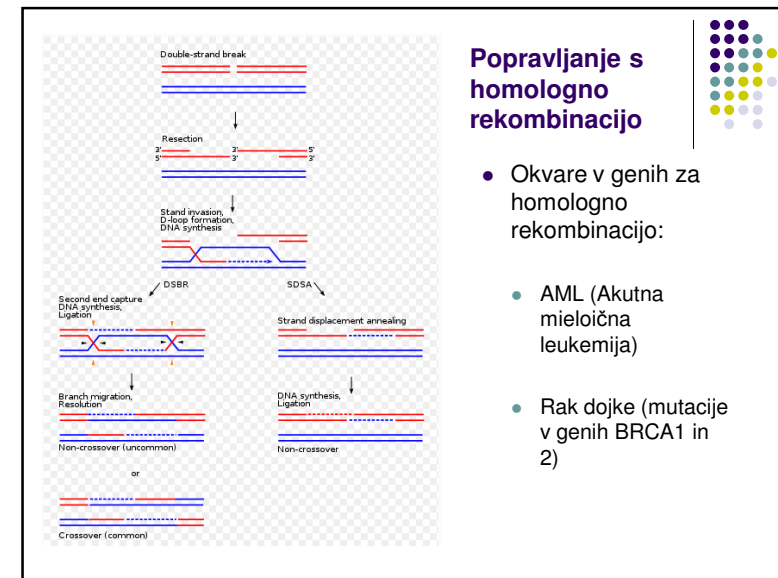
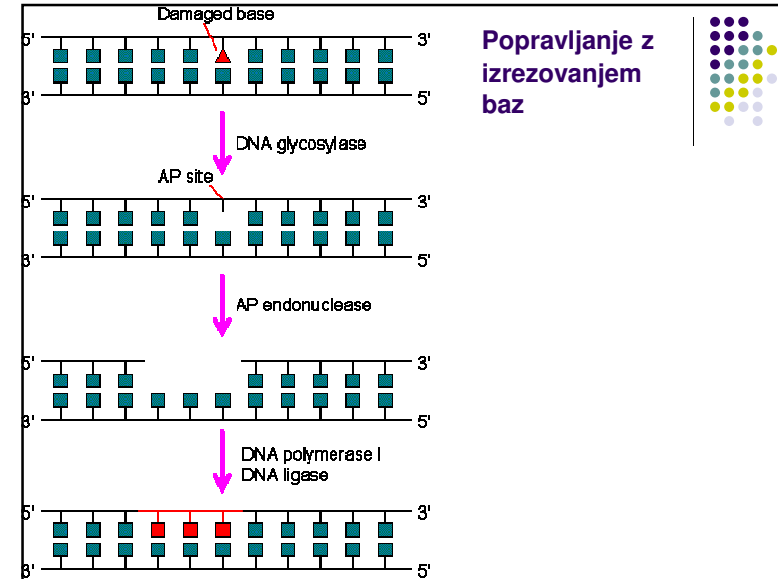
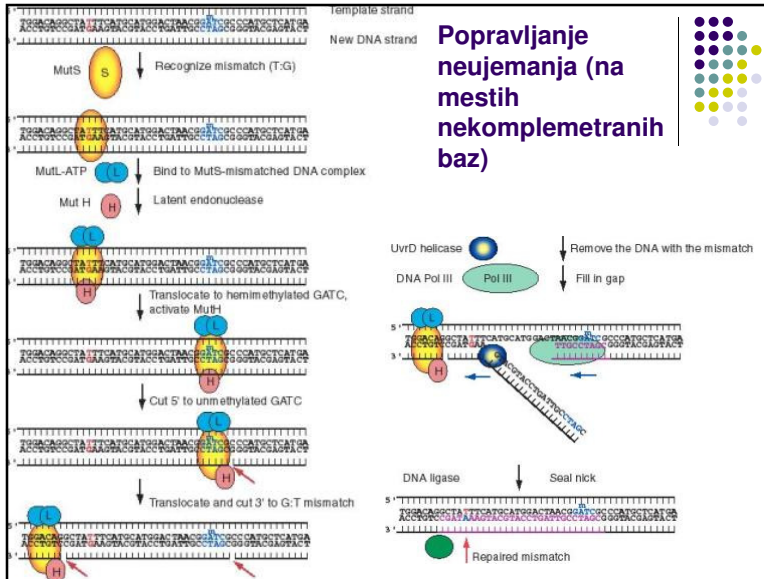


Fig. 3. 46 (b) 5-bromouracil, for the process of replication, illustrating the lengthening and shortening of the DNA base.

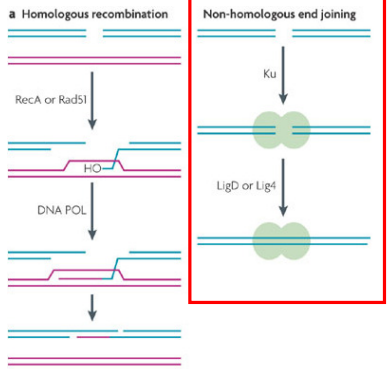
## Popravljalni mehanizmi DNA



- Poškodbe enovijačne DNA:
  - Popravljanje neujemanja (na mestih nekomplemetranih baz)
  - Popravljanje z izrezovanjem baz
  - Popravljanje z izrezovanjem nukleotidov
- Poškodbe dvovijačne DNA:
  - Popravljanje s homologno rekombinacijo
  - Združevanje nehomolognih koncev DNA



## Združevanje nehomolognih koncev DNA



- Severe Immunodeficiency Syndrome (SCID)



David Vetter – the “bubble boy”

## Mutacija ali polimorfizem?

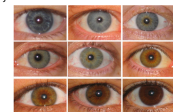
- **Mutacija:** običajno prisotna pri < 1% populacije in ponavadi povzroča bolezen  
Primer: dedna bolezen: albinizem (mutacije v genu za tirozinazo)



- **Polimorfizem:** običajno prisoten pri >1% populacije in ponavadi ne povzroča bolezni, lahko pa zveča ali zmanjša tveganje za nastanek bolezni. Lahko vplivajo na normalne fenotipske značilnosti ali na odziv na zdravila, toksine,...

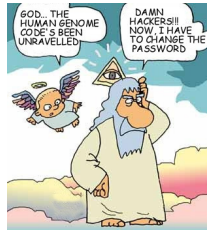
Primeri:

- normalne fenotipske značilnosti: barva oči (polimorfizmi na lokusih BEY (blue/brown) in GEY (green/blue))
- povečano tveganje za bolezni: rak (polimorfizmi v genu za MTHFR)
- farmakogenetika: učinkovitost terapije s tiopurini (polimorfizmi v genu za TPMT)



## Genetska raznolikost in človeški genom

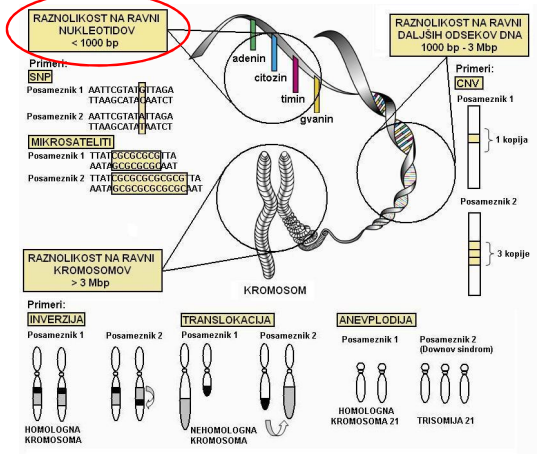
- Če bi primerjali genoma dveh naključno izbranih (zdravih) ljudi, bi bili njuni zaporedji 99,9% enaki
- Preostalih **0,1% zaporedja** (cca  $3 \times 10^6$  bp) je odgovornih za razlike med posamezniki
- Osnovne spremembe v zaporedju so substitucije, delecije, insercije, inverzije, spremembe v številu kopij ter translokacije segmentov DNA
- **Referenčni genom:**
  - rezultat projekta Človeški genom
  - Javno dostopen
  - Genom vsakega posameznika se nekoliko razlikuje od referenčnega



## Human genome project vs. Celera corporation

Human genome project (HGP)	CELERA <small>an Applied Biosystems Business</small>
Mednarodni raziskovalni konzorcij	Zasebna korporacija
Financiranje: Vlada ZDA (United states deptment of energy & NIH)	Financiranje: zasebni sektor
Sredstva: 3 milijonov \$	Sredstva: 300 milijonov \$ (whole genome shotgun sequencing + podatki HGP)
James D Watson	Craig J Venter
Vsi podatki prosto dostopni (GenBank): <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucleotide">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucleotide</a>	Omejen dostop do podatkov

# Genetska raznolikost

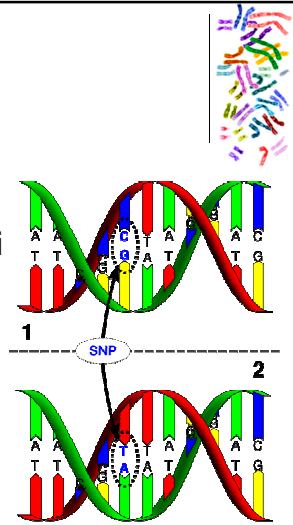


# Kratke genetske različice (<1kbp)

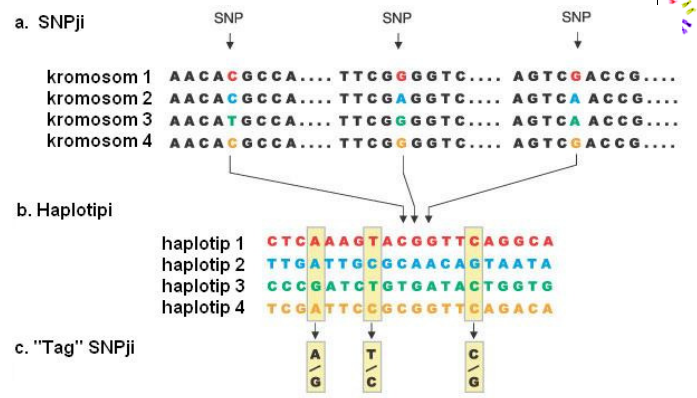
- Polimorfizmi posameznih nukleotidov ali SNP-ji (single nucleotide polymorphism)
- Mikrosateliti ali kratke tandemske ponovitve DNA (short tandem repeats – STR, simple sequence repeats – SSR)
- Insercijski/delecijski polimorfizmi (indels)
- Multipli nukleotidni polimorfizmi (mnp)

# SNP-ji (I)

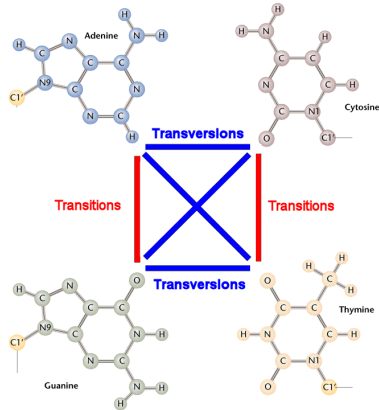
- Zamenjava enega nukleotida
- Najbolj pogosti polimorfizmi
- Pojavljajo se v človeškem genomu na vsake 100 do 300 baznih parov
- Vsak posameznik ima vzdolž kromosoma edinstven nabor določenih SNP-jev (haplotip)



# Haplotip



## SNP-ji (II)



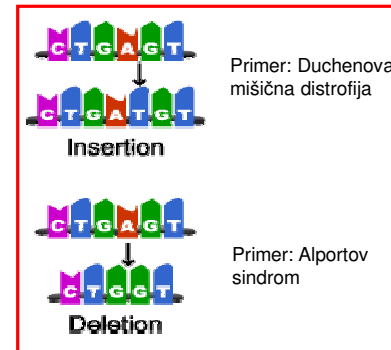
• Glede na spremembo (substitucijo) nukleotida:

➢ **tranzicije** (zamenjava purinske baze s purinsko oz pirimidinske s pirimidinsko bazo)

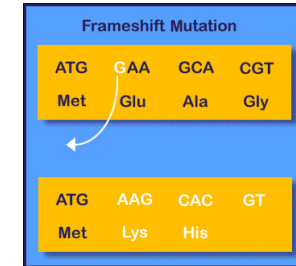
➢ **tranzverzije** (zamenjava purinske baze s pirimidinsko ali obratno)



## Delecije in insercije



Če se vstavi/izreže zaporedje, ki ni mnogokratnik števila 3 → **premikbralnega okvirja:**



Primer: delecija ene baze (G)

## Mikrosatelitni polimorfizmi

- **Mikrosateliti:** kratke nukleotidne sekvence dolžine 1 do 6 baznih parov, ki se tandemsko ponavljajo do skupne dolžine približno 100 baznih parov (zasedajo cca 3% genoma)
  - Npr. CACACACACA = (CA)<sub>5</sub>
- **Mikrosatelitni polimorfizmi:** prisotnost različnega števila tandemskih ponovitev med posamezniki
  - Npr. (CA)<sub>3</sub>, (CA)<sub>4</sub>, (CA)<sub>6</sub>, ...



## Mikrosatelitna ekspanzija

- Nestabilne mikrosatelitne ponovitve → število ponovitev se spreminja iz generacije v generacijo. Če se nahajajo v kodirajočih regijah genov, lahko vodijo v bolezen.
- Čas pojavljanja in hitrost napredovanja bolezni je odvisna od števila ponovitev.
- Primer: Huntingtonova bolezen

Classification of the trinucleotide repeat, and resulting disease status, depends on the number of CAG repeats<sup>[3]</sup>

Repeat count	Classification	Disease status
<28	Normal	Unaffected
28-35	Intermediate	Unaffected
36-40	Reduced Penetrance	+/- Affected
>40	Full Penetrance	Affected



A new study from Nancy Mendis in Venezuela in the 1990s with a boy with Huntington's disease, suggests there may be more to repeat the cycle of the disease.



## Strukturni učinki mutacij na proteine

- **tihe mutacija** (silent): kodira isto a.k. ali pa a.k., ki ne vpliva na strukturo proteina (kemijsko podobna a.k.)
- **drugačnosmiselne mutacije** (missense): kodira drugo a.k.
- **nesmiselne mutacije** (nonsense): zamenjava nukleotida povzroči nastanek stop kodona, ki prekine sintezo proteina
- **mutacije s premikom bralnega okvirja** (frameshift): spremeni se celotno a.k. zaporedje v določeni proteinski regiji (od mutacije naprej)

**Wild type allele:**  
 M D D Q S R R M L Q T L A G V N L  
 atggacgatcaatccaggatgctgcagactctggccggggtgaacctg

**silent (third base pair) mutation:**  
 M D D Q S R R M L Q T L A G V N L  
 atggacgatcaatccaggatgctgcaaacctctggccggggtgaacctg

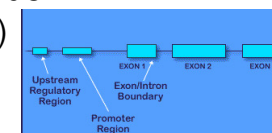
**point mutation (missense):**  
 M D D Q S R R M L K T L A G V N L  
 atggacgatcaatccaggatgctgaagactctggccggggtgaacctg

**point mutation (nonsense):**  
 M D D Q S R R M L S T O P  
 atggacgatcaatccaggatgctgcagactctggccggggtgaacctg

**frameshift leading to premature termination:**  
 M D D Q S R R M L R L W P G S T O P  
 atggacgatcaatccaggatgctgcagactctggccggggtgaacctg

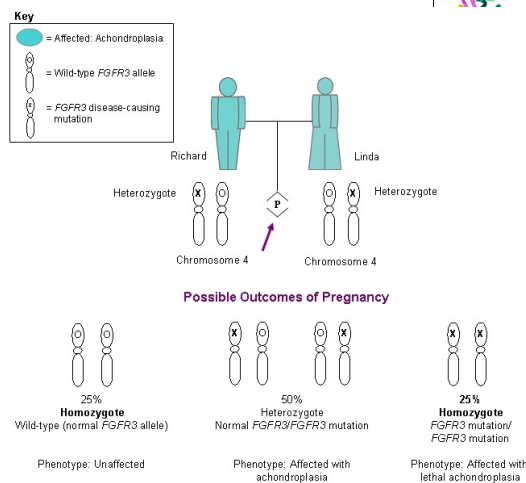
## Mutacije, ki povzročajo bolezni (patogene mutacije)

- V kodirajočem predelu gena (večina mutacij)
- V nekodirajočih predelih gena na **mestih izrezovanja intronov** (*splicing mutations*)
- V regulatornih predelih (npr. v promotorjih)



## Alelne različice

- Zaradi genetskih polimorfizmov (ali mutacij) imamo v populaciji različne variante istega gena, ki jih imenujemo **aleli**
- Aleli homolognih kromosomov posameznika tvorijo njegov **genotip**
- Posameznik, ki ima na homolognih kromosomih enako alelno različico določenega gena = **homozigot (AA, aa)**
- Posameznik, ki ima različna alela = **heterozigot (Aa)**



## Vpliv mutacij na funkcijo proteinov

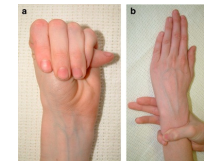
- **Mutacije, ki povzročijo izgubo funkcije**
  - Amorfne mutacije → popolna odsotnost funkcije
  - Hipomorfne mutacije → delna izguba funkcije
- **Mutacije, ki povzročijo pridobitev funkcije**
  - Hipermorfne mutacije → povečanje aktivnosti
  - Neomorfne mutacije → pridobitev nove funkcije
- **Dominantno negativne (antimorfne) mutacije** → okvarjen (mutiran) genski produkt negativno vpliva na funkcijo normalnega genskega produkta pri heterozigotnem posamezniku

## Vpliv mutacij na funkcijo proteinov – primer: Galaktozemija

Amorfna mutacija v genu za GALT	Hipomorfna mutacija v genu za GALT	Hipermorfna mutacija v genu za GALT
Q188R	-119/-116delGTCA	L218L
Mutacija v aktivnem mestu encima → odsotna aktivnost GALT	Mutacija v promotorju → zmanjšano izražanje gena → 50% aktivnost GALT	Tiha mutacija → hitrejša translacija → 130% aktivnost GALT
Klasična galaktozemija	Duarte 2 galaktozemija	Duarte 1 galaktozemija
mentalna zaostalost, okvare jajčnikov, katarakte, smrt,...	normalen fenotip, povečano tveganje za rak jajčnikov	normalen fenotip

## Vpliv mutacij na funkcijo proteinov – primer: Marfanov sindrom

- Antimorfna mutacija v FBN1 genu, ki kodira glikoprotein fibrilin-1.
- Dominantno dedovanje: okvarjene proteinske molekule preprečijo pravilno delovanje normalnih proteinskih molekul v multimernem proteinskem kompleksu.
- Velika telesna višina, dolgi udi in prsti.
- Okvare srčnih zaklopk in aorte.



## Naloga: Tipi mutacij

- Za kakšen tip mutacije gre?

### Types of Mutations

Normal gene  
AS THE MAN SAW THE DOG HIT THE CAN END IT IS

AS THE MAN SAW THE DOT HIT THE CAN END IT IS

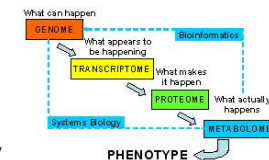
AS THE MAN SAW THE ~~HIT~~ THE CAN END IT IS

AS THE MAN SAW THE FAT DOG HIT THE CAN END IT IS

AS THE MAN SAW THE DOG ITT HEC ANE ND ITI S



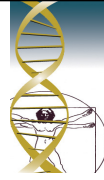
## Genomika



- Veda o genomih organizmov
- **Genom** = celotna DNA določenega organizma
- **Transkriptom** = celotna prepisana mRNA celice/tkiva (v določenem trenutku, pod določenimi pogoji)
- **Proteom** = celoten nabor proteinov, izraženih v celici/tkivu (v določenem trenutku, pod določenimi pogoji)
- **Metabolom** = celoten nabor molekul (metabolni intermediati, hormoni, signalne molekule, sekundarni metaboliti, ...), ki so prisotni v celici/tkivu (v določenem trenutku, pod določenimi pogoji)
- Analiza možna le z **bioinformatičnimi** orodji (podatkovne baze, programska orodja, programska oprema)



## Veje genomike



- **Farmakogenomika** ugotavlja povezavo med genetsko variabilnostjo in odgovorom na terapijo z zdravili
- **Toksikogenomika** proučuje vpliv genetske variabilnosti na odziv na izpostavljenost toksičnim spojinam
- **Nutrigenomika** ugotavlja vpliv genetske variabilnosti na presnovo sestavin prehrane
- **Metagenomika:** študij genomov prisotnih v okolju (genomi mikroorganizmov)
- **Epigenomika:** študij dednih sprememb fenotipa, ki niso posledica sprememb v zaporedju DNA.

## Organizacija človeškega genoma



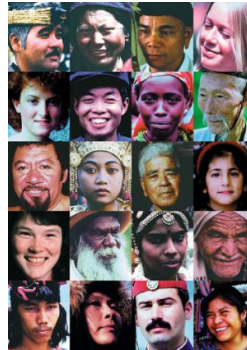
- **Jedrni genom** (46 kromosomov) + **mitohondrijski** (0,0005% celotnega genoma)
- Kromosomi: 22 x 2 **avtosomov** (nespolni kromosomi) + 2 **spolna kromosoma**
- **Manj kot 2% genoma se prepisuje v mRNA = kodirajoči del**
- Več kot 50% nekodirajoče DNA predstavlja **ponavljajoča se DNA**
- Ocejujejo, da je 0,1% - 0,5% genoma **variabilnega** (odgovoren za razlike med posamezniki)



## Vzroki za genetsko raznolikost



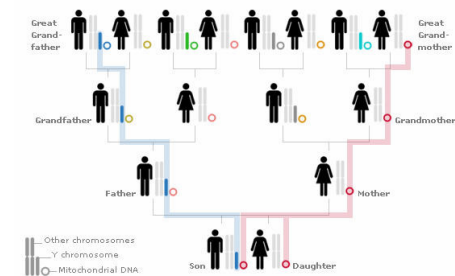
- **Selitve** prebivalstva v zgodovini
- Konstantno **pojavljanje novih mutacij**
- **Selekcija alelov**, ki so predstavljal prednost za preživetje v določenih klimatskih pogojih, pri določenih infekcijskih boleznih (npr. anemija srpastih celic pogosta pri prebivalcih tropske Afrike = odpornost na malarijo)
- Medsebojno poročanje odvisno od **kulturnih norm** (npr. manjša variacija v ožjih skupinah, ki so se medsebojno poročale)



## Projekti usmerjeni v iskanje genetskih različic



- **The Genographic Project** - zgodovina človeštva in spremljanje migracij do skupnega prednika  
<https://genographic.nationalgeographic.com/genographic/lan/en/participate.htm>



## Projekti usmerjeni v iskanje genetskih različic



- **Human genome diversity project** - usmerjen k razkritju genetske zasnove celotnega človeštva in s tem razlik med posameznimi populacijami.

<http://www.stanford.edu/group/morrinst/hgdp/faq.html>

- **The Human Variome Project** – usmerjen v razkritje vseh medicinsko pomembnih različic (monogenska in poligenetska obolenja, polimorfizmi ki vplivajo na presnovo zdravil, hrane...)

<http://www.humanvariomeproject.org>



## Vrste genetskih obolenj



- **Kromosomske nepravilnosti**
  - Zaostalost v rasti in duševnem razvoju
  - 15% spontanah splavov, 50% neuspešnih oploditev
- **Monogenska obolenja**
  - Se dedujejo po **Mendlovih zakonih**
  - Poznamo več kot 10 000 obolenj (vendar so redka)
- **Poligenetska (večfaktorska obolenja)**
  - Mnogo kroničnih obolenj z dobro opisanimi fenotipi, vendar brez dokončne povezave z genotipom – obstaja **nagnjenje** za razvoj bolezni
- **Okvare somatskih (tkivnih) celic**
  - Različne vrste raka
- **Približno 3% rojenih otrok ima significantne genetske okvare, ki vodijo v bolezen in/ali zgodnjo smrt**

## Metode detekcije genetskih različic



Različice	Dolžina	Detekcija
Mikroskopske	> 3 Mbp	S pomočjo mikroskopa (analiza kariotipa)
Submikroskopske	~ 1 kbp - ~ 3 Mbp	Tehnologija mikromrež Primerjalna analiza zaporedij DNA
Kratke	< 1 kbp	Metode, osnovane reakciji PCR, ki jim sledi analiza zaporedja nukleotidov