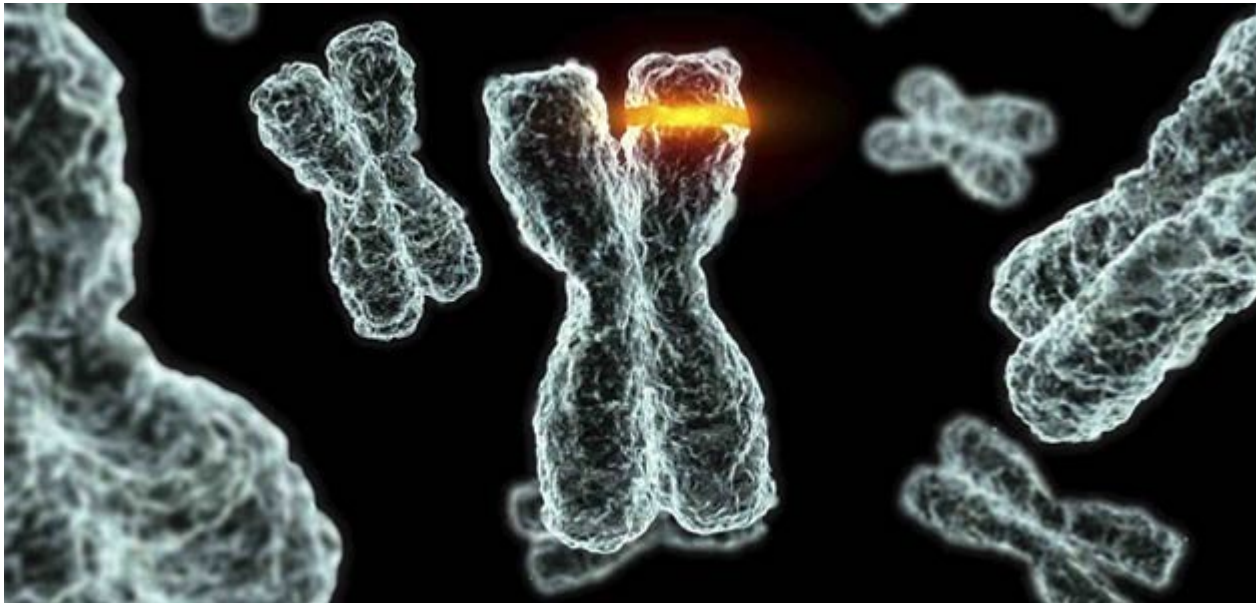


# Mutace, mutagenní faktory, genotoxicita



F1GE1 - Aplikovaná genetika

# Mutace

- Změna v genotypu
- Obvykle náhodný, neusměrněný proces
- U všech organismů (od virů až po člověka)
- Vznikají spontánně nebo jsou indukovány mutagenními faktory

# Rozdělení mutací

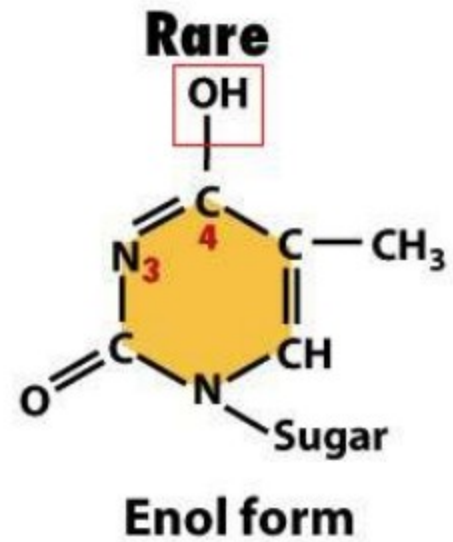
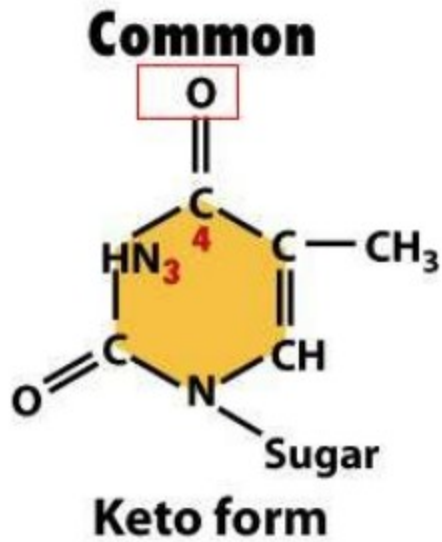
- Spontánní x indukované
- Genové x chromozomální x genomové
- Somatické x gametické
- Synonymní x nesynonymní
- V kódujících x nekódujících sekvencích
  
- Dle účinku na množství a aktivitu proteinů
- Evoluční hledisko

# Rozdělení mutací dle vzniku

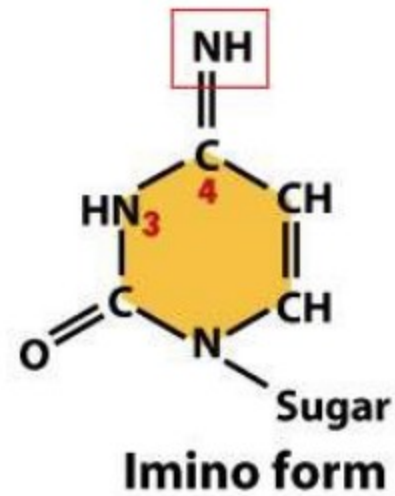
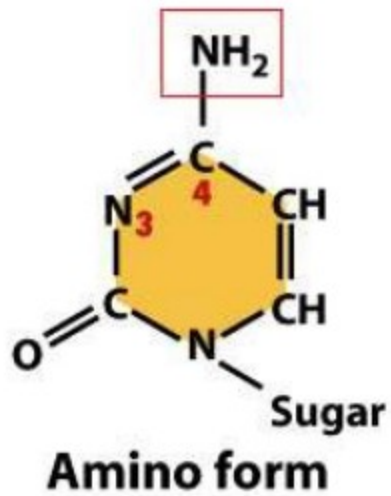
- **Spontánní**
  - vznikají samovolně, frekvence je malá
  - chyby při replikaci
  - DNA polymeráza je přesná ( $10^{-7}$ )
  - reparační mechanismy

## Tautomerní přechody

- méně obvyklé strukturní formy bazí
- tvorba vodíkových vazeb s nesprávnými nukleotidy
- enol forma thyminu se páruje s G místo A
- imino forma adeninu se páruje s C místo T

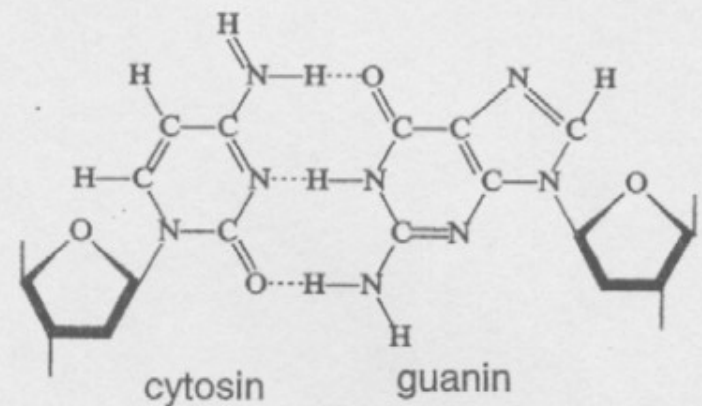
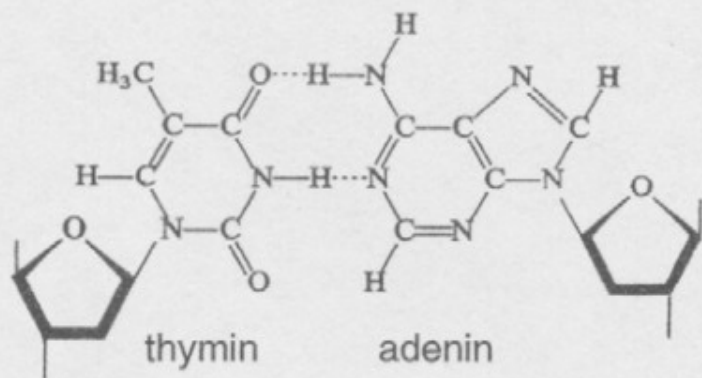


**Thymine**

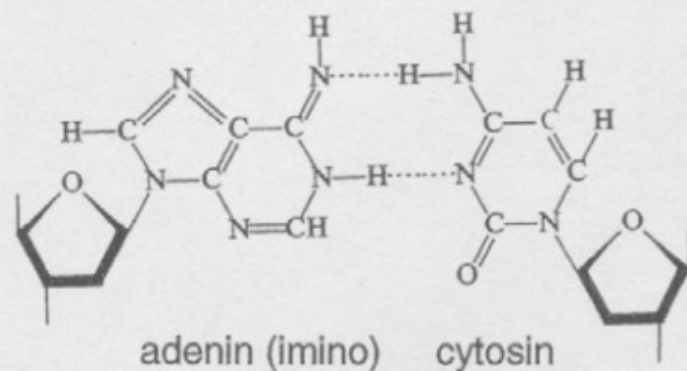
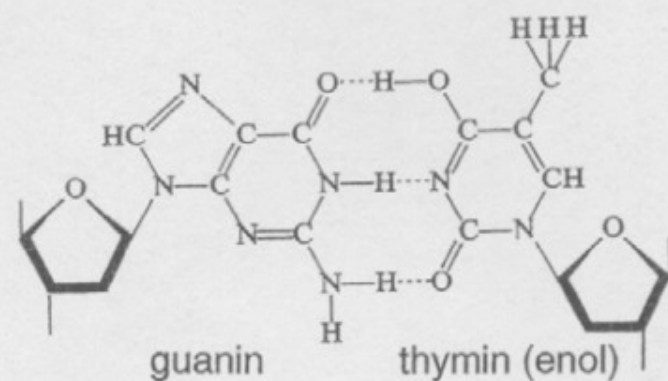


**Cytosine**

párování obvyklých tautomerů



párování vzácnějších tautomerů



# Rozdělení mutací dle vzniku

- **Indukované**
  - vznikají působením faktorů vnějšího prostředí:  
fyzikální, chemické nebo biologické **mutageny**
  - frekvence je vyšší než u spontánních

# Mutační rychlost

- pravděpodobnost náhodného vzniku mutace v určitém konkrétním vztahu vázaná na buňku či organismus a na jednu generaci
- Viry
  - DNA viry  $10^{-6}$  až  $10^{-8}$  na bazi/generaci
  - RNA viry  $10^{-3}$  to  $10^{-5}$
- Prokaryota  $6 \cdot 10^3$  až  $4 \cdot 10^7$  bazí za replikaci



# Mutační rychlost u člověka

- pro nukleotidové substituce v lidském genomu řádově  $1 \cdot 10^{-8}$
- 61 nových nukleotidových substitucí v celém genomu na jedince
- Rozdíl mezi **mitochondriální** a **genomovou DNA**
- Mitochondriální DNA  $\sim 3 \cdot 10^{-5}$  na bází/ generaci (počítáno na 20 let)
- Genomová DNA  $\sim 2.5 \cdot 10^{-8}$  na bází/ generaci

# Vzájemná nezávislost mutací

- mutace v kterémkoliv bodě genu probíhá **nezávisle** na mutacích v jiných bodech genu

# Rozdělení dle úrovně postižení

- **Genové** - změny v genetické informaci, které proběhly na úrovni genu
- Jednobodové mutace
- Vícebodové mutace
- Mutace měnící smysl kódu
- Mutace měnící čtení kódu

# Klasifikace genových mutací

## Bodové

- **Inzerce** – vsunutí nové baze
- **Delece** – ztráta jedné baze
- **Substituce**



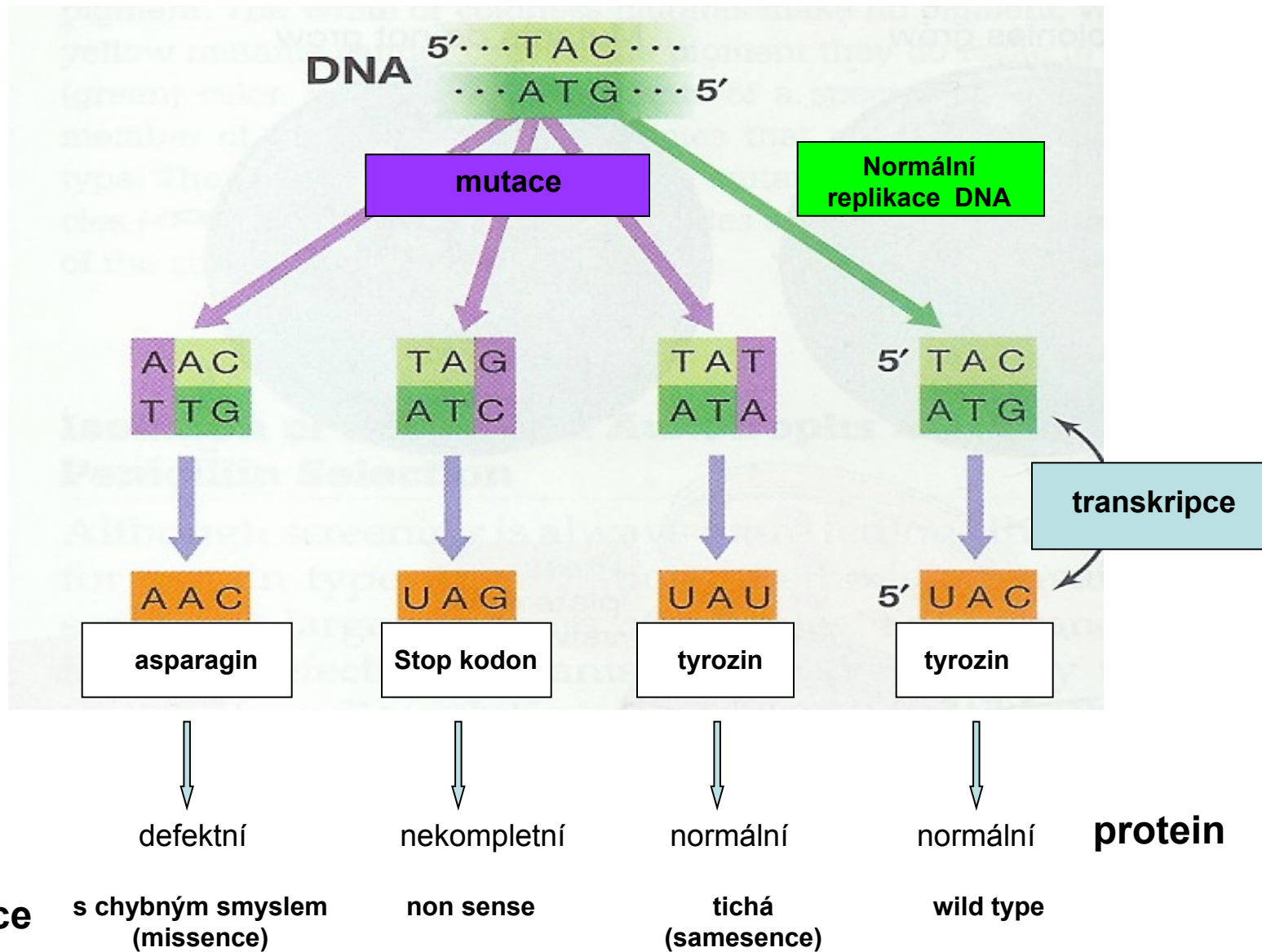
### **Tranzice**

výměna purinové  
baze za purinovou

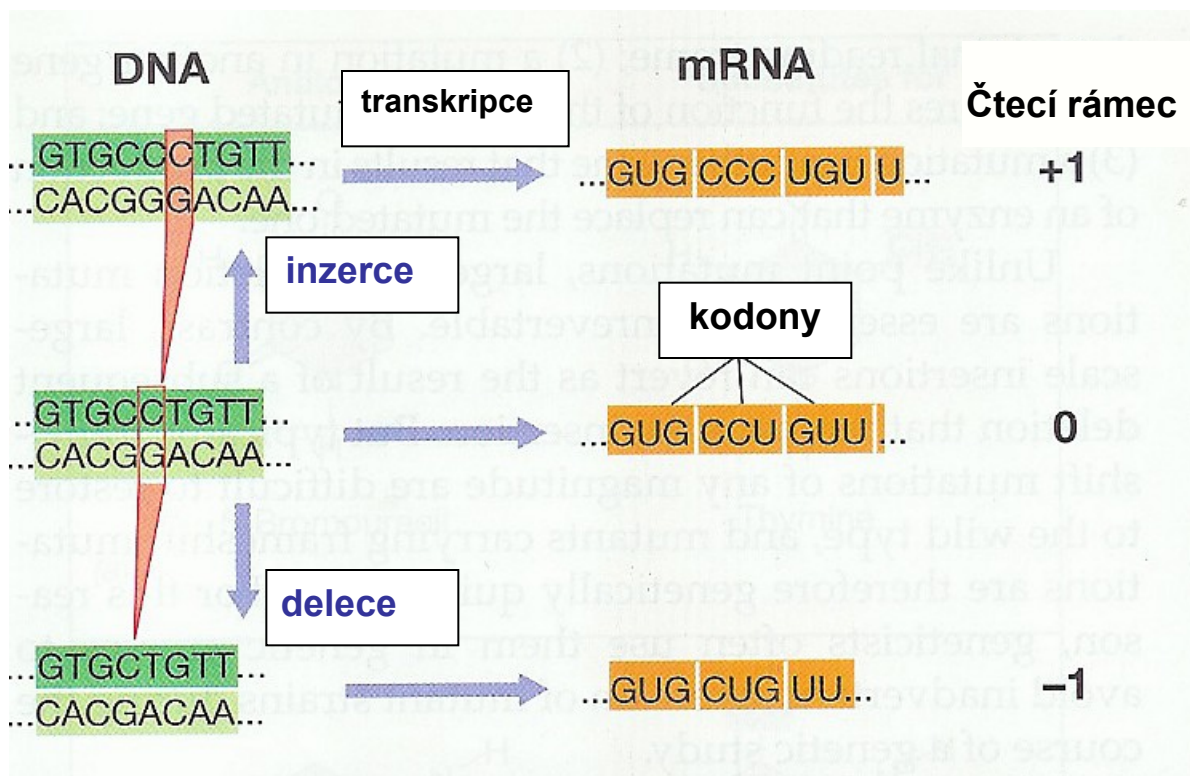
### **Transverze**

výměna purinové baze  
za pyrimidinovou

# Mutace genové - substituce



# Mutace genové – inserce, delece



# Mutace genové - příklady

- **substituce (missense)**
- uvnitř kódujících sekvencí
- srpkovitá anémie
- GAG→GAT .... glu→val ... HbS
  
- vně kódujících sekvencí
- hemofilie B
- A→G v oblasti promotoru genu pro faktor IX
- změněné množství produktu

# Mutace genové - příklady

- **substituce (nonsense)**
- vznik stop kodonu → abnormální produkt
- neurofibromatóza NF1
- CGA→TGA .... arg→stop v nádorově supresorovém genu



# Mutace genové - příklady

- delece, inserce
- posun čtecího rámce (frameshift)
- různý počet bazí (ne 3 ani jejich násobek)
- krevní skupiny
- delece ~~GTG~~ .... posun čtení v alele A  $\rightarrow$  0
- Tay-Sachs
- inserce 4 párů bazí... frameshift  $\rightarrow$  stop kodon
- 3 baze nebo jejich násobek
- cystická fibróza
- $\Delta$ F508  $\rightarrow$  chybí fenylalanin

# Mutace genové - příklady

- delece velké části genu
- Duchenova svalová dystrofie
  
- rozsáhlé inserce a delece
- nerovnoměrný crossing over nebo výměna mezi sesterskými chromatidami (aberrantní rekombinace)
  
- delece alfa globinového genu u alfa talasémie
- delece pigmentových genů u barvosleposti
- delece Rb1



mutace v genu Rb1 (retinoblastom)

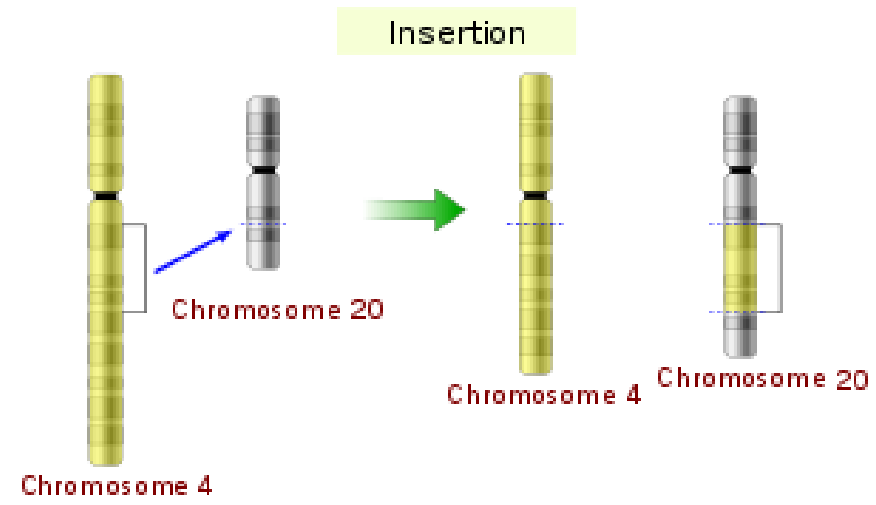
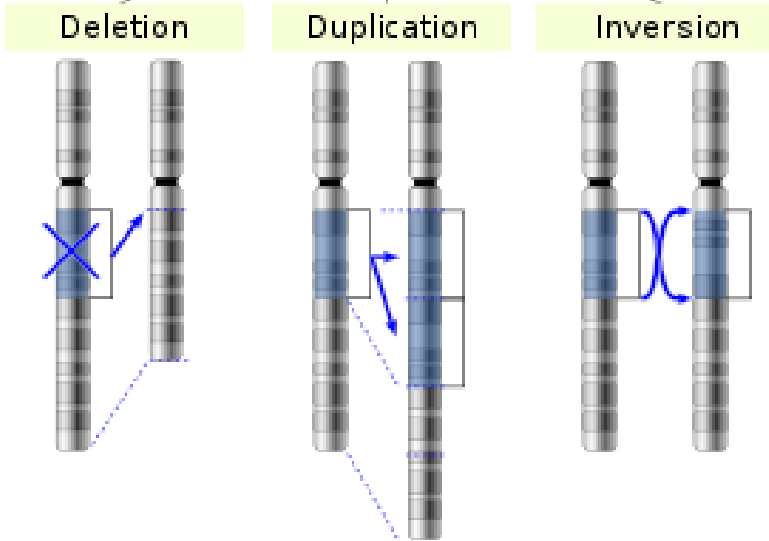


mutace v genu pro dystrofin  
(svalová dystrofie)

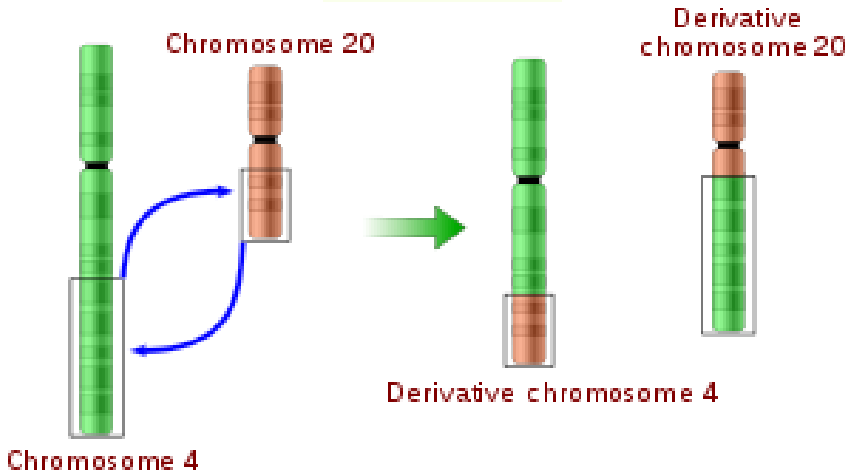
# Rozdělení dle úrovně postižení

- **Chromozomální** – zasahuje do chromozomů a mění jejich tvar či strukturu
- Strukturní aberace
- Příklad: delece, duplikace, inverze, translokace, fragmentace, ring chromozom, izochromozom, marker chromozom

Single chromosome mutations



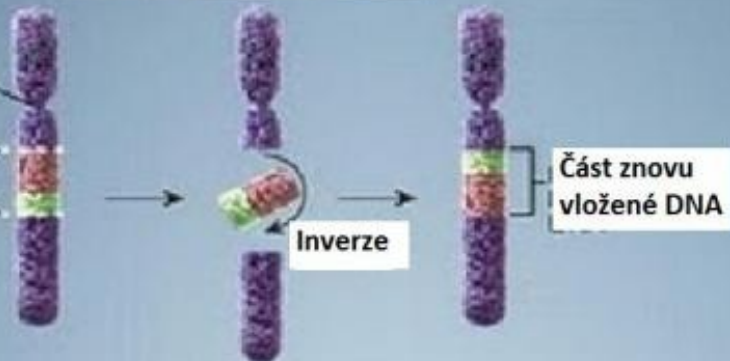
Translocation



### Paracentrická inverze

Centromera

Chromozomové  
aberrace (zlomy)



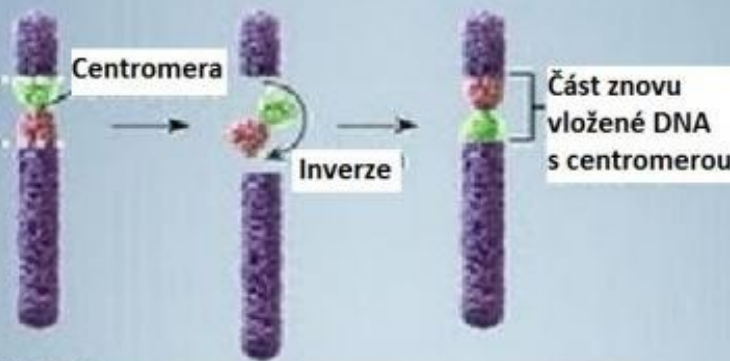
Část znovu  
vložené DNA

Inverze

### Pericentrická inverze

Chromozomové  
aberrace

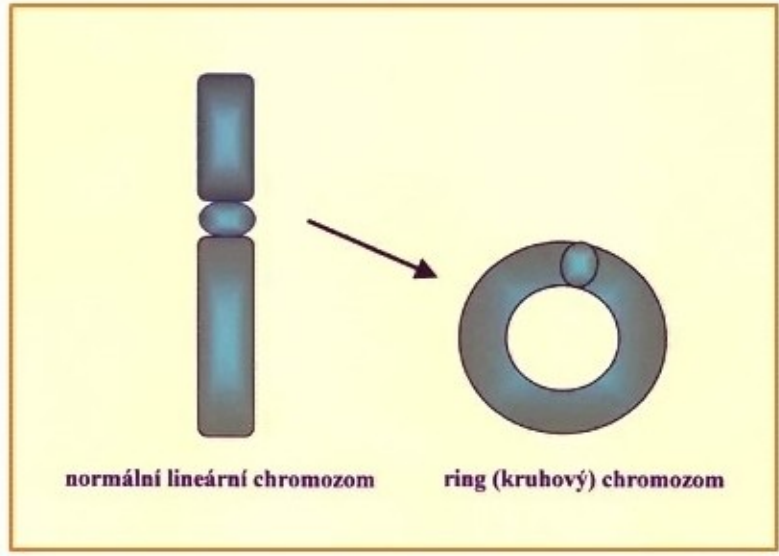
Centromera



Část znovu  
vložené DNA  
s centromerou

Inverze

### Schéma lineárního a ring chromozomu



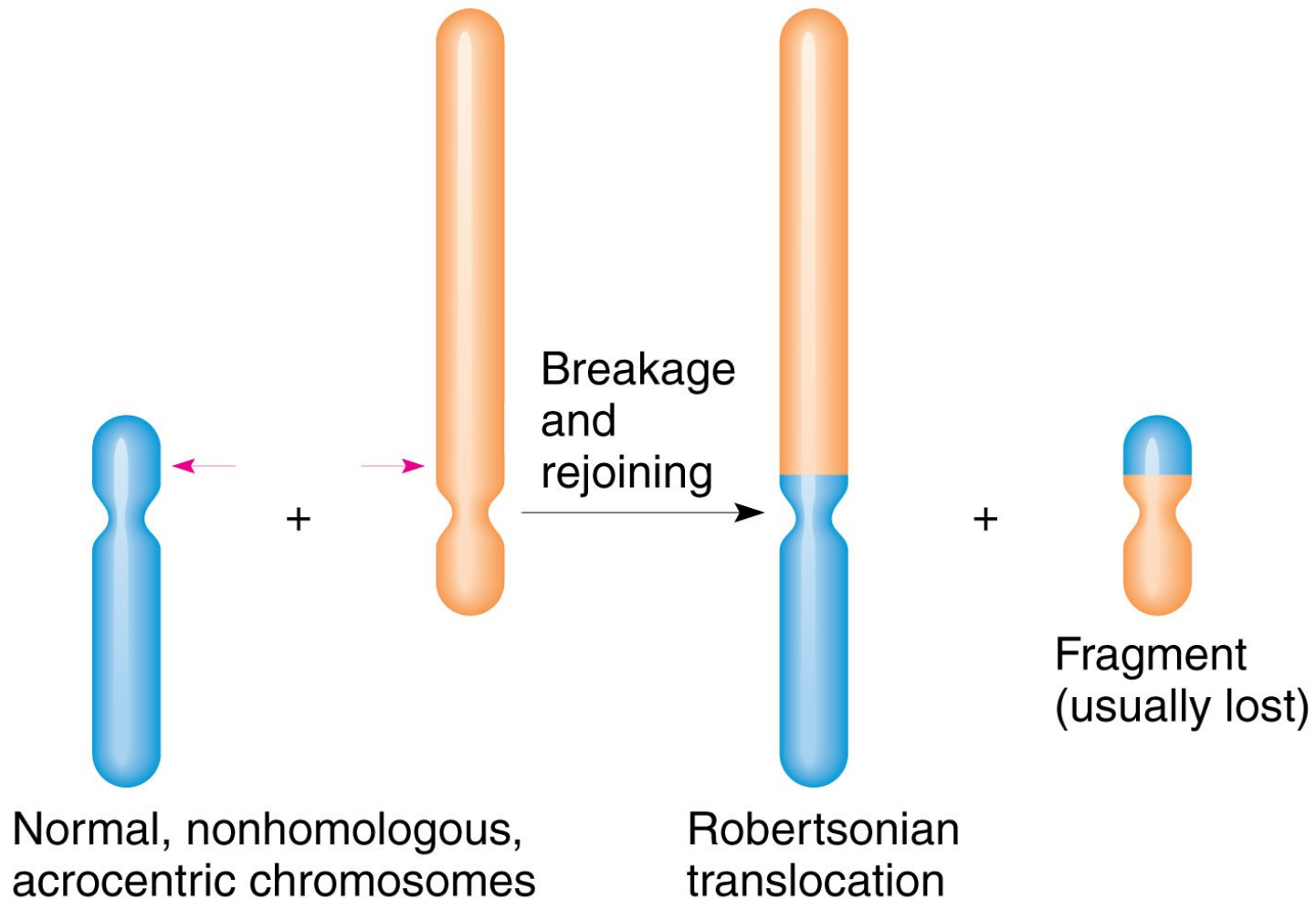
normální lineární chromozom

ring (kruhový) chromozom

# Transkolace

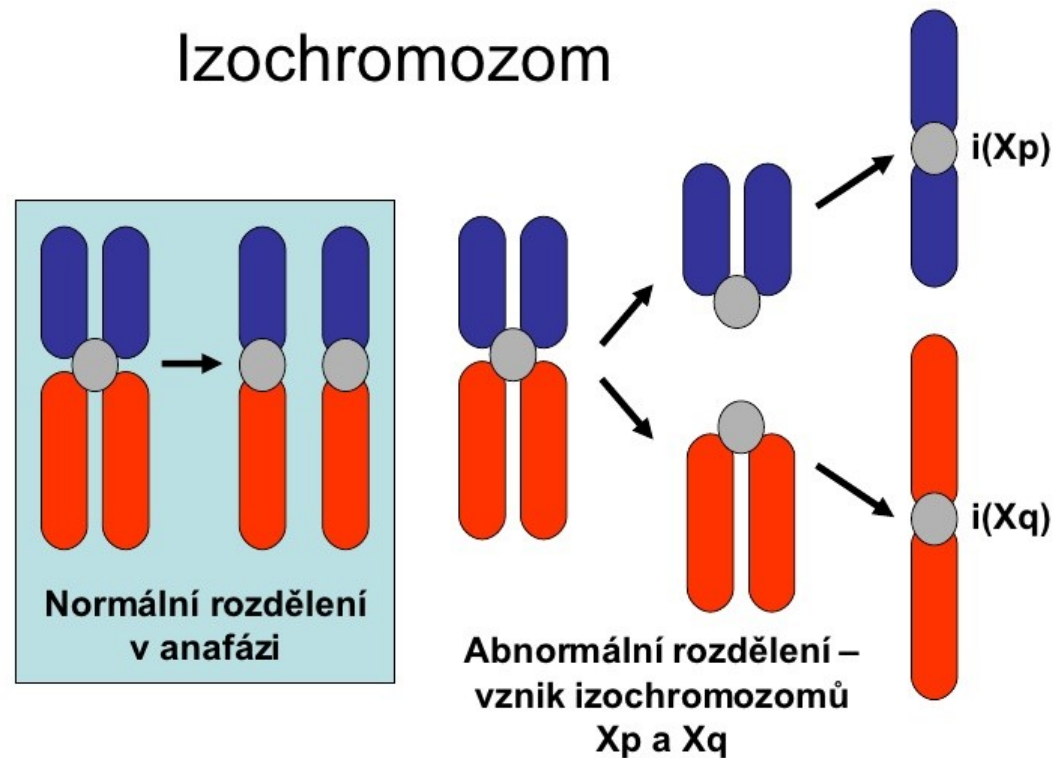
- **Balancované** – množství genetického materiálu zůstává zachováno
- **Nebalancované** – množství genetického materiálu není zachováno (např. dojde ke ztrátě) – nemusí se klinicky projevit, ale přenos na potomstvo – embryonální mortalita, postižení
- **Reciproké** – výměny mezi dvěma nehomologními chromozomy
- **Robertsonské** – fúze dvou dlouhých ramen akrocentrických chromozomů (po ztrátě krátkých ramének), např. fúze 14q a 21q

# Robertsonská translokace



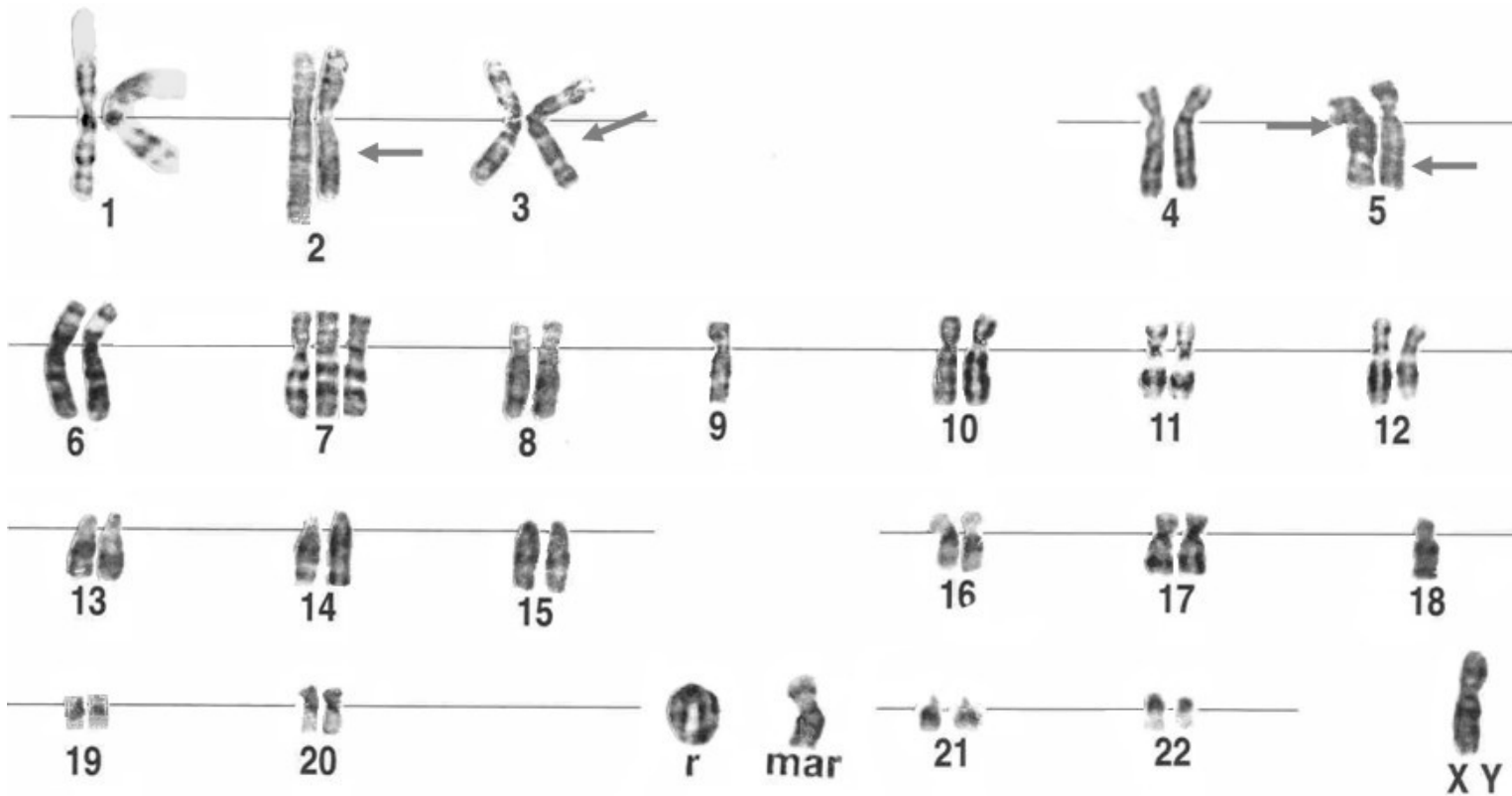


- **Izochromozom** – má duplikované jedno rameno, zatímco druhé je deletované. Vzniká chybným (příčným) štěpením centromery (namísto podélného) v druhém meiotickém dělení nebo v mitóze



- Příklad: izochromozom pro dlouhá ramena X chromozomu, přítomný u některých pacientek s Turnerovým syndromem

- **Marker chromozom** – malý, nadpočetný chromozom jehož původ nelze standardními cytogenetickými technikami určit (je různý, např. produkt Robertsonské translokace)



- Příklad: marker chromozom krátkých ramének chromozomu 18

# Rozdělení dle úrovně postižení

- **Genomové** – odchylka od standardního počtu chromozomů
- Př: numerické aberace
- Polyploidie – u obratlovců vzácná (u některých žab), využívá se ve šlechtitelství rostlin (větší vzrůst a životaschopnost, atd.)

# Rozdělení dle úrovně postižení

- **Genomové** – odchylka od standardního počtu chromozomů
- Př: numerické aberace
- Aneuploidie
  - pohl. chromozomů (Turner, Klinefelter)
  - autozomů (Down, Edwards, Patau)

# Rozdělení dle místa vzniku

- **Gameticke** – přenáší se na další generaci (dědičná onemocnění)
  - projeví se např. snížením plodnosti, mortalita embryí, spontánní aborty
- **Somaticke** – během prenatálního vývoje (VVV, aborty), postnatálně např. onkologická onemocnění

# Rozdělení dle dopadu na expresi

- **Synonymní** – tzv. tichá mutace
  - změna v tripletu která nemění AMK
- **Nesynonymní** – dojde ke změně AMK
- konzervativní - záměna za aminokyselinu s podobnými vlastnostmi
- semikonzervativní - záměna za opačně nabitou aminokyselinu
- radikální - záměna za zcela odlišnou aminokyselinu

# Podle účinku mutované alely na množství nebo aktivitu enzymů

- **Hypomorfní** – z genu vzniká stejný produkt, ale v menším množství
- **Amorfní** – produkt genové exprese není funkční
- **Neomorfní** – produkt s novou funkcí
- **Antimorfní** – opačný účinek
- **Hypermorfní** – identický produkt ve vyšším množství

# Z evolučního hlediska

- **Mutace selekčně výhodné**- zvýší reprodukční schopnost daného genotypu vůči ostatním genotypům
- **Mutace neutrální** – neovlivňují reprodukční schopnosti hostitele
- **Mutace selekčně nevýhodné** – mohou vést k poruše až ztrátě funkce genu, snižují reprodukční schopnost nositelů mutace
- **Mutace letální** – jsou buď příčinou smrti jedince (plodu), nebo vedou pouze k ztrátě schopnosti se reprodukovat



# Poznámka k evoluci...

- Většina mutací je selekčně neutrálních, neprojevují se ve fenotypu
- Selekčně negativních mutací je více (než pozitivních)
- Rychlost evoluce je daná pouze frekvencí nových mutací a pravděpodobností jejich fixace působením genetického driftu

# Mutagenní faktory vnějšího prostředí



# Mutageny

- Faktory schopné způsobit mutace
- **Přímé mutageny** - působí mutagenně přímo
- **Nepřímé mutageny** - nepůsobí mutagenně přímo, nejprve musí být přeměněny (metabolizovány) na vlastní mutagenní formu, nebo vedou ke vzniku faktorů, které již jsou samy o sobě mutagenní

# Mutagenní faktory vnějšího prostředí

- **Fyzikální** – teplo, UV záření, ionizující záření (vznik chromozomových zlomů)
  - kosmické záření (protony, jádra helia, elektrony, neutrina)
  - radioaktivní prvky v půdě, atd.

# Mutagenní faktory vnějšího prostředí

- **Chemické**

- aromatické uhlovodíky (tabákový kouř, spalování)
- barviva - např. akridinová barviva
- organická rozpouštědla
- některé dříve běžně užívané látky - např. součásti plastů (PCB), hnojiv, herbicidů, insekticidů (DDT) nebo i léčiv
- bojové látky (yperit)

# Mutagenní faktory vnějšího prostředí

- **Chemické**
  - **duřitany** (sodný, draselný = **E249, E250**).
  - vznikají z nich **karcinogenní nitrosaminy** (souvislost s výskytem rakoviny tlustého střeva a konečníku)
  - smažené pokrmy (**akrylamid** vzniká při teplotách nad 100 °C)

# Rozdělení chemických mutagenů

- Mutageny působící **jen během replikace**:
- **Analogy bazí** = látky s podobnou chemickou strukturou jako baze nukleotidů
- během replikace se začleňují do DNA, čímž dochází (díky jejich odlišné struktuře) k chybnému párování bazí
- mutace vznikají jako důsledek těchto chyb
- př: 2-aminouracil a 5-bromouracil (5-BU je analog thyminu)

# Rozdělení chemických mutagenů

- Mutageny působící **jen během replikace** :
- **Akridinová barviva** – př. proflavin, akridinová modř
- dojde k posunu čtecího rámce, protože se inkorporují mezi pár bazí během replikace



# Rozdělení chemických mutagenů

- látky mutagenní při působení **i na nereplikující se DNA:**
- **Alkylační látky**
  - jsou zdrojem alkylových skupin
  - např. dusíkatý yperit
  - dojde ke změně párování bází
  - alkylační látky mohou vyvolat všechny známé typy mutací vč. chromosomálních zlomů a chromosomálních přestaveb

# Rozdělení chemických mutagenů

- látky mutagenní při působení **i na nereplikující se DNA:**
- **Deaminační látky**
  - principem je deaminace adeninu, guaninu a cytosinu
  - mění se schopnost baze vytvářet vodíkové můstky
  - dochází k tranzicím v obou směrech (C-G na A-T a také A-T na C-G)
- př. kyselina dusitá a dusitany

# Rozdělení chemických mutagenů

- látky mutagenní při působení **i na nereplikující se DNA:**
- **Oxidy dusíku**
  - vznik během spalování fosilních paliv
  - **Dusitany**
    - potravinářský průmysl (konzervanty)
  - **Hydroxylační činidla**
    - cytosin se může změnit na hydroxylaminocytosin
    - ten vytváří pár s adeninem → tranzice C-G na A-T

# Mutagenní faktory vnějšího prostředí

- **Biologické**
- Viry
  - některé viry (retroviry) se mohou začlenit do genetické informace infikované buňky
  - narušení sekvence strukturního genu, nebo jeho regulační oblasti, promotoru, ...
  - nesou vlastní onkogeny (DNA viry) nebo přenáší buněčné protoonkogeny (RNA viry)

RNA nádorové viry (retroviry)

RNA viru přepsána RT do DNA → integrace do genomu hostitelské buňky (replikace a transkripce v hostitelské buňce)

př: virus Rousova sarkomu

# Mutagenní faktory vnějšího prostředí

- **Biologické**
- Mobilní genomové elementy (transpozony a retrotranspozony)
  - mechanismus účinku je podobný retrovirům, tzn. inserce na místo v genomu, kde dojde k porušení sekvence strukturního genu, regulační oblasti, atd.

# Mutagenese

- Náhodná (nespecifické mutageny)
- Cílená (transpozony, atd.)
  
- Používá se ve výzkumu (pro odhalení funkce genů, studium jejich regulačních sekvencí), šlechtitelství

# Genotoxicita léčiv



# Genotoxicita

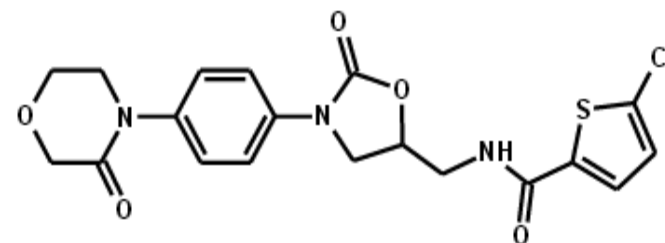
- Potenciální škodlivé účinky na genetický materiál
- Nečistoty v léčivech (meziprodukty jejich výroby, zbytková rozpouštědla, atd.)
- Léčiva (především cytostatika, radiofarmaka)
- Metabolity léčiv



# Genotoxické nečistoty v léčivech

## Rivaroxaban - modelové léčivo

- antikoagulancium (snížení srážlivosti krve = „ředění krve“)
- používá se:
  - k prevenci *žilní trombózy*, např. při náročných operacích, jako je celková výměna kyčelního nebo kolenního kloubu
  - k prevenci *mtvice* nebo systémové a plicní *embolie*
- výroba účinné látky probíhá vícestupňovou syntézou (konkrétně 6 stupňů)
- denní dávka léčiva se pohybuje od 10 do 20 mg denně

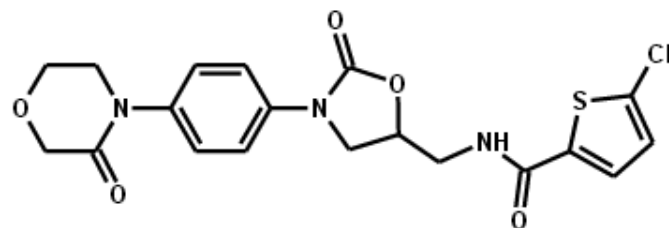


# Genotoxické nečistoty v léčivech

## Rivaroxaban - modelové léčivo

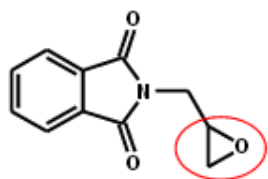
- v procesu výroby se vyskytují tyto potenciální genotoxiny:

### meziprodukty



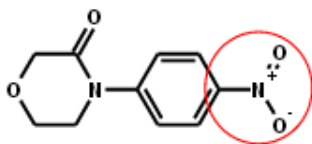
#### RIV1

M=203.05824



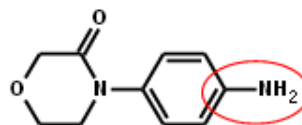
#### RIV22

M=222.06351



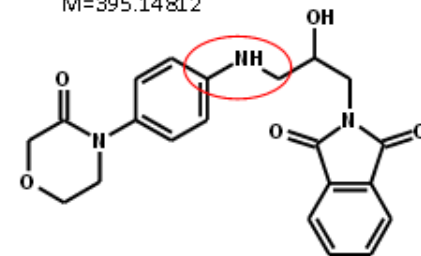
#### RIV2

M=192.08988



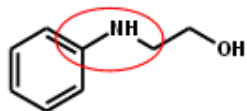
#### RIV3

M=395.14812



#### 2-anilinoethanol

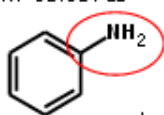
M=137.08406



surovina

#### anilin

M=93.05785



degradant suroviny

- jedná převážně o aromatické aminy, ale nachází se zde i o nitro sloučenina a epoxid

# Genotoxicita léčiv

- Rozdělení dle účinku na DNA:
- Alkylační činidla
- Platina a její deriváty
- Antimetabolity
- Inhibitory topoisomérázy a interkalační činidla

# Alkylační činidla

- jsou zdrojem alkylových skupin
- dochází k tvorbě kovalentních vazeb
- alkylace DNA způsobuje např. odloučení purinové báze, jedno i dvouřetězcové zlomy DNA, vnitřní vazby v řetězci či mezi řetězci
- dochází k poškození genetické informace
- účinnost alkylačních cytostatik je závislá na aktivitě reparačních mechanismů jednotlivých nádorových buněk

Př: chlorambucil, cyklofosfamid, ifosfamid

# Platina a její deriváty

- nealkylují v pravém slova smyslu – nemají alkylovou skupinu – pouze podobný účinek jako alkylační činidla
- váží se s DNA za vzniku interkalačních vazeb znemožňujících replikaci a reparační pochody

Př: Cisplatina, karboplatina, oxaliplatina

# Antimetabolity

- Analoga pyrimidinů
- inhibují thymidylát syntázu
- inhibují DNA polymerázu
- inhibují ribonukleotid reduktázy (Gemcitabin)
- inhibují metylaci DNA

Př: 5-fluorouracil, capecitabin, gemcitabin

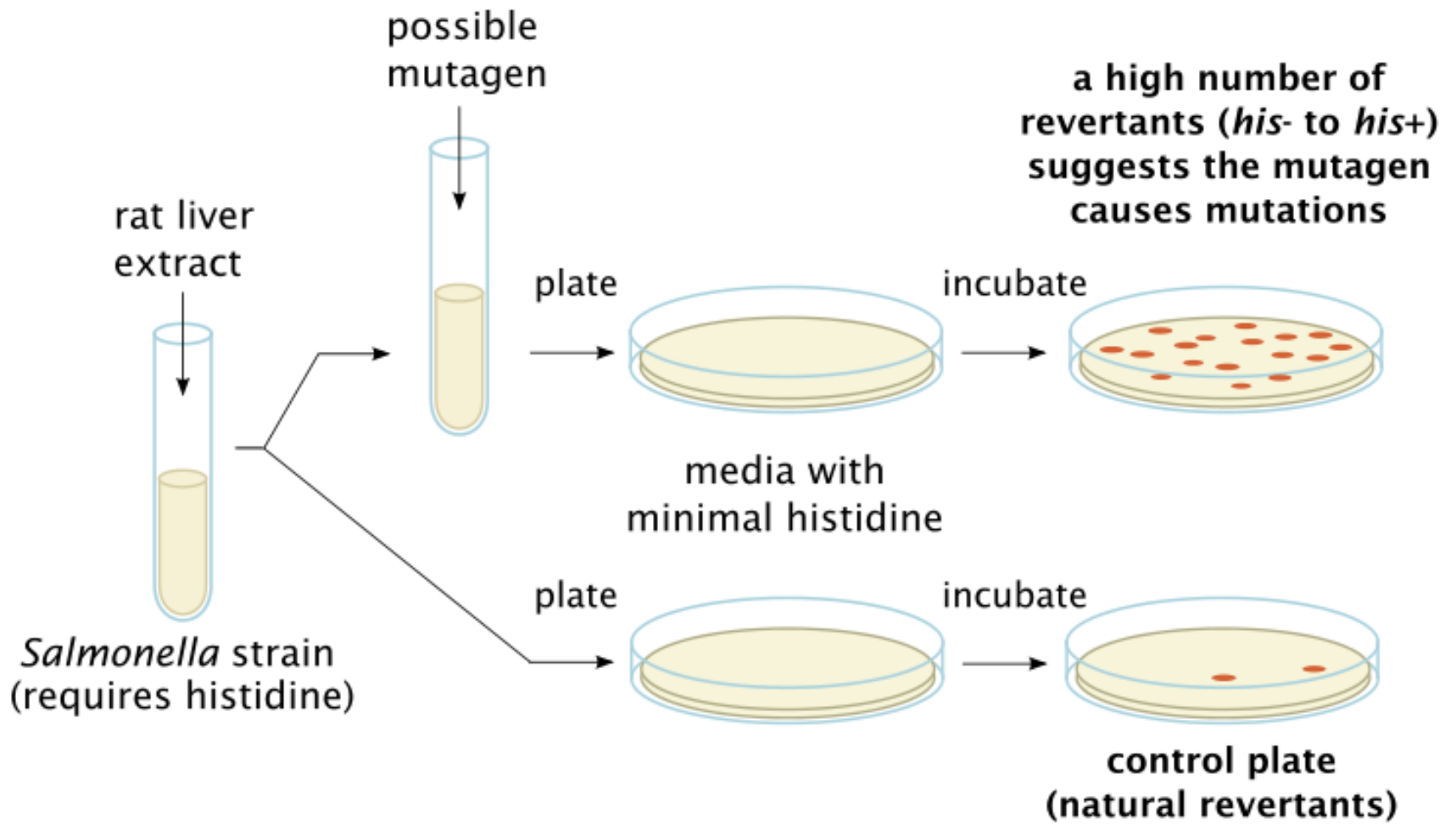
# Inhibitory topoizomerázy a interkalační činidla

- **Inhibitory topoizomerázy I**
  - Topotecan, Irinotecan
- **Inhibitory topoizomerázy II**
  - Etoposid
- **Inhibitory izomerázy II + interkalátory**
  - Antracykliny (antracyklinová ATB)
    - kmeny bakterií streptomyces
    - kromě inhibice T II působí též interkalačně
  - Doxorubicin, Epirubicin

# Testy genotoxicity

- *In vitro, in vivo*
- **Amesův test** (reverzní mutace u histidin-deficientních kmenů *Salmonella typhimurium*)
- SCE (testování výměny sesterských chromatid)
- **Micronucleus test** (působením mutagenů dochází k tvorbě chromozomových fragmentů bez centromer. Tyto *acentrické chromozomy* nejsou během mitózy zavzaty do jádra a v cytoplazmě vytváří tzv. mikrojádra)
- Další viz seminář z toxikologie 😊





# Vymezení pojmů

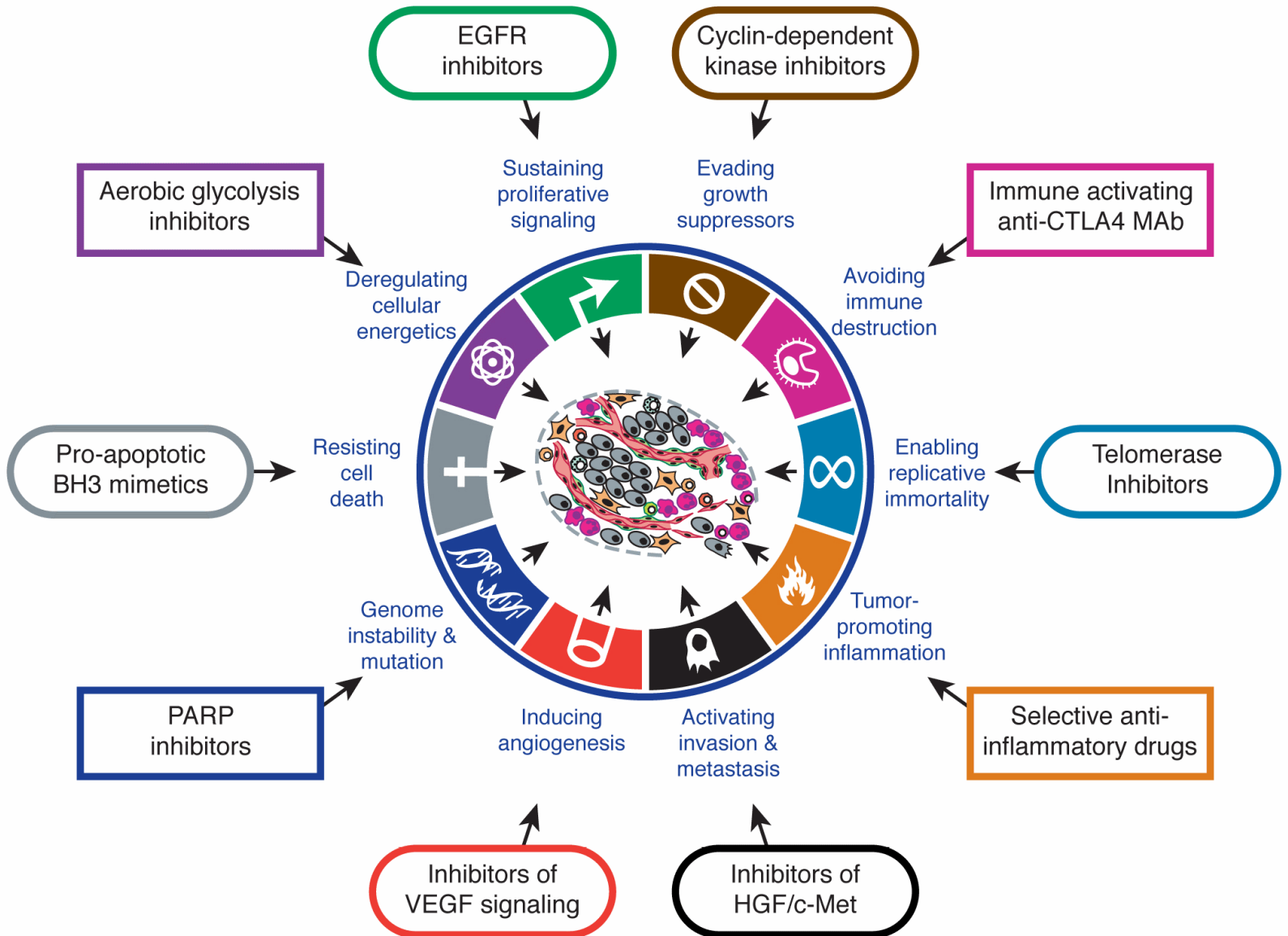
- **Mutageneze** – působením mutagenů dochází k poškození DNA
- **Teratogeneze** - poruchy prenatálního vývoje, které vedou ke vzniku vývojových vad
  - způsobena teratogeny:
    - fyzikální**- ionizující záření, vysoká teplota
    - chemické** - potenciálními teratogeny jsou všechny látky s mutagenním účinkem
- Contegran (Thalidomid) – malformace končetin, uší a další vady
- antiepileptika – až 10% riziko postižení plodu vrozenými vadami – rozštěpy rtu a patra, páteře
- antibiotika – streptomycin, tetracyklin
- cytostatika
- alkohol – fetální alkoholový syndrom (opozdění psychomotorického vývoje, neklid a dysmorfie obličeje – úzké oční štěrby, dlouhé philtrum)

# Vymezení pojmů

- **Teratogeneze**
- **biologické:**
- Infekce - největší riziko představuje primoinfekce matky a plodu na počátku gravidity
- přítomnost protilátek v krvi matky po prodělaném onemocnění nebo očkování před graviditou plod zpravidla před infekcí chrání
- virus zarděnek (postižení CNS, srdeční vady), herpes virus, cytomegalovirus, HIV
- toxoplazmóza (oční vady, poškození CNS), syfilis
- **Nemoci matky**
- diabetes mellitus
- fenylketonurie u matky

# Vymezení pojmů

- **Karcinogeneze**
- vznik a vývoj nádorů
- složitý několikastupňový proces
- podílí se genetické faktory + vlivy vnějšího prostředí
- u některých druhů nádorů se uplatňuje dědičná složka (mutace specifických genů), ale na rozvoj má vliv životní styl a faktory vnějšího prostředí
- každý karcinogen je mutagenem, ale ne u každého mutagenu byla prokázána karcinogenní aktivita!



# Onkogeny

- **protoonkogeny**
- geny s přirozenou funkcí - kontrola buněčného růstu a proliferace
- např. růstové faktory, jejich receptory, tyrozinkinázy
- proteiny regulující buněčné dělení
- proteiny zajišťující komunikaci a přenos signálu
  
- protoonkogen se mění na onkogen, pokud dojde např. k:
  - bodové mutací
  - chromozomální translokaci či inverzi
  - začlenění retroviru
  
- stačí změna v jedné kopii → mutace má DOMINANTNÍ charakter

# Tumor supresorové geny

- blokují růst buněk a jejich dělení
- kontrola buněčného růstu a proliferace
- pro ztrátu funkce nutná mutace v obou kopiích → mutace má RECESIVNÍ charakter
- Rb1
- retinoblastom (pokud je zde dědičná mutace a navíc dojde ještě k somatické mutaci, vzniká ztráta heterozygosity (LOH, loss of heterozygosity))
- TP53
- označován jako strážce genomu
- reguluje geny, které při poškození DNA zástaví buněčný cyklus

# Mutátorové geny

- geny pro reparaci DNA
- odpovídají za její opravení
- udržují stabilitu genomu
  
- pro ztrátu funkce nutná mutace v obou kopiích → mutace má RECESIVNÍ charakter



# Děkuji za pozornost

