



Mutageneza

1. **Mutacje jako źródło zmienności**
 - Definicja mutacji
 - Podział mutacji
2. Mutacje punktowe
3. Uszkodzenia DNA
4. Naprawa DNA
 - Bezpośrednia
 - Zależna od matrycy
5. Mutageny
 - Mutageny fizyczne
 - Mutageny chemiczne
6. Efekty działania mutagenów
 - Chimery
 - Efekty genetyczne



1. Mutacje jako źródło zmienności: definicja

Mutacje to zmiany dziedziczne w materiale genetycznym, które dostarczają nowej zmienności genetycznej niezbędnej do ewolucji.

- 1901: Hugo de Vries – mutacja to nagła zmiana dziedziczna, która nie wynika z rekombinacji.
- Mutacje są źródłem zmienności genetycznej. Bez mutacji geny istniałyby tylko w jednej postaci (jeden allel w locus). Organizmy nie mogłyby ewoluować.
- Mutacje są losowe tzn. nie wiadomo kiedy i gdzie mutacja zajdzie.
- Mutacje zachodzą u wszystkich grup organizmów żywych.



Oenothera lamarckiana – obiekt badań H. de Vries.



Kosodrzewina (*P. mugo*) prawdopodobnie powstała jako mutant karłowaty sosny błotnej (*P. uliginosa*).



Pokolenie M₁ owsa szorstkiego (*Avena strigosa*). Albinizm jest częstą mutacją u roślin.



Mutant grochu (*Pisum sativum*) o wydłużonych liściach.

Mutagenеза to proces, który prowadzi do powstawania mutacji. Mutant to organizm, u którego występuje mutacja.



1. Mutacje jako źródło zmienności: podział

Mutacje mogą wystąpić w dowolnej komórce i na dowolnym etapie rozwoju organizmu wielokomórkowego.

Miejsce powstania mutacji:

- Mutacje w komórkach szlaku płciowego:
 - nie występują u rodziców;
 - przekazywane są następnym pokoleniom;
 - mogą wystąpić na dowolnym etapie wytwarzania komórek rozrodczych.
- Mutacje somatyczne:
 - występują w komórkach somatycznych;
 - nie są przekazywane potomstwu;
 - prowadzą do powstania chimer.



Mutacje szlaku płciowego u grochu i jęczmienia (wst).



Mutacje somatyczne u grochu i owsa szorstkiego. Tylko część rośliny, np. fragment liścia, jest zmutowana.

Tylko mutacje w komórkach szlaku płciowego są przekazywane kolejnym pokoleniom.



1. Mutacje jako źródło zmienności: podział

Mutacje somatyczne są wykorzystywane w hodowli zwierząt, zwłaszcza koni, u których decydują o unikalności.



Mutacja somatyczna u psa.



Umaszczenie koni będące wynikiem mutacji somatycznych.



Mutacje somatyczne u świni domowej.

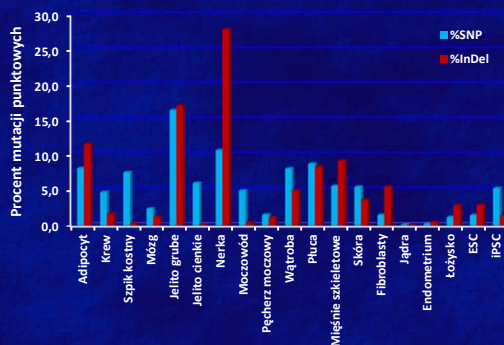


1. Mutacje jako źródło zmienności: podział

U człowieka wraz z wiekiem wzrasta liczba mutacji somatycznych w komórkach zdrowych tkanek.

Spektrum mutacji somatycznych w zdrowych tkankach człowieka

- W większości są to mutacje punktowe typu SNP (96%), rzadziej typu insercji/delecji - indel (4%).
- Wynikają z błędów w replikacji i naprawie DNA.
- Częstość w zdrowych tkankach jest znacznie niższa niż w nowotworowych, co utrudnia ich identyfikację.
- Każda komórka ma własne spektrum unikalnych mutacji, co wymaga stosowania metod analizy pojedynczych komórek.



Średnio 14 438 mutacji somatycznych występuje w różnych tkankach danej osoby. Najczęściej mutacje punktowe obserwuje się w jelicie grubym - 16% wszystkich SNP oraz 17% wszystkich InDel. Nerki charakteryzują się stosunkowo wysokim udziałem insercji i delecji - 28% wszystkich mutacji typu indel.

Częstość mutacji somatycznych, punktowych jest znacznie wyższa u osób palących oraz wystawionych na długotrwałe działanie UV.

Sun et al, 2021

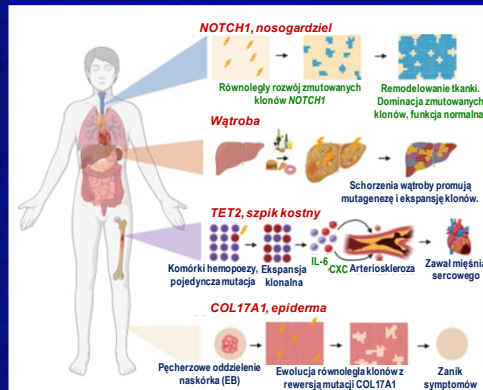


1. Mutacje jako źródło zmienności: podział

Większość mutacji somatycznych nie ma wpływu na organizm, niektóre jednak mogą prowadzić do powstania chorób.

Ewolucja somatyczna i równoległa

- **Ewolucja somatyczna:** akumulacja mutacji wpływających na przystosowanie zmutowanych komórek somatycznych.
- **Ewolucja równoległa:** kloni komórek z różnymi mutacjami mogą występować w danym organie jednocześnie.
- **Mutacje sterujące** występują w komórkach zdrowych tkanek, np. w 5% komórek jelita grubego, wątroby i prostaty.
- **Procesy te** mogą prowadzić do remodelowania tkanki i rozwoju chorób przewlekłych.



Przykłady ewolucji somatycznej dla genu *NOTCH1* (rodzina białek sygnałowych), *TET2* (dioksygenaza metylocytozyny), *COL17A1* (łańcuch kolagenu).

Mutacje sterujące (driver mutations): prowadzą do uzyskania przewagi selekcyjnej przez komórkę, często są przyczyną nowotworów.

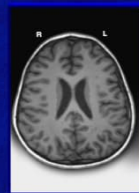
Olafsson i Anderson, 2021



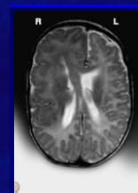
1. Mutacje jako źródło zmienności: podział

U człowieka mutacje somatyczne mogą być przyczyną zaburzeń rozwojowych i chorób neurodegeneracyjnych.

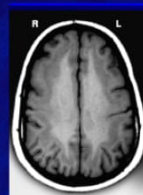
- **Zespół Proteusza:**
 - mutacja w genie *AKT1* w trakcie rozwoju embrionalnego;
 - następuje przyspieszony wzrost niektórych części ciała.
- **Zespół McCune-Albright'a:**
 - mutacja w genie *GNAS1* w trakcie rozwoju embrionalnego;
 - występują zmiany kostne, skórne i hormonalne.
- **Megalencefalia:**
 - mutacja w genach *AKT3*, *PIK3CA* w linii komórek nerwowych.
 - powiększony znacznie mózg, liczne problemy neurologiczne i psychiczne.



Obraz MRI (rezonans magnetyczny) prawidłowo ukształtowanego mózgu.



„Double cortex”, objawy epilepsji, spowodowane mutacją post-zygotyczną w genie *DCX*.



Megalencefalia, spowodowana mutacją postzygotyczną w genie *AKT3*.

Poduri et al. 2013



1. Mutacje jako źródło zmienności: podział

Mutacje mogą powstawać spontanicznie lub być indukowane za pomocą czynników fizycznych lub chemicznych.

Podział mutacji ze względu na czynnik wywołujący:

- Mutacje spontaniczne są wynikiem błędów naturalnych procesów biologicznych, np. replikacji DNA.
- Mutacje indukowane powstają pod wpływem czynników fizycznych lub chemicznych, które określa się mianem mutagenów.
- Mutacje insercyjne to mutacje wynikające z mobilizacji transpozonów. Mogą one być spontaniczne np. w warunkach stresowych lub indukowane.



Dreissena polymorpha: mutacja spontaniczna, punktowa: albinizm.



Pellia borealis: mutacja spontaniczna, autopoliploidyzacja.



Insercyjne mutanty *Danio rerio*, brak pigmentu (po lewej) oraz niedorozwój 3-dniowych embrionów (po prawej). (Golling et al., 2002)

Mutacje indukowane otrzymuje się najczęściej w warunkach sztucznych, ale mogą też powstawać w środowisku pod wpływem np. zanieczyszczenia.

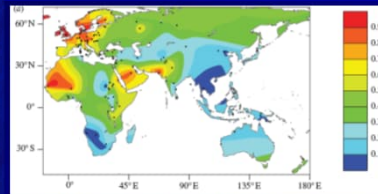


1. Mutacje jako źródło zmienności: podział

Mutacje spontaniczne są odpowiedzialne za tolerancję laktozy u człowieka umożliwiającą dorosłym trawienie mleka ssaków.

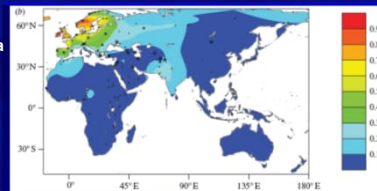
Tolerancja laktozy

- Cecha dominująca, autosomalna.
- 35% populacji toleruje laktozę, najwyższa częstość jest w Europie:
 - 62-86%: środkowa, zachodnia;
 - 89-96%: północna.
- Wywołana mutacjami punktowymi w genie *MCM6* kodującym wzmacniacz genu *LCT* (laktaza).
- Mutacje prawdopodobnie powstały w neolicie wraz z rozpowszechnieniem się hodowli zwierząt w Europie (rewolucja neolityczna).



Tolerancja laktozy na świecie (%).

Częstość allele 13910T genu *MCM6* związanego z tolerancją laktozy u dorosłych osobników.



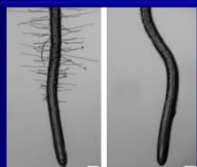
Mutacje warunkujące tolerancję laktozy zaszyły wielokrotnie w różnych regionach świata. W Europie tolerancja laktozy jest uwarunkowana allelem 13910T.

Gerbault et al., 2011



1. Mutacje jako źródło zmienności: podział

Mutacje mogą dotyczyć pojedynczych nukleotydów, kilku nukleotydów, fragmentów chromosomów i całych genomów.



Mutacja punktowa u *Arabidopsis thaliana* w genie *der-3*: brak włośników (Vaskebova 2018).

Podział mutacji ze względu na wielkość zmiany



Oenothera lamarckiana zawiera liczne mutacje chromosomowe (translokacje).

Punktowe:

- zmiany pojedynczych nukleotydów w sekwencji DNA;
- określamy je na poziomie DNA lub
- na podstawie efektów w łańcuchu polipeptydowym.

Chromosomowe:

- strukturalne: zmiany struktury pojedynczych chromosomów;
- liczbowe: zmiany liczby chromosomów.



Mutagenеза

1. Mutacje jako źródło zmienności

- Definicja mutacji
- Podział mutacji

2. Mutacje punktowe

3. Uszkodzenia DNA

4. Naprawa DNA

- Bezpośrednia
- Zależna od matrycy

5. Mutageny

- Mutageny fizyczne
- Mutageny chemiczne

6. Efekty działania mutagenów

- Chimery
- Efekty genetyczne

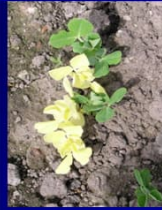


2. Mutacje punktowe: efekt fenotypowy

Mutacje punktowe prowadzą do powstania nowych alleli genów, które mogą być recesywne, dominujące lub kodominujące.

Mutacje neutralne to takie mutacje, które nie wpływają na wartość przystosowawczą, np.:

- mutacje zmieniające ruchliwość białka w polu elektrycznym - izoenzymy;
- niektóre mutacje punktowe w intronach i sekwencjach powtarzalnych.



Mutacje letalne u grochu i jęczmienia. Albinotyczne siewki giną po kilku dniach. Mutanta takiego można utrzymywać tylko w stanie heterozygotycznym.



Mutacja dominująca u *D. melanogaster*: dwie głowy.



Mutacja null (recesywna) w genie dehydrogenazy alkoholowej ryżu: brak aktywności w korzeniach (R), scutellum (S) i pędach (P). Brak efektów morfologicznych i fizjologicznych.



Zmiana ruchliwości esterazy 1 w homozygotycznych liniach jęczmienia (mutacja kodominująca). Brak efektów morfologicznych i fizjologicznych.

Efekty mutacji punktowych mogą być niezauważalne, ale także mogą prowadzić do znacznych zmian o charakterze letalnym.



2. Mutacje punktowe: częstość

Średnia częstość mutacji punktowych waha się od 10^{-11} do 10^{-6} na locus (lub nukleotyd) i na pokolenie i zależy od wielu czynników.

Gatunek	Częstość mutacji
<i>Escherichia coli</i>	$5,4 \times 10^{-10}$
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$3,3 \times 10^{-10}$
<i>Neurospora crassa</i>	$7,2 \times 10^{-11}$
<i>Drosophila melanogaster</i>	$3,5 \times 10^{-9}$
<i>Caenorhabditis elegans</i>	$9,1 \times 10^{-9}$
<i>Mus musculus</i>	$1,1 \times 10^{-7}$
<i>Homo sapiens</i>	$2,5 \times 10^{-8}$
<i>Arabidopsis thaliana</i>	$6,5 \times 10^{-9}$

Częstość mutacji w loci enzymatycznych - zmiana ruchliwości w polu elektrycznym (izoenzymy):



$1,28 \times 10^{-6}$



$3,6 \times 10^{-6}$



$6,0 \times 10^{-6}$

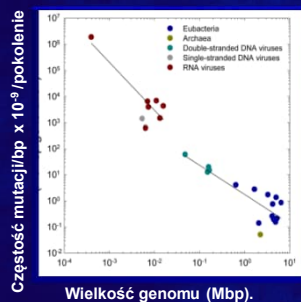
Częstość mutacji jest różna u różnych gatunków. Częstość mutacji neutralnych w loci enzymatycznych jest od 100 do 1000 razy wyższa od częstości średniej dla danego gatunku.

Drake et al., 1998;
Kondrashov et al, 2010;
Lynch 2010

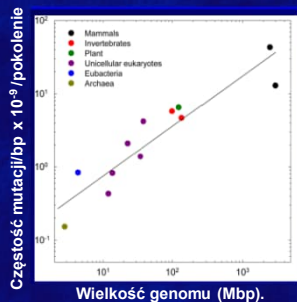


2. Mutacje punktowe: częstość

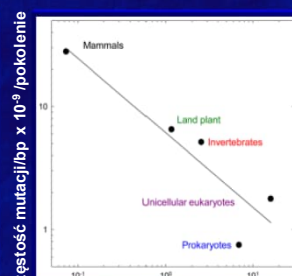
Średnia częstość mutacji punktowych, spontanicznych jest skorelowana z rozmiarami genomów oraz wielkością populacji.



U Prokariota częstość mutacji spada wraz ze wzrostem rozmiarów genomu.



U Eukariota częstość mutacji wzrasta wraz ze wzrostem rozmiarów genomu.



U Prokariota i Eukariota częstość mutacji spada wraz ze wzrostem wielkości populacji.

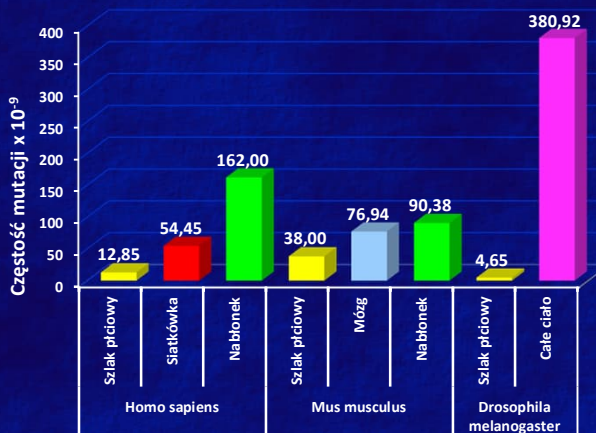
Wzrost częstości mutacji wraz ze zwiększaniem się rozmiarów genomów Eukariota może być związany z aktywnością transpozonów.

Lynch, 2010

2. Mutacje punktowe: częstość

Częstość mutacji różni się pomiędzy tkankami. Mutacje somatyczne są częstsze niż mutacje w komórkach szlaku płciowego.

- U człowieka i myszy najwyższą częstość mutacji zaobserwowano w nabłonku.
- Częstość mutacji w komórkach nerwowych myszy była tylko nieznacznie niższa od częstości mutacji w nabłonku.

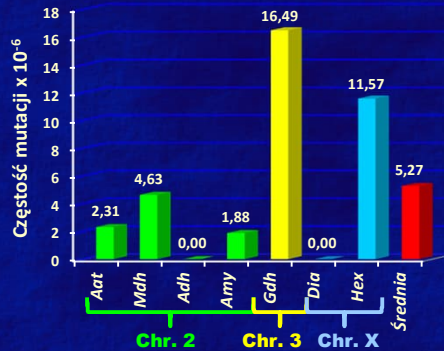


na podstawie Lynch, 2010

2. Mutacje punktowe: częstość

Częstość mutacji u danego gatunku różni się pomiędzy genami, chromosomami, regionami chromosomów.

- *Aat*: gen transaminazy asparaginianowej, uwalnia azot z aminokwasów.
- *Gdh*: gen dehydrogenazy glutaminowej, metabolizm azotu.
- *Mdh*: gen dehydrogenazy jabłczanowej, łańcuch oddechowy.
- *Adh*: gen dehydrogenazy alkoholowej.
- *Dia*: gen diaforazy, oksydoreduktaza.
- *Hex*: gen heksokinazy, fosforylacja węglowodanów.
- *Amy*: gen amylazy, hydroliza skrobi.



Częstość mutacji punktowych w loci enzymatycznych *Drosophila melanogaster*. (na podstawie Voelker et. al., 1979)

U *Drosophila melanogaster* częstość mutacji punktowych w loci enzymatycznych zlokalizowanych na chromosomie 2 jest na ogół niższa niż dla loci na chromosomach 3 i X.

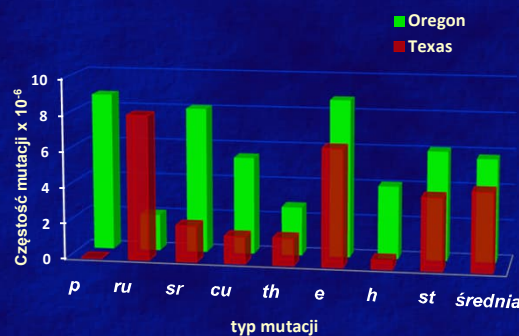


2. Mutacje punktowe: częstość

Częstość mutacji punktowych może nawet różnić się pomiędzy populacjami danego gatunku.

Geny *D. melanogaster* zlokalizowane na chromosomie 3:

- *p*: oczy brzoskwińowe,
- *ru*: oczy szorstkie,
- *sr*: oczy brązowe typu scarlett,
- *cu*: skręcone skrzydła (curled),
- *th*: nitkowate czułki (thread),
- *e*: ciało przydymione (sooty).
- *h*: ciało owłosione,
- *st*: ciało paskowane.



Częstość mutacji w loci warunkujących cechy morfologiczne w dwóch populacjach *D. melanogaster*.

Częstość mutacji różni się pomiędzy loci zlokalizowanymi na jednym chromosomie. Geny wpływające na daną cechę (np. kolor oczu) też charakteryzują się różną częstością mutacji.

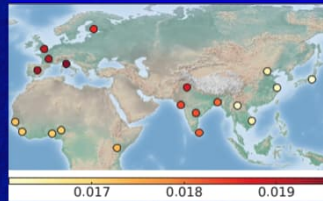


2. Mutacje punktowe: tempo

Populacje ludzkie na różnych kontynentach różnią się spektrum mutacji. Różnice występują także w obrębie kontynentów.

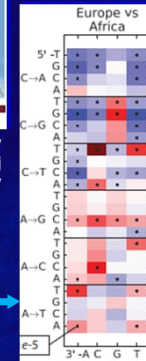
Tempo mutacji w populacjach ludzkich

- U człowieka tempo mutacji jest niższe niż u szympanów i goryli.
- W populacjach europejskich mutacje najczęściej występują w sekwencjach: TCC, TCT, CCC, ACC.
- W populacjach nieafrykańskich częściej występuje mutacja typu C/G → A/T niż A/T → C/G.
- Każda grupa etniczna ma unikalny zestaw alleli w genach odpowiedzialnych za replikację, rekombinację i naprawę. Różnice te wpływają na częstość i spektrum mutacji.



Częstość mutowania sekwencji TCC w kierunku TTC. Mutacja najczęściej występuje w Europie Zachodniej oraz w Indiach.

Porównanie spektrum mutacji w Europie i w Afryce. Kolor czerwony wskazuje na wyższą częstość mutacji w Europie niż w Afryce.



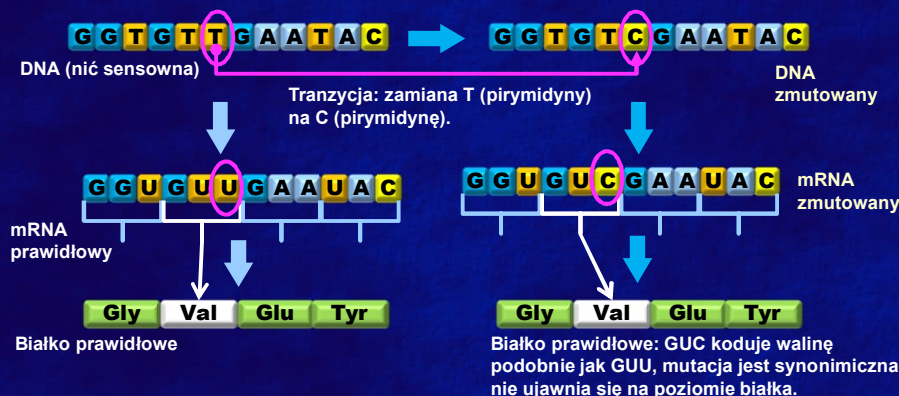
W populacjach europejskich tempo mutacji gwałtownie wzrosło w okresie między 15 000 do 2000 lat temu.

Harris i Pritchard 2017



2. Mutacje punktowe: substytucje

Tranzycja: substytucja (zamiana) nukleotydu w DNA w obrębie jednej grupy zasad: w obrębie pirymidyn lub w obrębie puryn.

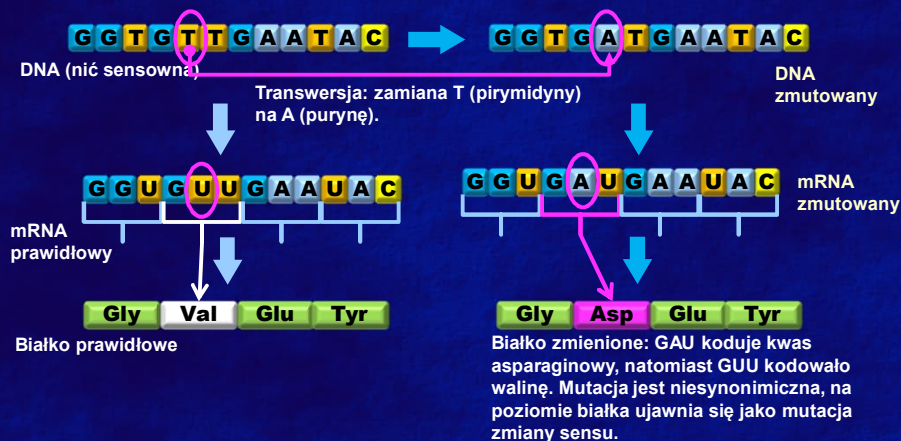


Mutacje synonimiczne: substytucja nukleotydów prowadzi do powstania kodonu, który koduje ten sam aminokwas – nie zmienia się łańcuch polipeptydowy.



2. Mutacje punktowe: substytucje

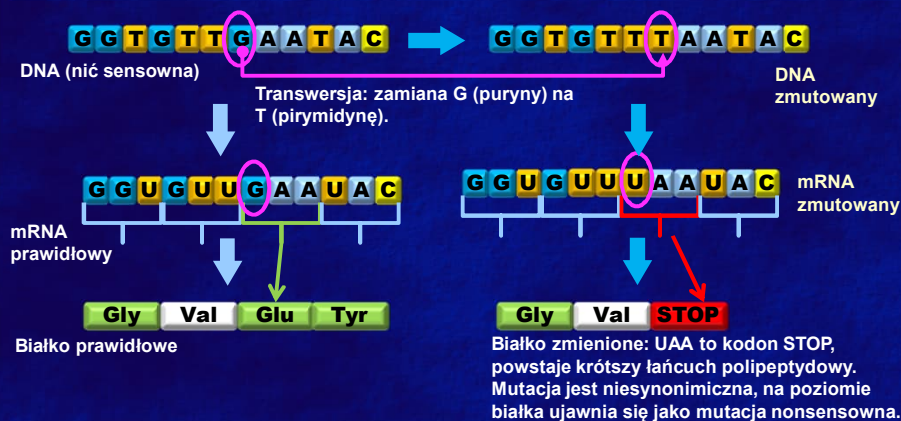
Transwersja: substytucja (zamiana) nukleotydu w DNA pomiędzy grupami – puryn w pirymidyny lub odwrotnie.



Mutacje niesynonimiczne: substytucja nukleotydów prowadzi do powstania kodonu, który koduje inny aminokwas – zmienia się łańcuch polipeptydowy. Na poziomie białka jest to mutacja zmiany sensu.

2. Mutacje punktowe: substytucje

Tranzycje i transwersje mogą prowadzić do skrócenia łańcucha polinukleotydowego jeżeli w ich wyniku powstanie kodon STOP.



Mutacje nonsensowne: mutacje niesynonimiczne, substytucje, w których kodon odpowiadający za aminokwas zmienia się w kodon STOP, co powoduje skrócenie łańcucha polipeptydowego.

2. Mutacje punktowe: substytucje

Substytucje są wynikiem zmiany pozycji atomu wodoru w zasadzie azotowej. Jest to przesunięcie tautomeryczne.

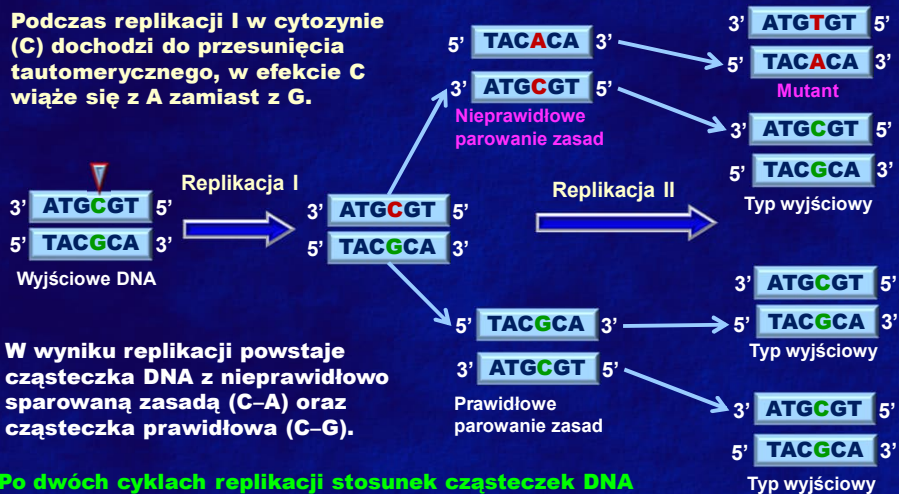


Zasady azotowe w DNA nie są strukturami statycznymi. U wszystkich może zaistnieć przesunięcie tautomeryczne.

2. Mutacje punktowe: substytucje

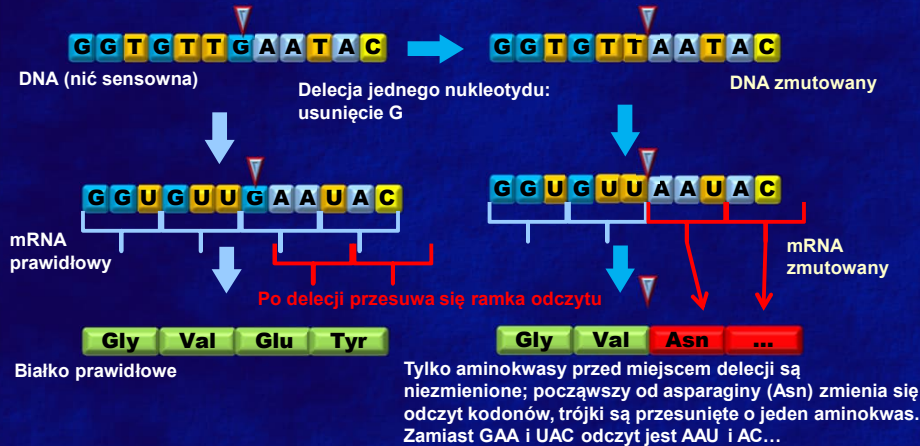
Jeżeli przesunięcie tautomeryczne zaistnieje podczas replikacji to może ono doprowadzić do błędnego parowania zasad i mutacji.

Podczas replikacji I w cytozynie (C) dochodzi do przesunięcia tautomerycznego, w efekcie C wiąże się z A zamiast z G.



2. Mutacje punktowe: insercje i delecje

Insercja polega na wstawieniu nukleotydu do łańcucha DNA, natomiast delecja to usunięcie nukleotydu z DNA.



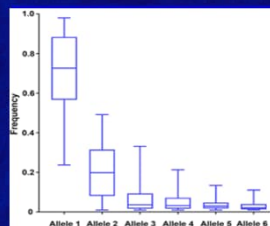
Insercje i delecje prowadzą do zmiany ramki odczytu, co oznacza, że na prawo od miejsca mutacji wszystkie aminokwasy są zmienione.

2. Mutacje punktowe: insercje i delecje

Insercje i delecje występują rzadziej niż substytucje, ale odpowiadają za większość różnic między gatunkami.

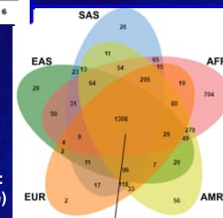
Delecje i insercje (indel) w genomie ludzkim

- Polimorfizm indeli - warianty alleliczne powstają w wyniku kilku insercji w tej samej pozycji genomu.
- Polimorficzne indele mają 3-6 alleli. Polimorficzne indele najczęściej występują w obrębie retrotranspozonów (LTR, SINE, LINE) oraz intronów.
- Substytucje (SNP) częściej występują w pobliżu polimorficznych indeli.
- Indele rzadziej występują na chromosomie X.



Częstość polimorficznych indeli w globalnej populacji ludzkiej. Średnia częstość indeli monomorficznych wynosi 0,73, polimorficznych z dwoma allelami - 0,20.

Populacje ludzkie są zróżnicowane pod względem występowania polimorficznych indeli. EUR: populacje europejskie. EAS: populacje wschodnioazjatyckie. SAS: populacje południowoazjatyckie. AFR: populacje afrykańskie. AMR: populacje amerykańskie (natywne)



Delecje są bardziej szkodliwe niż insercje. W genomie ludzkim delecje występują rzadziej niż insercje.

Yao i inni, 2022.

2. Mutacje punktowe: podsumowanie

Mutacje punktowe typu substytucji (tranzycje i transwersje) prowadzą do powstawania SNP (single nucleotide polymorphism).

Mutacja na poziomie DNA	Mutacja na poziomie białka			
	Synonimiczne	Niesynonimiczne		
		Zmiany sensu	Nonsensowna	Zmiana fazy odczytu
Tranzycja	+	+	+	-
Transwersja	+	+	+	-
Insercja* (n ≠ 3k) k ∈ N	-	-	-	+
Delecja* (n ≠ 3k) k ∈ N	-	-	-	+

*Dla k = 3 lub wielokrotność 3 (3k): insercja lub delecja trzech lub wielokrotności trzech nukleotydów, nie występuje zmiana fazy odczytu.

Mutacje punktowe typu insercji i delecji są często identyfikowane łącznie jako „indel”.



Mutagenеза

1. Mutacje jako źródło zmienności

- Definicja mutacji
- Podział mutacji

2. Mutacje punktowe

3. Uszkodzenia DNA

4. Naprawa DNA

- Bezpośrednia
- Zależna od matrycy

5. Mutageny

- Mutageny fizyczne
- Mutageny chemiczne

6. Efekty działania mutagenów

- Chimery
- Efekty genetyczne



3. Uszkodzenia DNA

Uszkodzenia DNA to błędy w strukturze chemicznej DNA, które powstają pod wpływem środowiska i procesów metabolicznych.

■ **Uszkodzenia struktury DNA:**

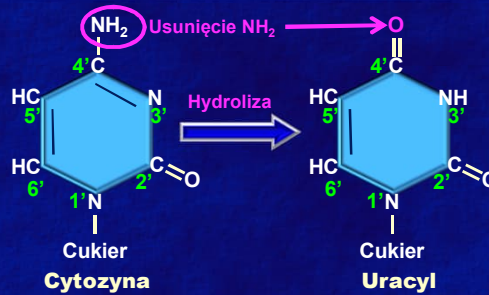
- przerwanie pojedynczej nici pod wpływem aktywnych form tlenu;
- przerwanie podwójnej helisy.

■ **Zmiany chemiczne w DNA:**

- metylacja zasad (alkilacja) przez tworzenie metyloguaniny;
- hydroliza, która prowadzi do deaminacji (usunięcia NH₂), depurynacji i depirymidynacji.

■ **Zmiany sekwencji DNA:**

- wstawienie błędnego nukleotydu podczas replikacji.



Deaminacja cytozyny: prowadzi do powstania uracylu, który nie jest akceptowany w DNA. Jeżeli DNA nie jest naprawione to łańcuch pęka.

Uszkodzenia DNA najczęściej obejmują przerwanie łańcucha DNA, brak zasady azotowej lub jej chemiczną zmianę.



3. Uszkodzenia DNA

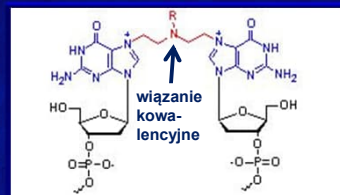
U ssaków uszkodzenia w DNA powstają z częstością 10⁴-10⁶ uszkodzeń w komórce w ciągu doby.

Typ uszkodzenia	Liczebność
Pęknięcie jednej nici DNA	50 000
Depurynacja	10 000
Alkilacja zasad	5 000
Uszkodzenie oksydacyjne	2 000
Deaminacja	600
Sięciowanie (cross-linking)	10
Pęknięcie podwójnej nici	10

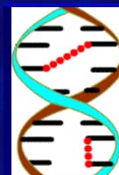
Ambekar et al., 2017

U człowieka obserwuje się średnio 5 x 10⁴ wszystkich uszkodzeń w komórce w ciągu dnia, czyli 2000 ~uszkodzeń w ciągu godziny.

Sięciowanie (DNA cross-linking): tworzenie wiązań kowalencyjnych pomiędzy nukleotydami jednego łańcucha DNA lub pomiędzy dwoma komplementarnymi łańcuchami DNA (interstrand cross-linking, ICL).



Przykład sieciowania (cross-linking) między dwoma guaninami: G-G.



Sięciowanie (cross-linking) między dwoma łańcuchami DNA.

Sięciowanie (cross-linking) w obrębie jednego łańcucha DNA.




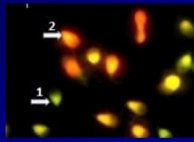
3. Uszkodzenia DNA

Organizmy mają zdolność naprawy uszkodzeń w DNA. Jeżeli uszkodzenia nie są naprawione to prowadzą one do mutacji.

Niektóre czynniki egzogenne wywołujące uszkodzenia w DNA:

- **Akroleina:** przyłącza się do guanozyny w DNA tworząc 3-pierścieniowy produkt i powodując pęknięcie łańcucha.
- **1,3-butadien:** redukuje metylację DNA i histonów.
- **Formaldehyd:** powoduje sieciowanie (cross-linking) w DNA.
- **Akrylonitryl:** powoduje stres oksydacyjny i deaminację.

Sperma palacza: DNA barwione oranżem akrydynowym: barwa zielona - DNA prawidłowy; czerwona - uszkodzony.



Czynnik	Zawartość [µg]
Akroleina	~130
1,3-butadien	~110
Formaldehyd	~70
Akrylonitryl	~40

Zawartość czynników uszkadzających DNA w papierosach.

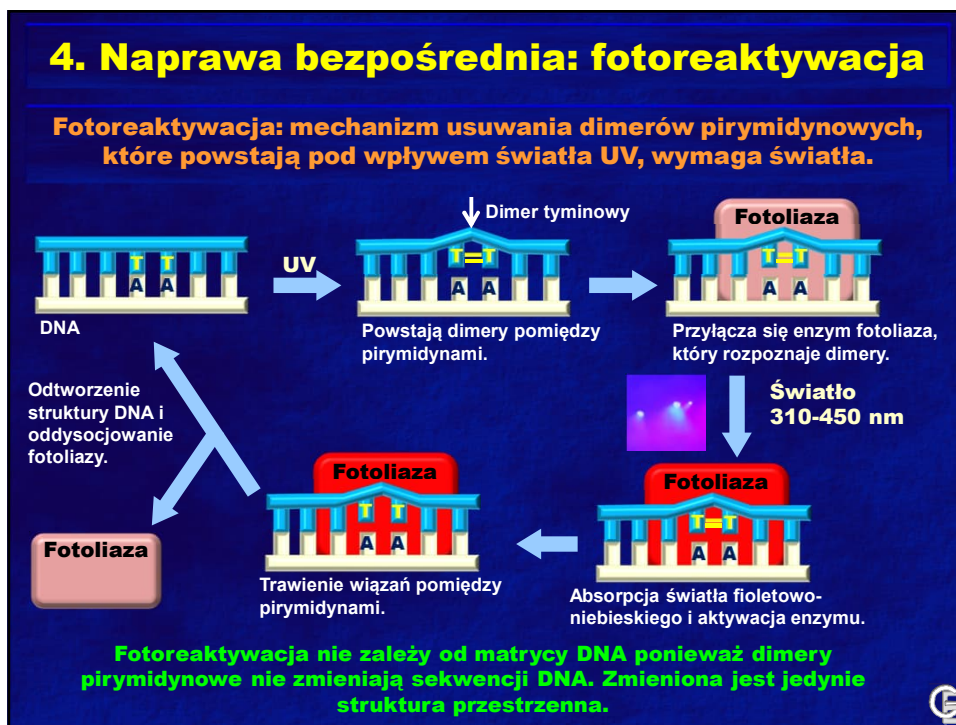
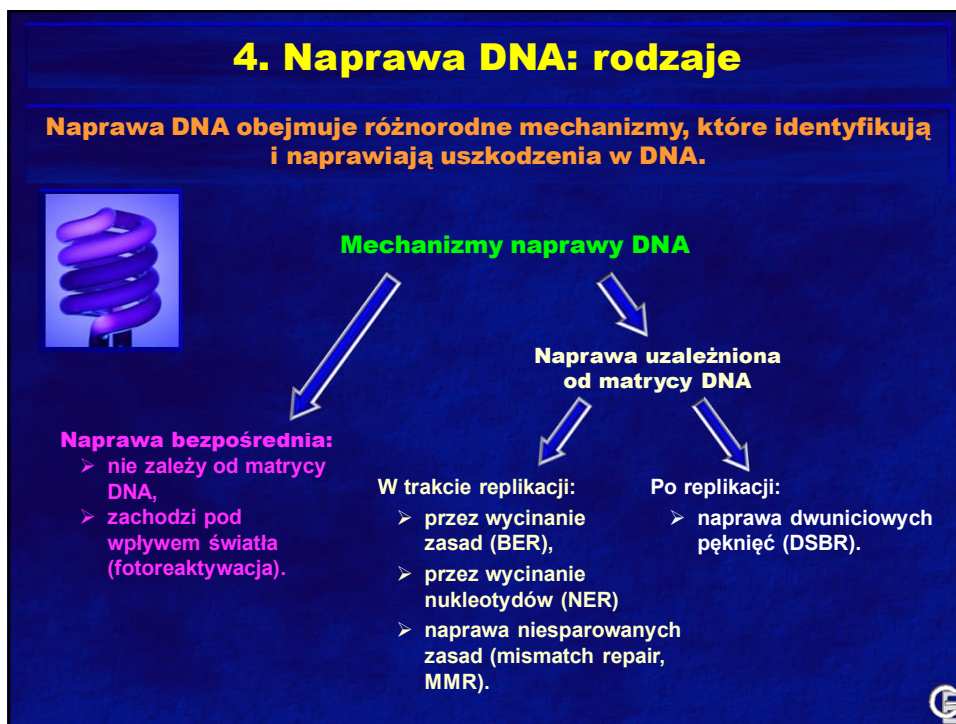
W papierosach zidentyfikowano 5 300 różnych związków, z których 150 uszkadza DNA.

na podstawie Bernstein i Prasad, 2013

Mutagenеза

1. Mutacje jako źródło zmienności
 - Definicja mutacji
 - Podział mutacji
2. Mutacje punktowe
3. Uszkodzenia DNA
4. **Naprawa DNA**
 - Bezpośrednia
 - Zależna od matrycy
5. Mutageny
 - Mutageny fizyczne
 - Mutageny chemiczne
6. Efekty działania mutagenów
 - Chimery
 - Efekty genetyczne





4. Naprawa bezpośrednia: fotoreaktywacja

Fotoreaktywacja występuje u większości organizmów żywych i jest ewolucyjnie starym mechanizmem chroniącym przed UV.

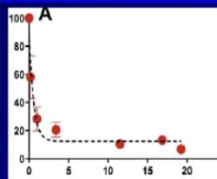


Acropora millepora: zagrożony gatunek koralowca występujący w płytkich wodach tropikalnych Pacyfiku.

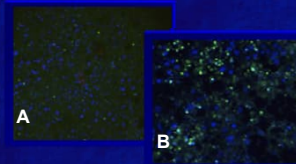


Larwy

- Larwy były narażone na promieniowanie UV-B o mocy 4 W przez 1 h.
- Po 19 h poziom dimerów pirymidynowych spadł <20% u larw przebywających na świetle.
- Największa aktywność fotolizazy i spadek dimerów pirymidynowych wystąpił około 5 h po stresie UV.



Procent dimerów pirymidynowych w czasie od 0 do 19 h po ekspozycji na promieniowanie UV-B.



Porównanie przeżywalności larw na świetle (A) i w ciemności (B). Niebieskie - jądra żywych komórek; zielone -wskazują martwe komórki.

Fotoreaktywacja jest szczególnie istotna u organizmów narażonych na zwiększone promieniowanie UV, np. na dużych wysokościach lub w płytkich i ciepłych wodach tropikalnych.

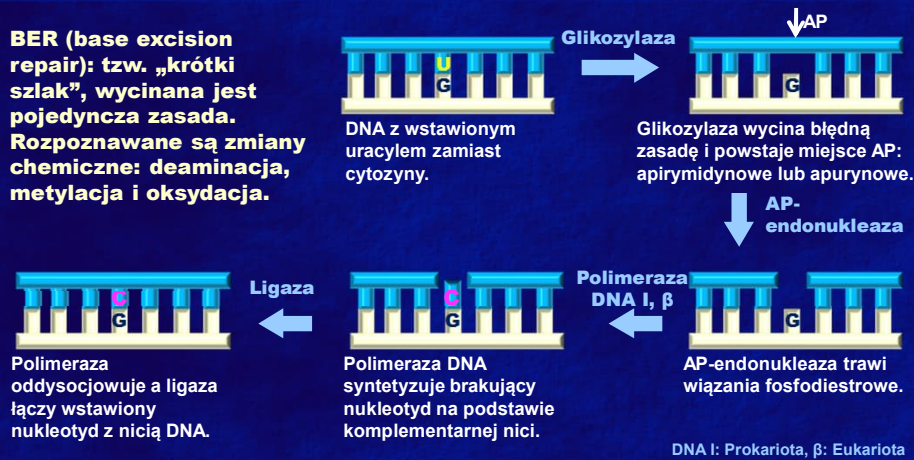
Reef et al., 2009



4. Naprawa zależna od matrycy: BER

Naprawa przez wycinanie zasad nie wymaga światła, zachodzi podczas replikacji i polega na wycięciu błędnej zasady (BER).

BER (base excision repair): tzw. „krótki szlak”, wycinana jest pojedyncza zasada. Rozpoznawane są zmiany chemiczne: deaminacja, metylacja i oksydacja.



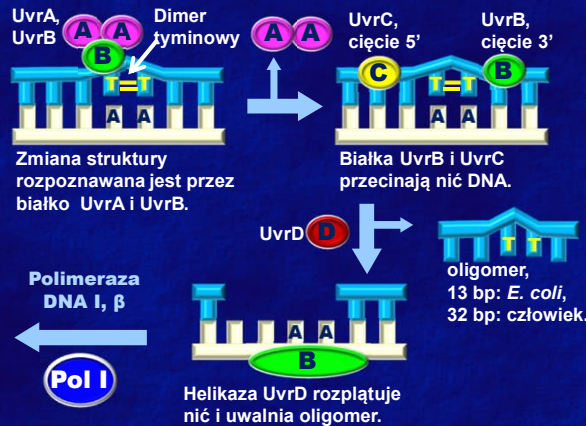
W 80% przypadków błędne zasady są usuwane w szlaku BER. W 20% naprawa polega na wycięciu dłuższego fragmentu nukleotydów (NER).



4. Naprawa zależna od matrycy: NER

Wycinanie nukleotydów (NER) nie wymaga światła, zachodzi podczas replikacji i polega na wycięciu 13-32 nukleotydowego oligomeru.

NER (nucleotide excision repair): tzw. „długi szlak”. Rozpoznawane są zmiany w strukturze przestrzennej wywołane dimerami, substancjami interkalującymi (np. bromkiem etydyny).

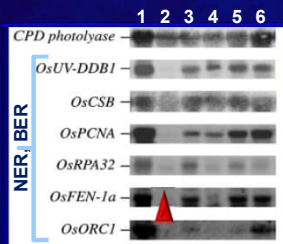


Mechanizm NER jest podobny u Prokariota i Eukariota. U Eukariota zaangażowane jest 4-krotnie więcej enzymów.

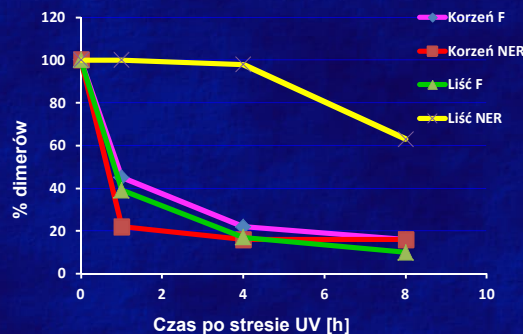


4. Naprawa zależna od matrycy: dimery ...

Dimery pirymidynowe, które powstają pod wpływem UV mogą być usuwane poprzez fotoreaktywację lub wycinanie nukleotydów (NER).



U ryżu geny związane z fotoreaktywacją są aktywne we wszystkich organach. Geny dla BER i NER odpowiedzialne za wykrywanie dimerów nie są aktywne w dojrzałych liściach. (1: słożek wzrostu pędu; 2: liść dojrzały; 3: liść młody; 4: liść flagowy; 5: wiechy; 6: korzenie).



Porównanie efektywności fotoreaktywacji (F) i NER w dojrzałych liściach i korzeniach ryżu. NER w liściach nie jest efektywne.

Mechanizmy naprawy dimerów pirymidynowych zależą od dostępu do światła (fotoreaktywacja), organu i fazy rozwojowej.

Kimura et al., 2004

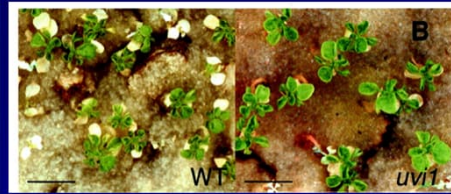


4. Naprawa zależna od matrycy: dimery ...

U ssaków fotoreaktywacja nie występuje. Dimery usuwane są głównie przez wycinanie nukleotydów (NER).



Xeroderma pigmentosum: wrażliwość na światło słoneczne związana jest z mutacjami w genach szlaku NER odpowiadających za rozpoznanie dimerów (XPA), wycinanie (XPF, XPG) oraz usuwanie oligomeru (XPB, XPD).



Przykład mutantu (po prawej) *Arabidopsis thaliana* odpornego na promieniowanie UV dzięki zwiększonej aktywności enzymów NER rozpoznających dimery.

Mutacje w genach szlaku naprawy DNA u człowieka prowadzą do zwiększonej wrażliwości na promieniowanie słoneczne.



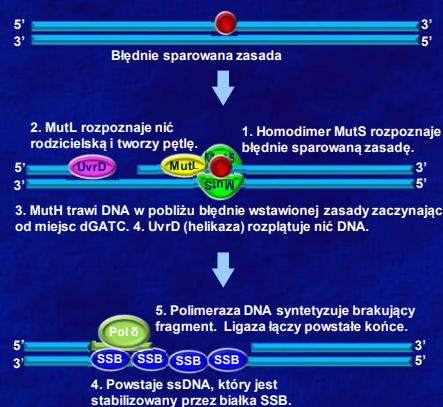
4. 4. Naprawa zależna od matrycy: MMR

MMR (mismatch repair): system rozpoznawania i naprawy błędnie sparowanych zasad podczas replikacji lub rekombinacji.

Funkcja MMR

- Polega na insercji lub delecji błędnie wstawionych zasad.
- Stanowi uzupełnienie właściwości korektorskich polimeraz i dotyczy par zasad „niezauważonych” przez polimerazę.
- Uczestniczy w eliminacji komórek, które zawierają wiele uszkodzeń DNA, tym samym zapobiega mutagenecie i kancerogenezie.
- Jest elementem szlaku sygnałowego związanego z uszkodzeniami DNA.
- Uczestniczy w tworzeniu przeciwciał.

Mechanizm MMR jest konserwatywny u wszystkich organizmów żywych i odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu stabilności genomu.



Model MMR u Eukariota

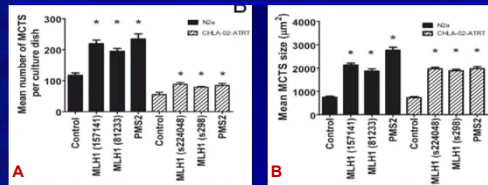


4. Naprawa zależna od matrycy: MMR

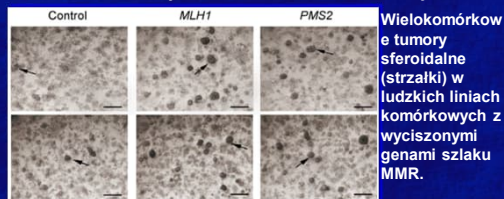
Uszkodzenia MMR podnoszą częstość mutacji w genach zawierających krótkie powtórzenia (SSR) w regionie kodującym.

Fenotyp mutatorowy

- Jest to fenotyp uwarunkowany mutacjami w genach związanych z MMR.
- Fenotyp mutatorowy wpływa na cały genom, destabilizując go poprzez znaczny wzrost częstości mutacji.
- Fenotyp mutatorowy może prowadzić do mutacji promujących rozwój nowotworów, np. rak jelita grubego często jest związany z mutacjami w czynniku *TGF-β RII* w komórkach z uszkodzonym mechanizmem MMR.



Wyciszenie genów szlaku MMR, *MLH1* oraz *PMS2* powoduje wzrost liczby (A) i rozmiarów (B) wielokomórkowych tumorów sferoidalnych w ludzkich liniach komórkowych.



Uszkodzenia mechanizmu MMR prowadzą do niestabilności genomu, zaburzeń mejozy, sterylności oraz nowotworów, np. jelita grubego.

Collins et al., 2011

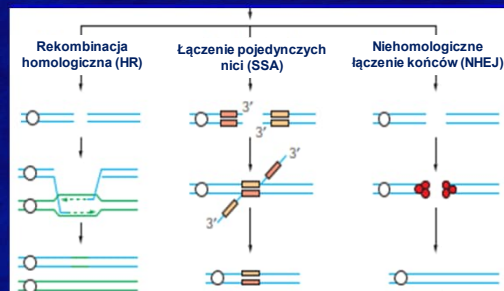


4. Naprawa zależna od matrycy: DSBR

DSBR to naprawa uszkodzeń obejmujących obie nici DNA (DSB). Przerwanie ciągłości DNA może prowadzić do śmierci komórki.

Mechanizmy DSBR

- Naprawa przez rekombinację homologiczną (HR): wymaga homologii, występuje u diploidów, polega na inwazji uszkodzonego DNA do homologicznego dupleksu DNA. Odbywa się poprzez replikację.
- Naprawa przez niehomologiczne łączenie końców nie wymaga homologii, u ssaków zależy od kompleksu białka Ku z DNA-zależną kinazą białkową. Może to być proste połączenie dwóch tępych końców lub połączenie dwóch lepkich końców (NHEJ)



HR: inwazja uszkodzonego DNA do prawidłowej, homologicznej cząsteczki DNA, replikowanie brakujących fragmentów i połączenie, zależy od białka Rad51 i Rad52. SSA: zachodzi między homologicznymi fragmentami DNA, wymaga Rad52, związana z degradacją niepołączonych fragmentów i utratą materiału genetycznego. NHEJ: łączy dwa przerwane fragmenty, w pierwszym etapie białko Ku łączy się z końcami, potem powstaje kompleks Ku z kinazą białkową (DNA-PKcs).

Nieprawidłowa naprawa uszkodzeń obu nici DNA prowadzi do aberracji chromosomowych i niestabilności genomu.



4. Naprawa DNA: podsumowanie

Organizmy żywe wytworzyły szereg mechanizmów umożliwiających naprawę uszkodzeń w DNA.

Mechanizm naprawczy	Przykład uszkodzeń	Czynnik wywołujący	Sposób naprawy
Foto-reaktywacja	Dimery pirymidynowe	UV	Usuwanie wiązań między dimerami, brak u ssaków
NER	Dimery pirymidynowe, uszkodzenia DNA	UV, związki policykliczne węgla	Usuwanie kilkunastu uszkodzonych nukleotydów, zastąpienie prawidłowymi
BER	Oksydacja zasad, uszkodzenie pojedynczej nici	ROS, X, czynniki alkilujące	Usuwanie uszkodzonej zasady, zastąpienie prawidłową
MMR	Brak parowania A-G, T-C, indel	Błąd replikacji	Usunięcie fragmentu uszkodzonej nici i zastąpienie prawidłową
DSBR	Uszkodzenie obu nici, siecowanie	X, promieniowanie jonizujące	Rozplecenie DNA, rekombinacja lub połączenie



4. Naprawa DNA: podsumowanie

Zaburzenia w mechanizmach naprawy DNA prowadzą do chorób nowotworowych, neurologicznych, immunologicznych i innych.

Typ zaburzenia	Nazwa	Mechanizm naprawy	Zmutowany gen	Częstość [%]	Fenotyp
Nowotwór	Rak piersi i jajnika	HR	<i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i>	0,2	Rak piersi i/lub jajnika
Neurologiczne	Zespół Cockayne'a	NER	<i>CSA</i> , <i>CSB</i> , <i>XPB</i> , <i>XPD</i> , <i>XPG</i>	0,0004	Mikrocefalia, demielinizacja, neurodegeneracja
Starzenie	Ataksja-teleangiectazja	DSBR	<i>ATM</i>	0,001-0,0025	Ataksja mózdkowa, osłabienie mięśni
Starzenie	Zespół Wernera	BER	<i>WRN</i>	0,0005	Zaćma, siwienie, zaburzenia skórne
Immunologiczne	Syndrom lizazy IV	NHEJ	<i>LIG4</i>	Rzadki	Hypogammaglobulinemia, limfopenia

am 2021



Mutageneza

1. Mutacje jako źródło zmienności
 - Definicja mutacji
 - Podział mutacji
2. Mutacje punktowe
3. Uszkodzenia DNA
4. Naprawa DNA
 - Bezpośrednia
 - Zależna od matrycy
5. **Mutageny**
 - Mutageny fizyczne
 - Mutageny chemiczne
6. Efekty działania mutagenów
 - Chimery
 - Efekty genetyczne



5. Mutageny: podział

Mutagen: czynnik, który indukuje uszkodzenia w DNA i w ten sposób podnosi częstość mutacji ponad poziom typowy dla organizmu.

Czynniki mutagenne

Czynniki fizyczne

Promieniowanie jonizujące:
➢ Korpuskularne – strumień cząstek, np. promieniowanie α , β , neutronowe, protonowe;
➢ Nie-korpuskularne – fale energetyczne, np. promieniowanie X, gamma.

Promieniowanie niejonizujące, np. UV-A (315-400 nm), UV-B (280-315 nm).


Czynniki chemiczne

Alkilujące, np. gaz musztardowy, EMS, MMS, EMU, NMU

Środki interkalujące, np. barwniki akrydynowe, proflawina, bromek etydyny

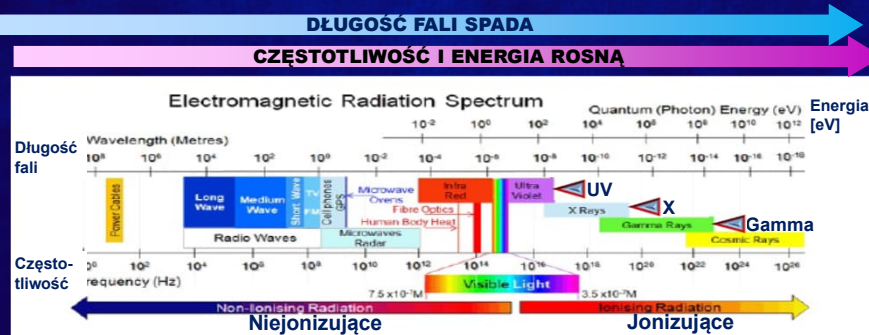
Analogi zasad, np. 5-bromouracyl

Spektrum mutacji powstałych pod wpływem mutagenów nie różni się od mutacji spontanicznych. Głównym efektem działania mutagenu jest podniesienie częstości mutacji co najmniej o rząd wielkości.



5. Mutageny: fizyczne

Promieniowanie: emisja energii w formie fal lub cząstek, które przemieszczają się w przestrzeni lub ciele fizycznym.



Promieniowanie niejonizujące: nie wywołuje powstawania jonów, energia zbyt mała aby oderwać elektron od atomu.

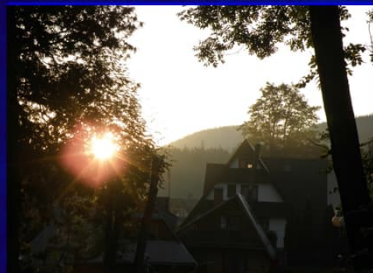
Promieniowanie jonizujące: wywołuje jonizację przez oderwanie elektronu od atomu lub cząsteczki.

IAEA uznaje światło UV za granicę pomiędzy typami promieniowania. UV-A (315-400 nm) i UV-B (280-315 nm) zalicza się do promieniowania niejonizującego, a UV-C (100-280 nm) o energii >10 eV – do jonizującego.



5. Mutageny: fizyczne, cechy

Promieniowanie jonizujące charakteryzuje się dużą energią, wysoką częstotliwością i krótkimi falami.



Słońce jest źródłem promieniowania jonizującego, które na obszarach górskich może być kilkakrotnie wyższe niż nad poziomem morza.



Roczne dawki promieniowania kosmicznego w Europie.

Promieniowanie jonizujące występuje na Ziemi naturalnie i organizmy żywe dostosowały się do niewielkich dawek promieniowania w trakcie ewolucji.

European Commission, 2016



5. Mutageny: fizyczne, cechy

Wpływ promieniowania na organizm ocenia się na podstawie dawki, czyli ilości energii pochłoniętej przez jednostkę masy.

Jednostki promieniowania

- **Grey (ang. Gray, Gy):** jednostka układu SI określająca ilość energii promieniowania pochłoniętej przez kilogram materii:
 - $1 \text{ Gy} = 1 \text{ J/kg} = 1 \text{ m}^2 \text{ s}^{-2}$
 - $1 \text{ Gy} = 100 \text{ rad}$ ów (rad nie jest jednostką SI)
- **Siwert:** jednostka pochodna w układzie SI, odnosi się do organizmów żywych, zwłaszcza człowieka:
 - $1 \text{ Sv} = 1 \text{ J/kg} = 1 \text{ m}^2 \text{ s}^{-2} = 1 \text{ Gy}$

Przenikanie promieniowania

Grey to jednostka opisująca efekty fizyczne promieniowania, natomiast Siwert to jednostka opisująca efekty biologiczne promieniowania.

5. Mutageny: fizyczne, cechy

Siwert (Sv) to jednostka SI określająca wpływ promieniowania na organizmy żywe. Najczęściej używa się mili- i mikrosiwertów.

- **Ekspozycja człowieka na promieniowanie naturalne** to 2–3 mSv na rok ($\approx 30\,000 \text{ BED}$).
- **0,02 mSv:** zdjęcie rentgenowskie (X) klatki piersiowej ($\approx 200 \text{ BED}$).
- **0,01 mSv:** zdjęcie rentgenowskie zębów ($\approx 100 \text{ BED}$).
- **15-30 mSv** absorbuje badany organ podczas tomografii komputerowej ($\approx 150\,000 - 300\,000 \text{ BED}$).
- **68 mSv:** dawka, którą otrzymali jednorazowo mieszkańcy w pobliżu elektrowni w Fukushima ($\approx 680\,000 \text{ BED}$).

0,000 098 mSv (98 nSv) dostarcza jeden banan, który jest naturalnym źródłem radioaktywnego izotopu potasu. Ilość tę określa się jako **BED: ekwiwalent bananowy**.

250 mSv dostarcza 6-miesięczna podróż na Marsa (2,5 mln BED).

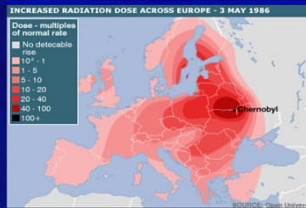
Siwert określa ilość promieniowania pochłoniętego przez komórki i tkanki organizmów żywych. Dawka śmiertelna to 4-5 Sv.

5. Mutageny: fizyczne, Czarnobyl

Wybuch reaktora atomowego w elektrowni w Czarnobylu (Ukraina) w 1986 r. był najpoważniejszą katastrofą jądrową w historii.

Efekty bezpośrednie katastrofy:

- 30 osób zginęło natychmiast;
- 237 osób napromieniowanych dawką 1 Sv, u których rozwinął się zespół popromienny;
- 4500 osób napromieniowanych w promieniu 30 km oraz 7 mln zagrożonych;
- akumulacja izotopów ^{131}J (jod) i ^{137}Cs (cez) w środowisku, skażenie gleby i żywności;
- 1986–2005: ludność zamieszkująca tereny skażone otrzymywała 50 mSv rocznie (por. 68 mSv w Fukushima, ale tylko jednorazowo).



W całej Europie dawki promieniowania były wyższe 5-50 razy, a w Europie Wschodniej do 100 razy.



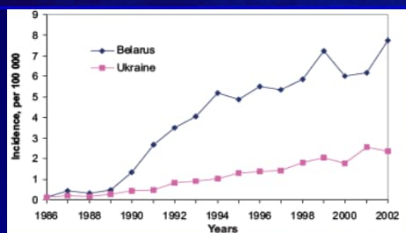
Reaktor trzy dni po eksplozji oraz budowa sarkofagu.

Katastrofa w Czarnobylu doprowadziła do skażenia znacznych obszarów całej Europy, zwłaszcza Wschodniej, Środkowej i Północnej.



5. Mutageny: fizyczne, Czarnobyl

Największym zagrożeniem było skażenie izotopem jodu, ^{131}J , który przyczynił się do wzrostu zachorowań na raka tarczycy.

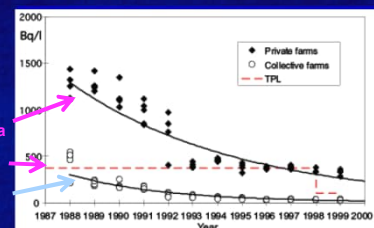


Wzrost zachorowań na raka tarczycy u dzieci 0-14 lat w okresie 5-15 lat po wybuchu na skutek pobrania dużej dawki promieniotwórczego jodu (^{131}J).

– Częstość raka tarczycy 0,5-3/1 mln dzieci, na terenach po

Tarczycę akumuluje jod znajdujący się w krwi. Jedząc skażoną żywność, zwłaszcza produkty mleczne, mieszkańcy wchłonęli radioaktywny jod.

AEA 2016



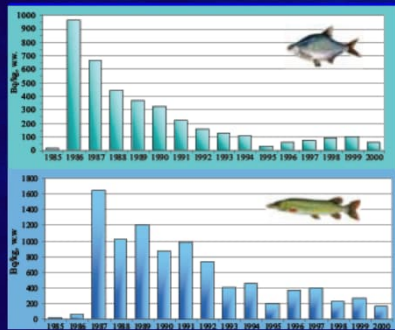
Zawartość izotopów promieniotwórczych (^{131}J , ^{137}Cs) w mleku po katastrofie była 3-krotnie wyższa niż dopuszczalna. Do roku 2000 ilość izotopów promieniotwórczych sukcesywnie spadała.

Nie obserwowano wzrostu zachorowań na białaczkę, jak również istotnego wzrostu częstości wad rozwojowych.

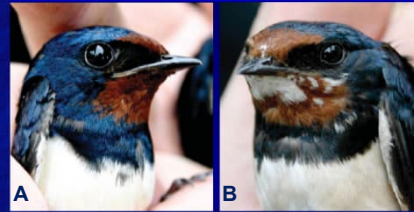


5. Mutageny: fizyczne, Czarnobyl

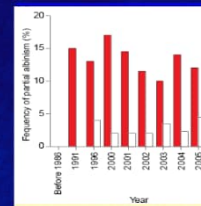
Po katastrofie w Czarnobylu fauna i flora europejska zakumulowały najwyższą zanotowaną dawkę radioaktywnego ceszu, ^{137}Cs .



Wzrost zawartości radioaktywnego ceszu u ryb słodkowodnych w okolicach Kijowa po katastrofie w Czarnobylu (góra: roślinożercy, dół: drapieżcy).



Mutacja ubarwienia jaskółek (A) względem kontroli (B). Po katastrofie częstość mutacji (czerwone słupki) wzrosła nawet 5-krotnie.



Efekty genetyczne: wzrost częstości mutacji chromosomowych (2-7 razy) u zwierząt i roślin, wzrost częstości mutacji letalnych u roślin, 20-krotny wzrost częstości mutacji w loci enzymatycznych u sosen.

Moller i Mousseau, 2006



5. Mutageny: fizyczne, kancerogeneza

Promieniowanie jonizujące może prowadzić do rozwoju nowotworów, ale zależność nie jest prosta i wpływ ma wiele czynników.

Kancerogenne działanie promieniowania jonizującego

- W latach 1910 stwierdzono wyższą częstość nowotworów skóry u radiologów i dentystów.
- U górników w kopalniach uranu stwierdzono wyższą częstość nowotworów płuc.
- U osób, które przeżyły wybuch bomby atomowej w Hiroszynie i Nagasaki stwierdzono wyższą częstość białaczki, która była skorelowana z dawką. Wystąpiła także wyższa częstość raka tarczycy i piersi – okres latencji wynosił 20 lat.



Na początku XX w. rad był wykorzystywany w lakierach do paznokci oraz do malowania cyfr w zegarkach. U osób, które malowały zegarki stwierdzono wyższą częstość mięsaków.



Do lat 1950. wykorzystywano promieniowanie X do depilacji. U osób poddanych zabiegowi stwierdzono wyższą częstość nowotworów tarczycy, mózgu, skóry oraz krwi.

Efekty długoterminowego działania promieniowania jonizującego widoczne są statystycznie jako wzrost liczby przypadków nowotworów.



5. Mutageny: fizyczne, wykorzystanie

Rodzaje promieniowania jonizującego różnią się energią i mogą wywoływać różne efekty.

Promieniowanie	Źródło	Energia	Cechy	Efekty
X	Aparat Rentgena	1-500 keV	Fale elektromagnetyczne	Pęknięcia DNA, translokacje, inwersje
Gamma	Izotopy ^{60}Co , ^{137}Cs	Kilka MeV	Fale elektromagnetyczne	Mutacje punktowe, mikrodelecje
Neutrony	Reaktory atomowe	Kilka MeV	Nieładowane cząstki	Translokacje, duże delecje (kilka kbp)
Beta (β)	Izotopy (^{35}S), akceleratory	Kilka MeV	Elektrony (β^-), pozytony (β^+)	Mala efektywność, nie przenikają przez nabłonek
Wiązki jonów	Zjonizowane jądra, akceleratory	Kilka GeV	Naładowane cząstki, np. kwarki	Spektrum mutacji punktowych

W mutagenzie indukowanej organizmów wyższych wykorzystuje się promieniowanie jonizujące, a u bakterii –niejonizujące promieniowanie UV.

AEA, 2018



5. Mutageny: fizyczne, wykorzystanie

W praktyce preferowane jest promieniowanie gamma ponieważ traktowanie można przeprowadzić w kontrolowanych warunkach.



Źródło „gamma”, FAO/IAEA, Seibersdorf, Austria.

Źródło „gamma” na polu doświadczalnym w Kuala Lumpur, Malezja.



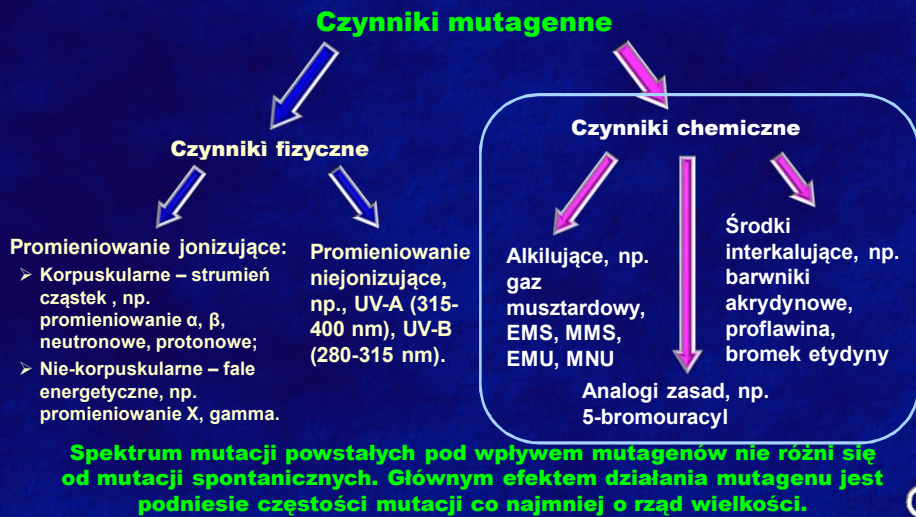
Sposób rozmieszczenia roślin w szklarni ze źródłem gamma.

Około 200 źródeł gamma jest rozmieszczonych na polach doświadczalnych lub w szklarniach w celu indukowania mutacji u roślin uprawnych.



5. Mutageny: chemiczne

Mutagen: czynnik, który indukuje uszkodzenia w DNA i w ten sposób podnosi częstość mutacji ponad poziom typowy dla organizmu.



5. Mutageny: chemiczne

Mutageny chemiczne wykorzystuje się do tworzenia mutantów z wyłączoną funkcją genów u organizmów modelowych.

Wyłączenie funkcji genów

- Mutacje knockout lub loss of function: mutacje, które powodują powstanie nieaktywnego produktu genów.
- Wykorzystuje się związki alkilujące (MNU, ENU) ze względu na ich zdolność do indukowania mutacji punktowych w różnych regionach genu, co pozwala na otrzymanie serii zmutowanych alleli.
- Najwyższa efektywność mutagenyzy chemicznej - komórki macierzyste ze spermatogoniów.



Mutagenyza chemiczna w ludzkich liniach komórkowych jest wykorzystywana do badania funkcji genów.

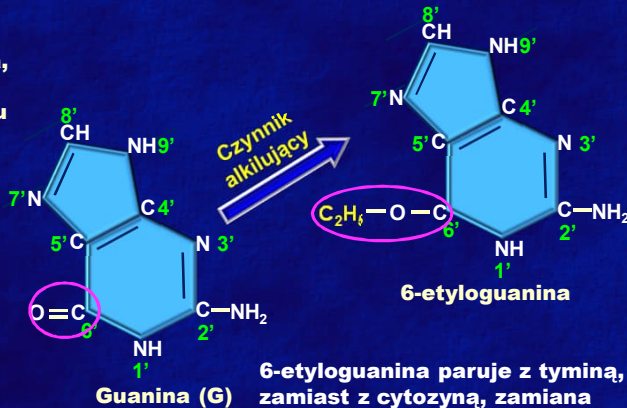
5. Mutageny: chemiczne, czynniki alkilujące

Czynniki alkilujące: związki, które przenoszą grupę alkilową na grupę fosforanową lub zasady azotowe w DNA (alkilacja).

Grupa alkilowa: jednowartościowa grupa, która powstaje przez oderwanie atomu wodoru od węglowodorów nasyconych zbudowanych wyłącznie z węgla i wodoru (tzw. alkany). Przykłady:

- > Grupa metylowa ($-\text{CH}_3$),
- > Grupa etylowa ($-\text{C}_2\text{H}_5$).

Grupy alkilowe są głównym budulcem związków organicznych.



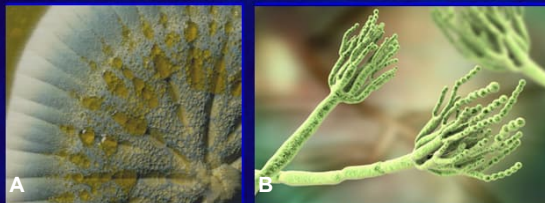
6-etyloguanina paruje z tyminą, zamiast z cytozyną, zamiana C→T, tranzycja.

Czynniki alkilujące są silnymi mutagenami i kancerogenami. Ze względu na efekty cytostaticzne wykorzystywane są w terapii nowotworowej.



5. Mutageny: chemiczne, czynniki alkilujące

Większość czynników alkilujących jest syntetyczna, w przyrodzie występują u sagowców (*Cycas*), bakterii i grzybów.



Penicillium notatum w kulturze (A) oraz konidia (B).

Penicylina G: naturalny czynnik alkilujący, pierwszy antybiotyk wyizolowany w 1928 r. przez Aleksandra Fleminga. Występuje u grzybów z rodzaju *Penicillium* (pędzlaki). Grzyby są powszechne w klimacie umiarkowanym, gdzie stanowią główny czynnik powodujący psucie żywności.

Cykazyna: kancerogen i neurotoksyna, naturalny czynnik alkilujący w rodzaju *Cycas* i *Zamia*, największa zawartość w nasionach.



Cycas revoluta (Sagowiec odwinięty).

Streptozotocyna: czynnik alkilujący występujący u *Streptomyces griseus*. Działa cytostaticznie, wykorzystywany w leczeniu nowotworów trzustki.

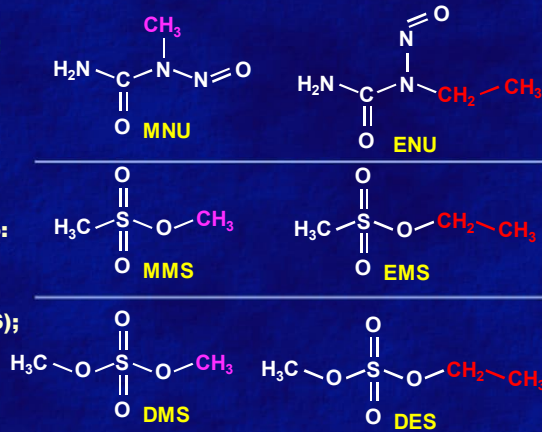


5. Mutageny: chemiczne, czynniki alkilujące

W zależności od liczby grup alkilowych wyróżnia się czynniki mono-, bi- i polifunkcyjne.

W mutagenzie indukowanej wykorzystuje się najczęściej:

- pochodne mocznika:
 - N-metylo-N-nitrozomocznik (MNU),
 - N-etylo-N-nitrozomocznik (ENU);
- pochodne kwasu sulfonowego:
 - metanosulfonian metylu (MMS),
 - metanosulfonian etylu (EMS);
- estry kwasu siarkowego:
 - siarczan dimetylu (DMS),
 - siarczan dietylu (DES).



W mutagenzie indukowanej wykorzystuje się tylko czynniki monofunkcyjne. Czynniki bi- i polifunkcyjne indukują tworzenie wiązań w obrębie nici i pomiędzy nimi DNA (sieciowanie), co hamuje replikację.

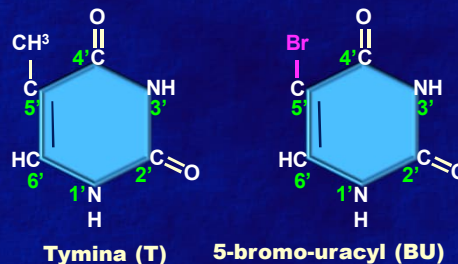


5. Mutageny: chemiczne, analogi zasad

Analogi zasad: zasady azotowe, które są strukturalnie podobne do zasad występujących w DNA i RNA.

Przykłady analogów zasad:

- 5-bromo-uracyl (5BU): zastępuje T, prowadzi do tranżycji A→G;
- 2-aminopuryna (2AP): analog adeniny i guaniny, może łączyć się z tyminą lub cytozyną:
 - wstawienie w miejsce A w parze A-T i parowanie A-C, tranżycja T→C, para A-T zostaje zastąpiona parą G→C,
 - wstawienie w miejsce G w parze G-C i parowanie G-T, tranżycja C→T, para G-C zostaje zastąpiona parą A-T.



5-bromo-uracyl jest analogiem tyminy. Może parować z adeniną (A), ale także z guaniną (G). Wówczas zachodzi tranżycja A→G. Para T-A zostaje zastąpiona parą C-G.

Analogi zasad nie zaburzają replikacji ale powodują substytucje na skutek błędnego parowania. Częstość mutacji jest niska i nie są one powszechnie wykorzystywane w mutagenzie indukowanej.

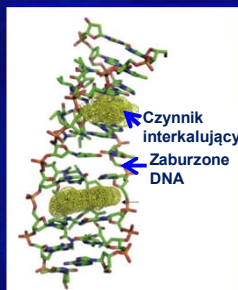


5. Mutageny: chemiczne, interkalujące

Interkalacja: wiązanie małych cząsteczek wewnątrz związków wielocząsteczkowych połączonych np. wiązaniami wodorowymi.

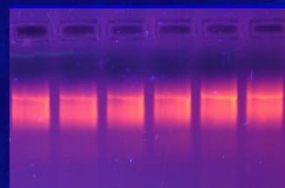
Przykłady czynników interkalujących:

- barwniki akrydynowe (np. oranż akrydynowy) powodują pęknięcia chromosomów oraz zmianę fazy odczytu;
- proflawina powoduje delecje i insercje;
- bromek etydyny rozkręca DNA co przejawia się wydłużeniem form liniowych.
- DAPI, barwnik fluorescencyjny, który interkaluje w miejscach bogatych w AT.



Czynnik interkalujący „wsuwa” się pomiędzy zasady w DNA, ale nie tworzy wiązań. Zwiększa on odległości pomiędzy nukleotydami i niciami.

Interkalujące właściwości bromku etydyny wykorzystywane są w ujawnianiu DNA na żelu.



Czynniki interkalujące zaburzają strukturę DNA, powodują pęknięcia chromosomów i prowadzą głównie do delecji i insercji.



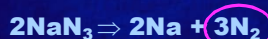
5. Mutageny: chemiczne: azydek sodu

Azydek sodu (NaN₃) jest silnie toksycznym związkiem nieorganicznym. Jest to inhibitor oddychania komórkowego.



Azydek sodu: biały proszek, toksyczny po rozpuszczeniu w roztworze ponieważ hydrolizuje do azotowodoru HN₃. Efektywność mutagenna zależy od pH, najwyższa w buforze fosforanowym o pH=3.

NaN₃ jest wykorzystywany do generowania gazu w poduszkach powietrznych ze względu na szybką reakcję – 30 milisekund od kolizji wyprodukowany gaz wypełnia całą poduszkę.



Uwalnia się gaz, azot; 130 g NaN₃ produkuje 67 litrów azotu.

Azydek sodu jest silnym mutagenem często wykorzystywanym w mutagenie roślin uprawnych, samodzielnie lub w kombinacji z czynnikami alkilującymi.

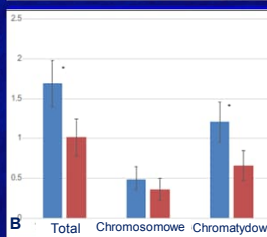
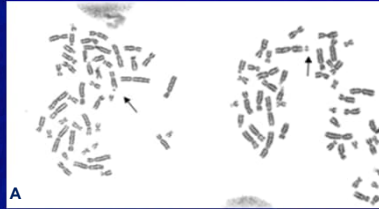


5. Mutageny: chemiczne: metale ciężkie

Akumulacja metali ciężkich we krwi może prowadzić do aberracji chromosomowych.

Przypadek Jeziora Aralskiego

- W latach 1960. czwarte co do wielkości jezioro na świecie, obecnie kurczy się na skutek osuszania i zanieczyszczenia.
- Wybrzeża Jeziora zanieczyszczone są metalami ciężkimi.
- Zawartość ołowiu, niklu i miedzi w krwi populacji ludzkiej z obszaru J. Aralskiego jest wyższa odpowiednio o 98%, 97% i 41% niż w populacji kontrolnej.
- Wykazano korelację między podwyższonym poziomem metali ciężkich a mutacjami chromosomowymi.



A. Aberracje chromosomowe w populacji ludzkiej J. Aralskiego. Strzałki wskazują acentryczne fragmenty.
 B. Częstość aberracji chromosomowych w populacji ludzkiej J. Aralskiego (niebieskie słupki) jest istotnie wyższa niż w kontroli (czerwone słupki).

Metale ciężkie uszkadzają strukturę przestrzenną DNA i prowadzą do denaturacji oraz łączą się z grupami fosforanowymi i zasadami azotowymi.

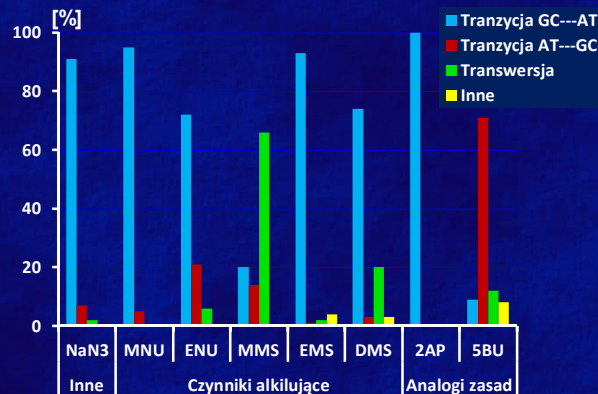
Sabirov i inni, 2020.



5. Mutageny: chemiczne

Spektrum mutacji punktowych zależy od uszkodzeń w DNA wywołanych przez mutagen chemiczny.

- Tranzycje typu GC→AT są najczęściej indukowane przez większość mutagenów chemicznych.
- MMS (metanosulfonian metylu) najczęściej indukuje transwersje.
- 5BU (5-bromo-uracyl) najczęściej indukuje tranzycje typu AT→GC.



Typy mutacji punktowych (%) indukowane przez różne mutageny chemiczne.

W celu uzyskania zróżnicowanego spektrum mutacji punktowych powinno się stosować kombinację różnych mutagenów.

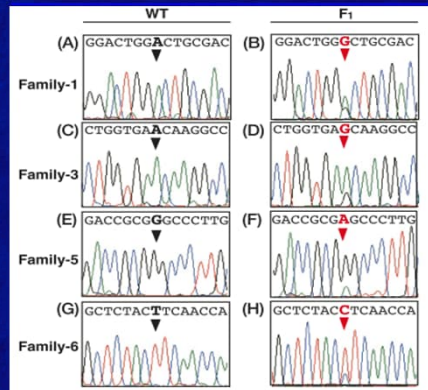


2. Mutageny: chemiczne

Supermutageny: mutageny, które znacznie podnoszą częstość mutacji punktowych (do 20 razy).

Supermutageny

- Najczęściej są to czynniki alkilujące, MNU, ENU, EMS. Podczas I wojny światowej były wykorzystywane jako broń biologiczna.
- Wykorzystywane do tworzenia dużych kolekcji mutantów.
- EMS wykorzystano do indukcji mutantów *D. melanogaster*, które umożliwiły wyjaśnienie procesu segmentacji.
- Obecnie wykorzystuje się je w strategii „tilling” u roślin, zwierząt i w ludzkich liniach komórkowych.



Mutacje zidentyfikowane z zmutowanej populacji. WT: forma wyjściowa, F1: forma zmutowana. Mutacje można wykryć w stanie heterozygotycznym.

TILLING: identyfikacja mutacji w danym genie przy pomocy sekwencjonowania w populacji otrzymanej przez mutagenезę chemiczną.



Mutagenезa

1. Mutacje jako źródło zmienności
 - Definicja mutacji
 - Podział mutacji
2. Mutacje punktowe
3. Uszkodzenia DNA
4. Naprawa DNA
 - Bezpośrednia
 - Zależna od matrycy
5. Mutageny
 - Mutageny fizyczne
 - Mutageny chemiczne
6. **Efekty działania mutagenów**
 - Chimery
 - Efekty genetyczne

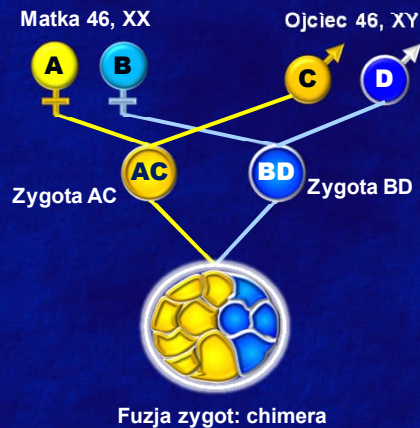


6. Efekty działania mutagenu: chimery

Chimera: organizm zbudowany z komórek o różnych genotypach, powstaje w wyniku zaburzeń podziałów i/lub procesu zapłodnienia.

Naturalne chimery u człowieka mogą powstać w wyniku:

- wymiany materiału komórek pomiędzy matką i płodem:
 - u matki znajdowano komórki płodu nawet po 30 latach,
 - komórki matki znajdowano u dorosłych dzieci;
- chimery bliźniacze – np. u bliźniąt dwujajowych występują dwa typy genetyczne komórek;
- fuzji dwóch zygot, które powstały z dwóch komórek jajowych i dwóch plemników (tetragametyczny chimeryzm).



W wyniku fuzji zygot powstaje organizm – tetragametyczna chimera, który ma organy o różnych genotypach. Chimery tetragametyczne pojawiają się u człowieka spontanicznie z częstością około 0,04%.



6. Efekty działania mutagenu: chimery

U roślin po traktowaniu mutagenem (M_1) często występują chimery w odniesieniu do mutacji chlorofilowych.



Owies szorstki: albinotyczny sektor liścia.



Groch: sektor albinotyczny i viridis.



Saintpaulia: jaśniejszy sektor na płatkach korony, utrwalona chimera.



Kamelia: albinotyczny sektor płatków korony.



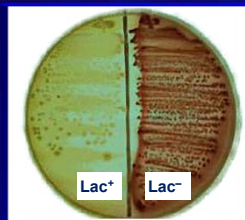
Pomarańcza: różnobarwne sektory owoców.

Chimeryzm dotyczy na ogół części wegetatywnych i nie jest przekazywany następnym pokoleniom. U roślin ozdobnych chimery utrzymuje się przez rozmnażanie wegetatywne.

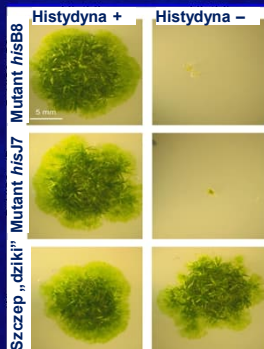


6. Efekty działania mutagenu: genetyczne

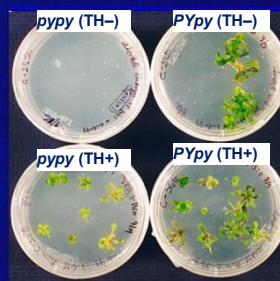
Efekty genetyczne: ocena częstości łatwo rozróżnialnych mutacji punktowych (auksotroficznych, chlorofilowych) w M_1 lub M_2 .



Mutacja w operonie laktozowym *E. coli* uniemożliwia rozkład laktozy do glukozy, bakterie nie rosną na pożywce z laktozą (Lac^+). Dodanie glukozy (Lac^-) umożliwia rozwój bakterii.



Physcomitrella patens, mutanty nie wytwarzające histydyny, na pożywce bez histydyny (prawa) nie rosną.



Arabidopsis thaliana, mutanty nie wytwarzające tiaminy (*pypy*) oraz heterozygoty (*PYpy*) na pożywce bez tiaminy (TH^-) oraz z tiaminą (TH^+). Brak tiaminy uniemożliwia wzrost mutantów.

Mutacje auksotroficzne: mutacje szlaku syntezy związku niezbędnego do życia. Brak danego związku w podłożu uniemożliwia rozwój organizmu.

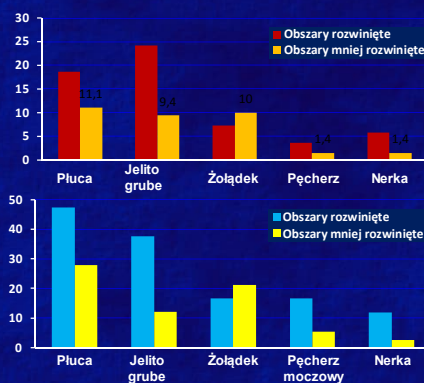


6. Efekty działania mutagenu: genetyczne

Mutageny indukują mutacje w komórkach somatycznych człowieka i mogą prowadzić do rozwoju nowotworów.

Mutageneza u człowieka

- Większość mutacji jest indukowana przez czynniki wewnętrzne. Akumulacja mutacji w komórkach somatycznych wraz z wiekiem prowadzi do zwiększonego ryzyka nowotworów.
- Mutageny obecne w środowisku odpowiadają za 80-90% nowotworów płuc.
- Mutagenność związków chemicznych bada się w testach bakteryjnych (Ames) oraz u transgenicznych myszy z genem *LacZ* pochodzącym z *E. coli*.



Nowotwory na 100 tys. u kobiet (góra) i mężczyzn (dół). Częstość nowotworów jest wyższa na terenach rozwiniętych, co może wynikać z wyższej ekspozycji na czynniki rakotwórcze.

Genotoksyczność: wpływ związku chemicznego na DNA, zdolność do wywoływania uszkodzeń w DNA. Wszystkie mutageny są genotoksyczne.

Prasad i Bernstein 2013

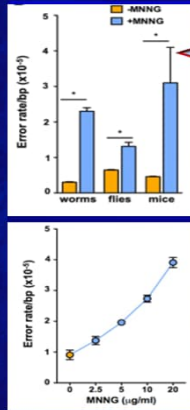


6. Efekty działania mutagenu: transkrypcja

Mutageny, obok zmian w DNA, mogą indukować błędy na poziomie transkrypcji. Występują one we wszystkich klasach RNA.

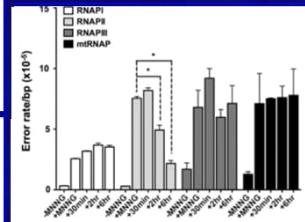
Mutageneza transkrypcyjna

- Polimeraza RNA popełnia błędy, gdy w DNA występują uszkodzenia, np. obecność uracylu lub metyloguaniny.
- Częstość błędów zależy od typu polimerazy RNA.
- Większość błędów to zamiana C na U.
- Błędy zależą od typu mutagenu, najczęściej wywoływane są przez czynniki alkilujące, MNNG, MNU, ENU, EMS. Promieniowanie UV nie zwiększa częstości błędów na poziomie transkrypcji.



Wraz ze wzrostem dawki rośnie ilość błędów.

Mutagen powoduje wzrost częstości błędów na poziomie transkrypcji (niebieskie) u *C. elegans* (worms), *D. melanogaster* (flies) i w kulturze fibroblastów myszy (mice).



Jednorazowa ekspozycja na mutagen prowadzi do wydłużenia czasu, w którym popełniane są błędy przez polimerazy RNA I, II, III i mRNA. Pierwszy słupek po lewej (-MNNG) oznacza kontrolę.

Błędy na poziomie transkrypcji mogą przyczyniać się do chorób neurodegeneracyjnych, nowotworów, chorób prionowych.

Fritsch et al., 2021



6. Efekty działania mutagenu: jakość

Mutageneza indukowana umożliwia zmianę zawartości metabolitów wtórnych poprawiając jakość produktów roślinnych.



Fasola, *Phaseolus* sp.: obniżenie zawartości kwasu fitowego w odmianach jadalnych. Zbyt duża ilość tego związku zmniejsza wchłanianie żelaza.



Groszek siewny, *Lathyrus sativus*: obniżenie zawartości neurotoksyny, kwasu 2-N-oksalodwuamino propionowego.

Czarna porzeczka, *Ribes nigrum*: zwiększenie zawartości witaminy C.



Mięta polna, *Mentha arvensis*: zmiana składu olejku miętowego.



Zagadnienia 1-2

1. Mutacje: definicja

- Wyjaśnij pojęcia: mutacja, mutageneza.
- Co oznacza zdanie, że mutacje są źródłem zmienności genetycznej?

2. Mutacje: podział

- Czy wszystkie mutacje są przekazywane następnym pokoleniom? uzasadnij odpowiedź.
- Jak dzielimy mutacje ze względu na ich miejsce powstania?
- Który typ mutacji prowadzi do powstania chimer?
- Proszę scharakteryzować mutacje somatyczne i mutacje w komórkach szlaku płciowego.
- Podaj przykłady wykorzystania mutacji somatycznych w hodowli.
- Czy mutacje somatyczne występują w zdrowych tkankach człowieka? Proszę uzasadnić.
- Jakie typy mutacji występują w komórkach somatycznych człowieka? W jakich organach najczęściej występują mutacje somatyczne?
- Jak mogą być uwarunkowane niektóre choroby neurodegeneracyjne, np. zespół Prometeusza, zespół McCune'a-Albright'a, megaencefalia?
- Podaj przykłady mutacji somatycznych człowieka wywołujących choroby neurodegeneracyjne.
- Proszę wyjaśnić znaczenie terminów ewolucja somatyczna i ewolucja równoległa.
- Proszę podać przykład ewolucji równoległej, która może doprowadzić do zaniku symptomów chorobowych.



Zagadnienia 2-3

2. Mutacje: podział, cd

- Jak dzielimy mutacje ze względu na wywołujący je czynnik?
- Proszę wyjaśnić pojęcia: mutacja indukowana, spontaniczna, insercyjna.
- Podaj przykład mutacji człowieka, która wpłynęła na dietę, zwłaszcza w Europie Północnej?
- Jak wyjaśnić tolerancję człowieka na laktozę umożliwiającą dorosłym osobnikom picie mleka?
- Z jaką cechą związana jest mutacja w genie MCM6?
- Proszę podać podział mutacji ze względu na wielkość zmiany.
- Na jakich poziomach określamy mutacje punktowe.
- Wymień główne typy mutacji chromosomowych.

3. Mutacja punktowe: efekt fenotypowy

- Jaki efekt wywołują mutacje punktowe na poziomie osobniczym?
- Jak powstają nowe allele genów?
- Jaki efekt wywołują mutacje neutralne?
- Co to jest mutacja letalna?
- Czy wszystkie mutacje są letalne lub co najmniej szkodliwe?



Zagadnienia 4

4. Mutacje punktowe: częstość

- Podaj przybliżony zakres częstości mutacji punktowych (zrząd wielkości).
- Czy częstość mutacji jest taka sama u różnych gatunków? Uzasadnij odpowiedź.
- Z jakimi czynnikami skorelowana jest częstość mutacji?
- Jaka jest zależność pomiędzy częstością mutacji a rozmiarami genomu?
- Jakie zjawisko może wytłumaczyć wzrost częstości mutacji u Eukariota wraz ze wzrostem rozmiarów genomu?
- Czy rodzaj komórki/tkanki wpływa na częstość mutacji? Uzasadnij odpowiedź.
- W których komórkach mutacje zachodzą częściej: nabłonka czy szlaku płciowego?
- Czy mutacje są jednakowo częste na wszystkich chromosomach? Uzasadnij odpowiedź.
- Czy są możliwe istotne różnice w częstości mutacji pomiędzy populacjami? Uzasadnij odpowiedź.



Zagadnienia 5

5. Mutacje punktowe: substytucje

- Wymień rodzaje substytucji?
- Wyjaśnij pojęcia: tranzycja, transwersja, mutacja synonimiczna, mutacja niesynonimiczna.
- Jak określimy mutację, w której zamiana nukleotydu doprowadziła do powstania kodonu odpowiadającego temu samemu aminokwasowi?
- Jeżeli w wyniku substytucji powstaje kodon STOP to jaki będzie efekt tej mutacji na poziomie białka? Czy będzie to mutacja synonimiczna czy niesynonimiczna.
- Jeżeli w wyniku substytucji kodon odpowiedzialny za kwas glutaminowy zmieni się w kodon kodujący glutaminę, to jakiego typu będzie to mutacja?
- Jakie efekty na poziomie białka wywołują tranzycje i transwersje?
- Jaki proces chemiczny prowadzi do powstania substytucji?
- Co to jest przesunięcie tautomeryczne?
- Po ilu cyklach replikacji przesunięcie tautomeryczne ujawni się jako mutacja? Uzasadnij odpowiedź korzystając ze schematu.



Zagadnienia 6-7

6. Mutacje punktowe; insercje i delecje

- Wyjaśnij pojęcie insercji, delecji, zmiany ramki odczytu?
- Jakie efekty wywołują insercje i delecje na poziomie białka?
- Jakie elementy genetyczne mogą powodować powstawanie insercji i delecji? Uzasadnij odpowiedź.
- W jaki sposób wycięcie transpozonu może wpłynąć na otaczające regiony genomu?
- Które mutacje punktowe możemy zaklasyfikować jako SNP, a które jako indel?



7. Uszkodzenia DNA

- Czy uszkodzenie DNA oznacza to samo co mutacja?
- Jakie czynniki wywołują uszkodzenia DNA?
- Jakiego typu uszkodzenia DNA wyróżniamy?
- Co się stanie jeżeli cytozyna zostanie pozbawiona grupy metylowej?
- Jak często DNA ulega uszkodzeniu w komórkach człowieka?
- Jeżeli w ciągu dnia w komórce człowieka dochodzi do 5 000 przypadków alkilacji to jaka jest częstość alkilacji w ciągu godziny?
- Na czym polega sieciowanie (cross-linking)?
- Czy uszkodzenia DNA są nieodwracalne? Uzasadnij odpowiedź.
- Podaj przykład czynników egzogennych, które uszkadzają DNA?
- Uzasadnij twierdzenie, że palenie papierosów (tytoniu) jest szkodliwe?



Zagadnienia 8-10

8. Naprawa DNA: rodzaje

- Co to jest naprawa DNA?
- Jak dzielimy mechanizmy naprawy DNA?
- Jakie wyróżniamy mechanizmy naprawy DNA w trakcie replikacji?
- Wymień mechanizmy naprawy DNA, które nie zależą od matrycy DNA?

9. Naprawa DNA: fotoreaktywacja

- Na czym polega fotoreaktywacja?
- Dlaczego fotoreaktywacja nie zależy od matrycy DNA?
- W jakim procesie uczestniczy enzym fotoliza?
- Jakie światło jest niezbędne do fotoreaktywacji?
- U jakich organizmów fotoreaktywacja ma duże znaczenie? Dlaczego?
- Jaki mechanizm jest odpowiedzialny za spadek dimerów pirymidynowych pod wpływem światła?

10. Naprawa DNA: wycinanie zasad

- Wyjaśnij pojęcia: BER i NER?
- W jakim procesie powstaje miejsce AP?
- Jaki proces związany jest z naprawą uszkodzeń chemicznych takich jak deaminacja, metylacja, oksydacja?
- Omów naprawę przez wycinanie zasad.
- Ile nukleotydów jest wycinanych w naprawie BER – przez wycinanie zasad?



Zagadnienia 11-12

11. Naprawa DNA: wycinanie nukleotydów

- Ile nukleotydów jest wycinane w NER?
- Jaki typ uszkodzeń jest naprawiany za pomocą NER – wycinania nukleotydów?
- W jakim procesie uczestniczą białka UvrA, UvrB, UvrC, UvrD?
- Które białka odpowiedzialne są za rozpoznawanie zmian w DNA w NER?
- Jakie są różnice między BER i NER?
- Jakie zmiany w DNA są naprawiane przez NER?



12. Naprawa DNA: usuwanie dimerów

- Jakie procesy wykorzystywane są do usuwania dimerów pirymidynowych?
- Czy mechanizm usuwania dimerów pirymidynowych zawsze jest taki sam? Od czego on zależy?
- W liściach zaobserwowano spadek liczby dimerów pirymidynowych pod wpływem światła. To samo zjawisko (spadek liczby dimerów) zaobserwowano w korzeniach, które rosły tylko w ciemności? Jakie procesy biologiczne były odpowiedzialne za zaobserwowany spadek dimerów pirymidynowych?
- Czy fotoreaktywacja występuje u ssaków?
- Czy można uzyskać organizmy, które „rosną” w świetle UV?
- Jakie efekty wywołuje u człowieka promieniowanie UV? Czy zawsze naświetlenie UV prowadzi do choroby?
- Jak powstaje Xeroderma pigmentosum?



Zagadnienia 13-14

13. Naprawa DNA: MMR

- Co oznacza skrót MMR?
- Jaką funkcję pełni mechanizm MMR?
- Proszę scharakteryzować podstawowe etapy mechanizmu MMR.
- Jaki wpływ mają uszkodzenia w genach warunkujących mechanizm MMR na genom?
- Proszę zdefiniować fenotyp mutatorowy.
- Jaki będzie efekt wyciszenia genu MLH1 w linii komórkowej człowieka w warunkach *in vitro*?



14. Naprawa DNA: DSBR

- Co oznacza skrót DSBR?
- Proszę opisać mechanizmy obejmujące DSBR.
- Jakimi mechanizmami DSBR wymagają homologii?
- Dlaczego naprawę DSB uważa się za krytyczną dla komórki?



**Centre for Evolution, Genomics
and Biomathematics, e-Gene**



prof.romanzielinski@gmail.com

<https://www.matgen.pl>

**Centre for Evolution, Genomics
and Biomathematics, e-Gene**



polokkornelia@gmail.com

<https://www.matgen.pl>