

# Podstawy genetyki - biologia molekularna genu

---

Replikacja i stabilność genomu

# Lektura

---

- Allison, rozdziały 2 i 6
- Brown, rozdział 15

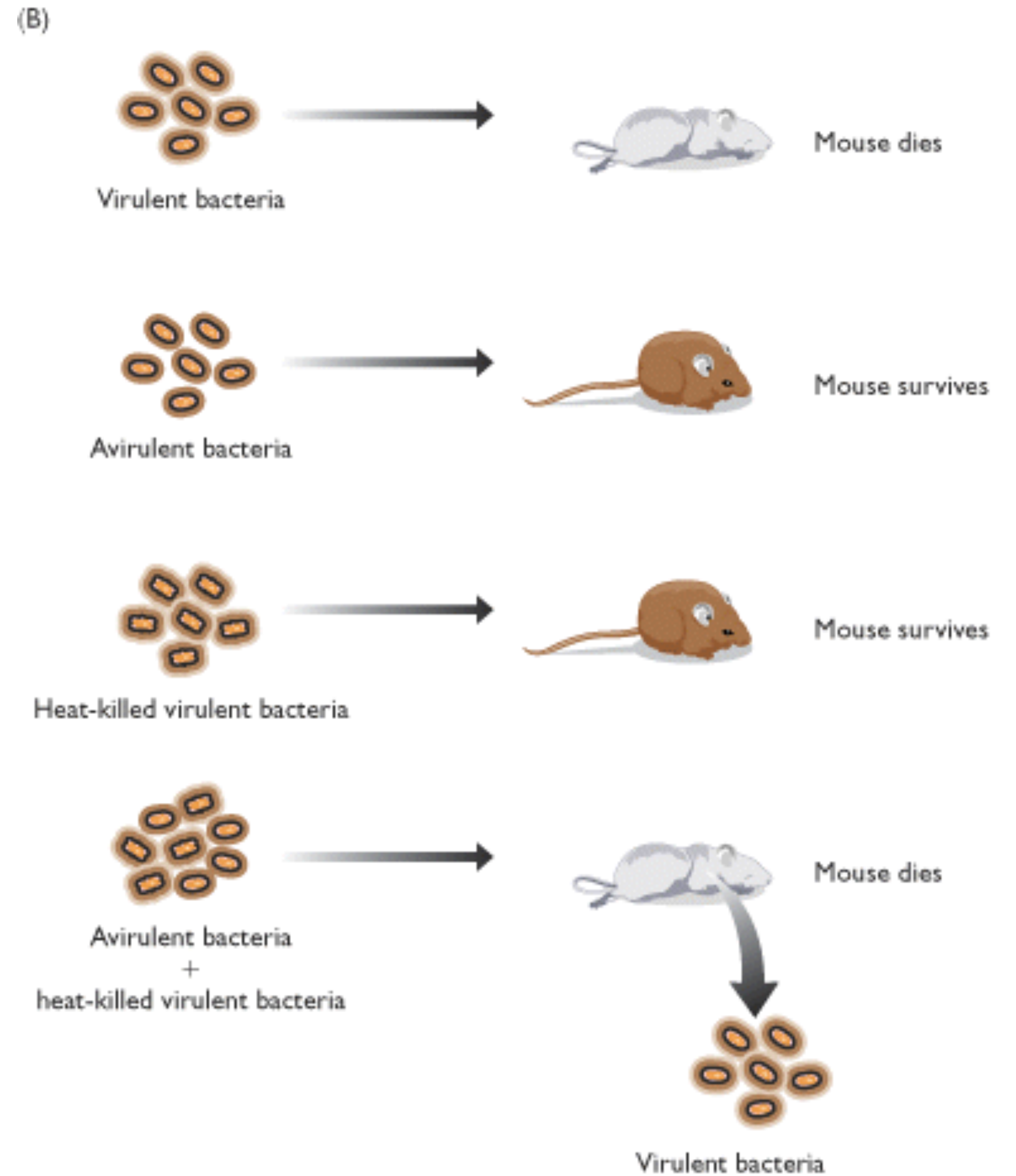
# Funkcje informacji genetycznej

---

- Replikacja
  - powielanie genomu, utrzymywanie stabilności genomu
- Ekspresja
  - Odczytywanie informacji, niezbędne do funkcjonowania komórki
  - Regulowana

# Materiał genetyczny

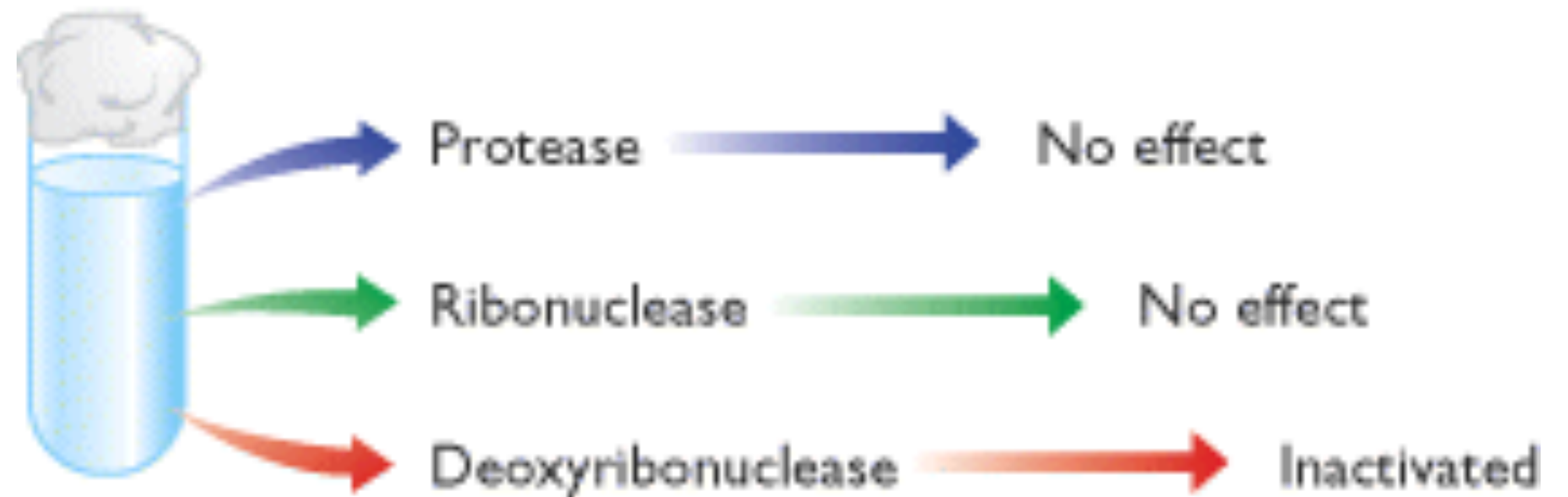
- Bakterie zawierają „czynnik transformujący, zdolny do przekazania informacji z martwych bakterii do żywych



# Natura materiału genetycznego

---

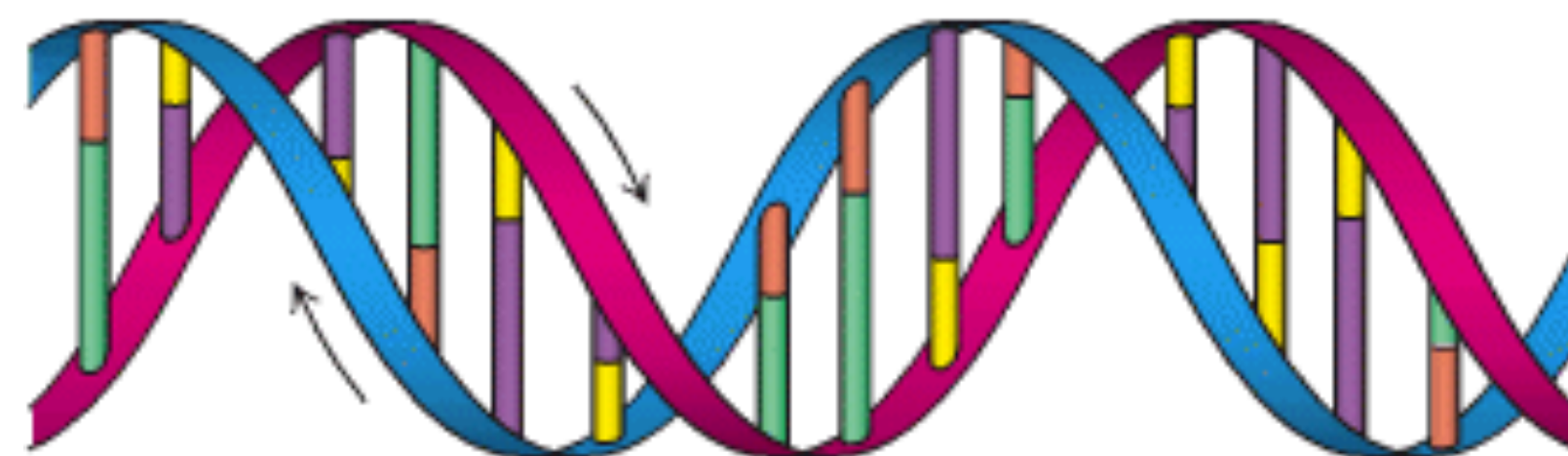
- Czynnikiem transformującym jest DNA



# Materiał genetyczny

---

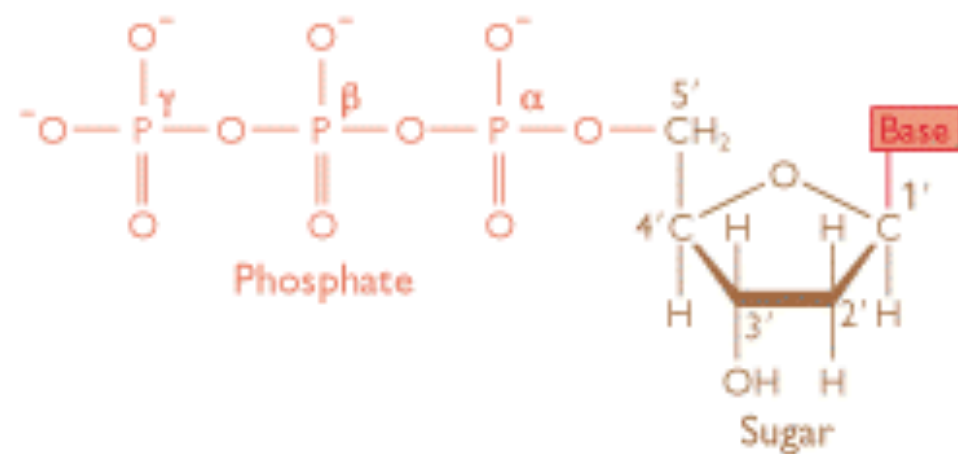
- Materiałem genetycznym są kwasy nukleinowe
- Materiałem genetycznym organizmów komórkowych jest kwas deoksyrybonukleinowy (DNA)



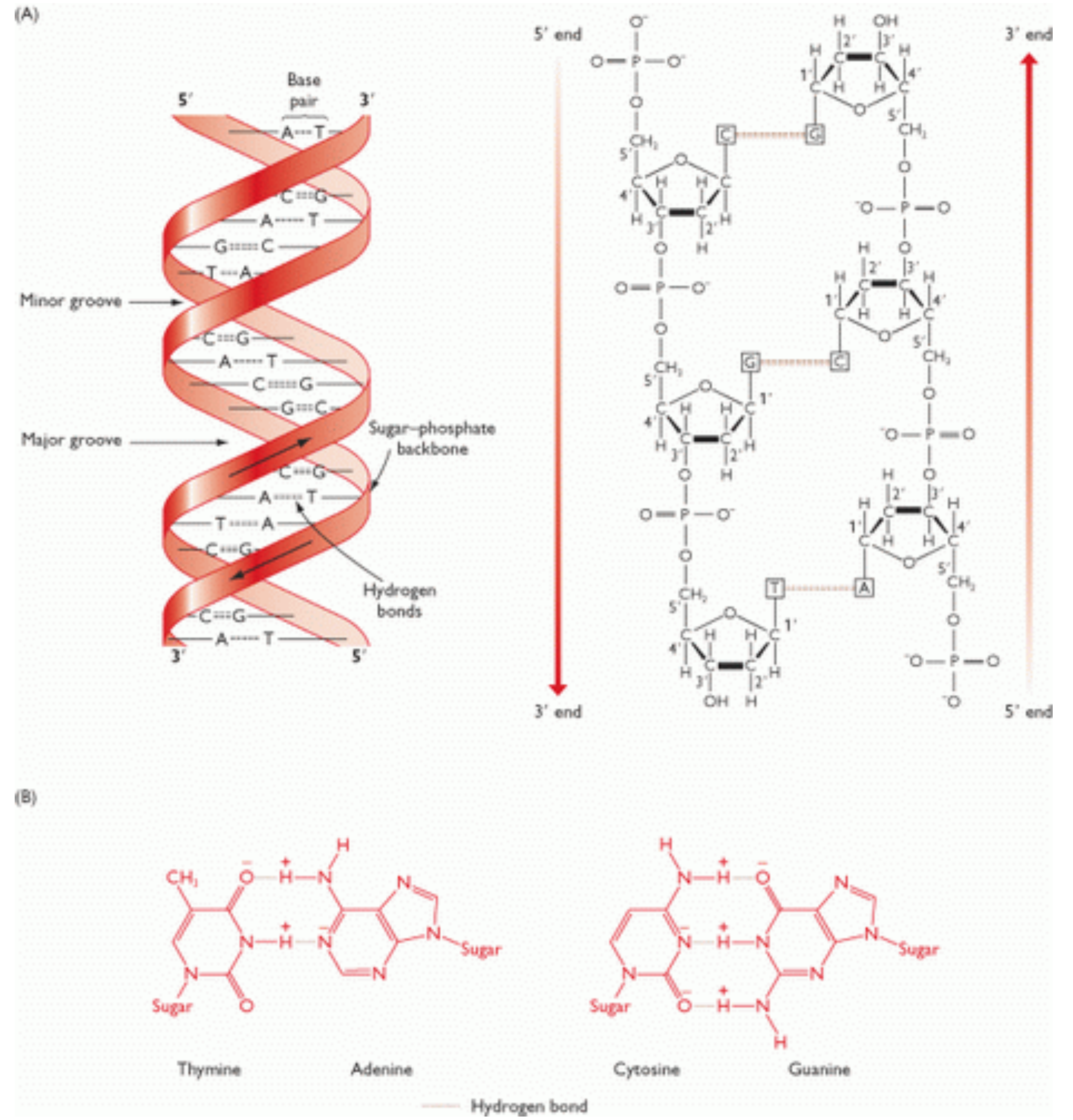
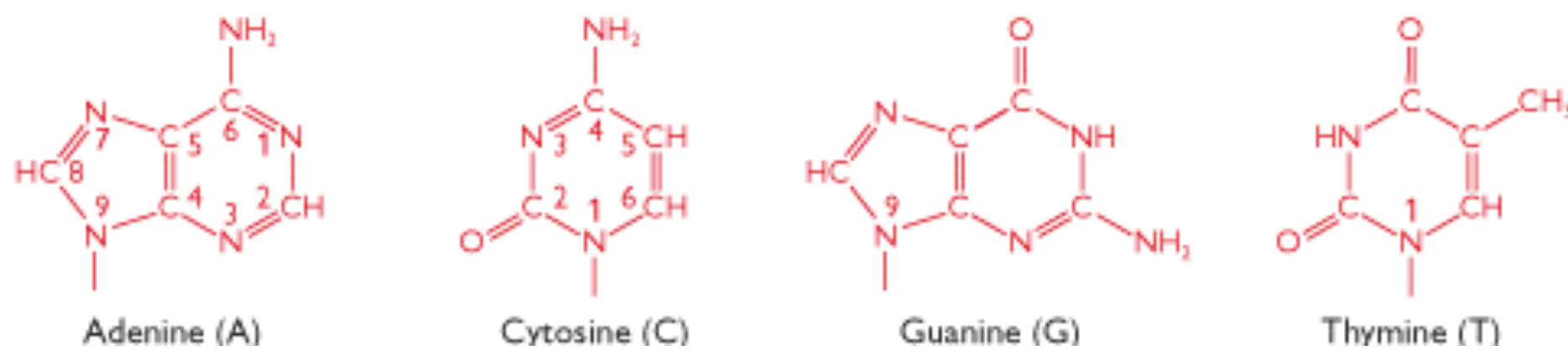
# Budowa DNA

- DNA zbudowany jest z nukleotydów
- Łańcuchy mają kierunek 5'-3'
- W cząsteczkach dwuniciowych łańcuchy są przeciwbieżne

(A) A nucleotide



(B) The four bases in DNA



# Zasada komplementarności

---

Na podstawie sekwencji jednej nici można jednoznacznie odtworzyć sekwencję nici komplementarnej

5' GATG TACTGATGACATA3'  
3' CTACATGACTACTGTAT5'

5' GATG TACTGATGACATA3'  
3' CTACATGACTACTGTAT5'



# Istota replikacji

---

- Potomna kopia jest pełnoprawną matrycą umożliwiającą odtworzenie całości informacji

# Replikacja

- Model semikonserwatywny:
- w każdej cząsteczce potomnej jedna nić rodzicielska i jedna nowa

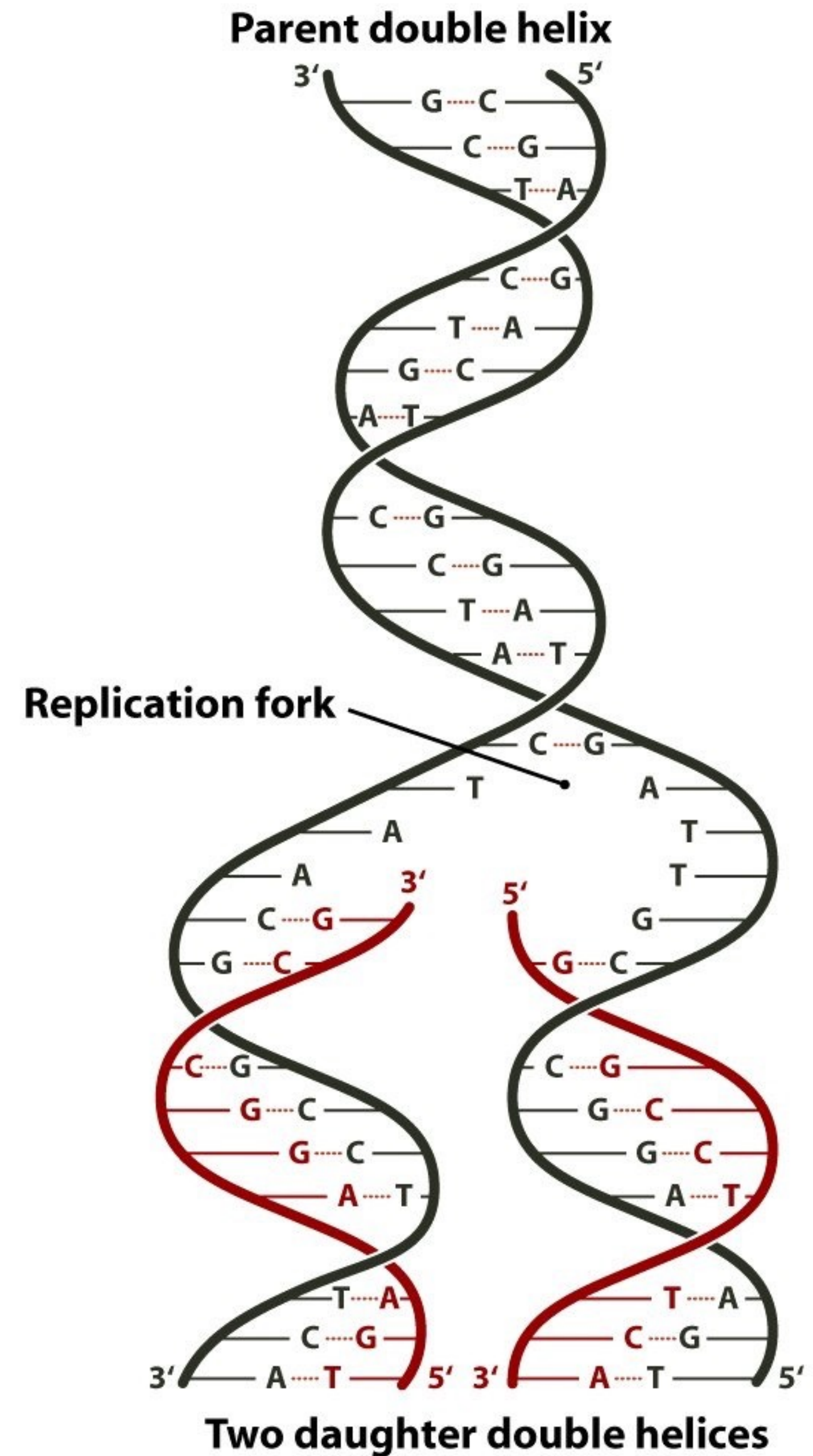


Figure 15-1 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

# Inne modele replikacji

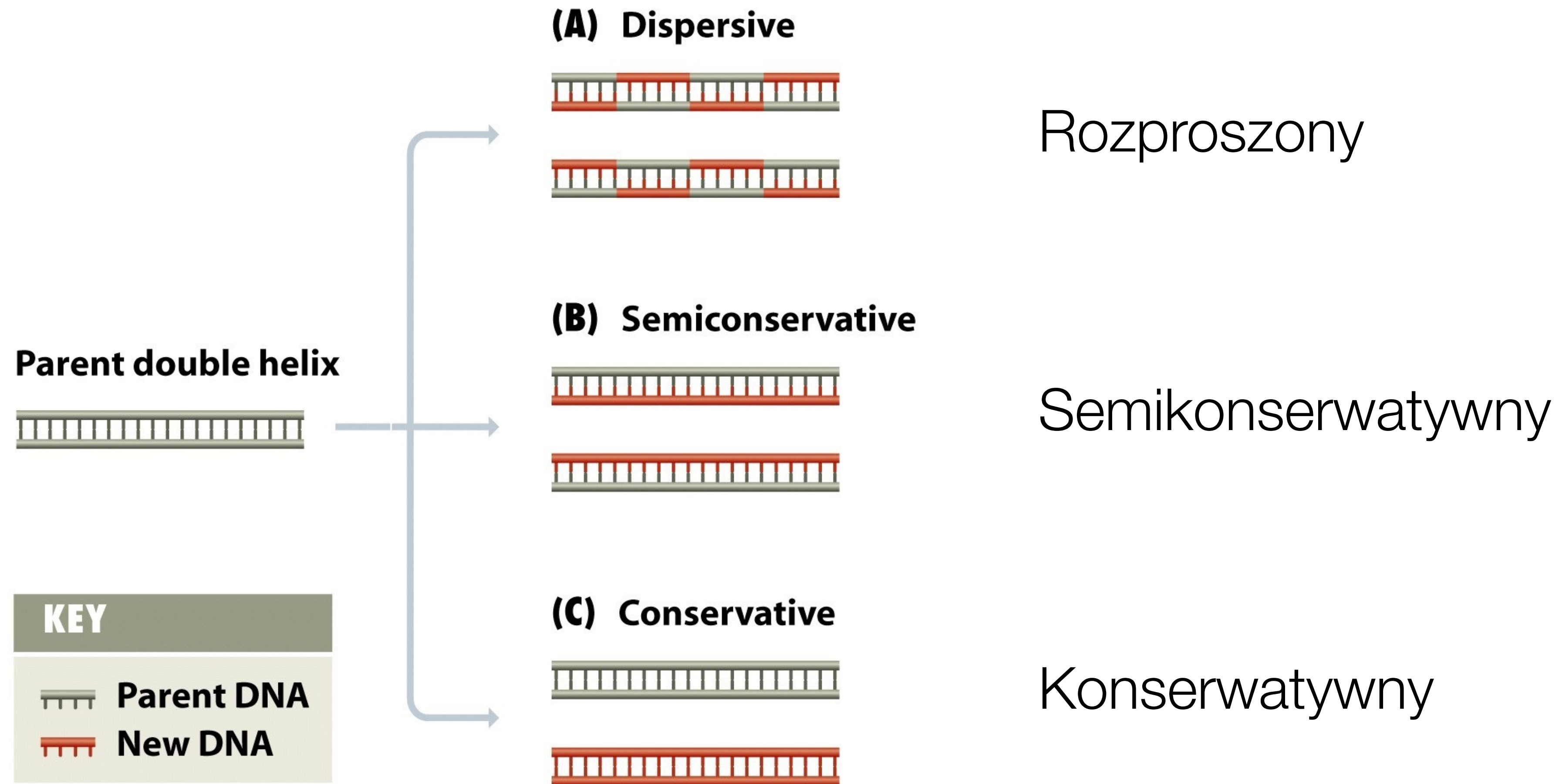
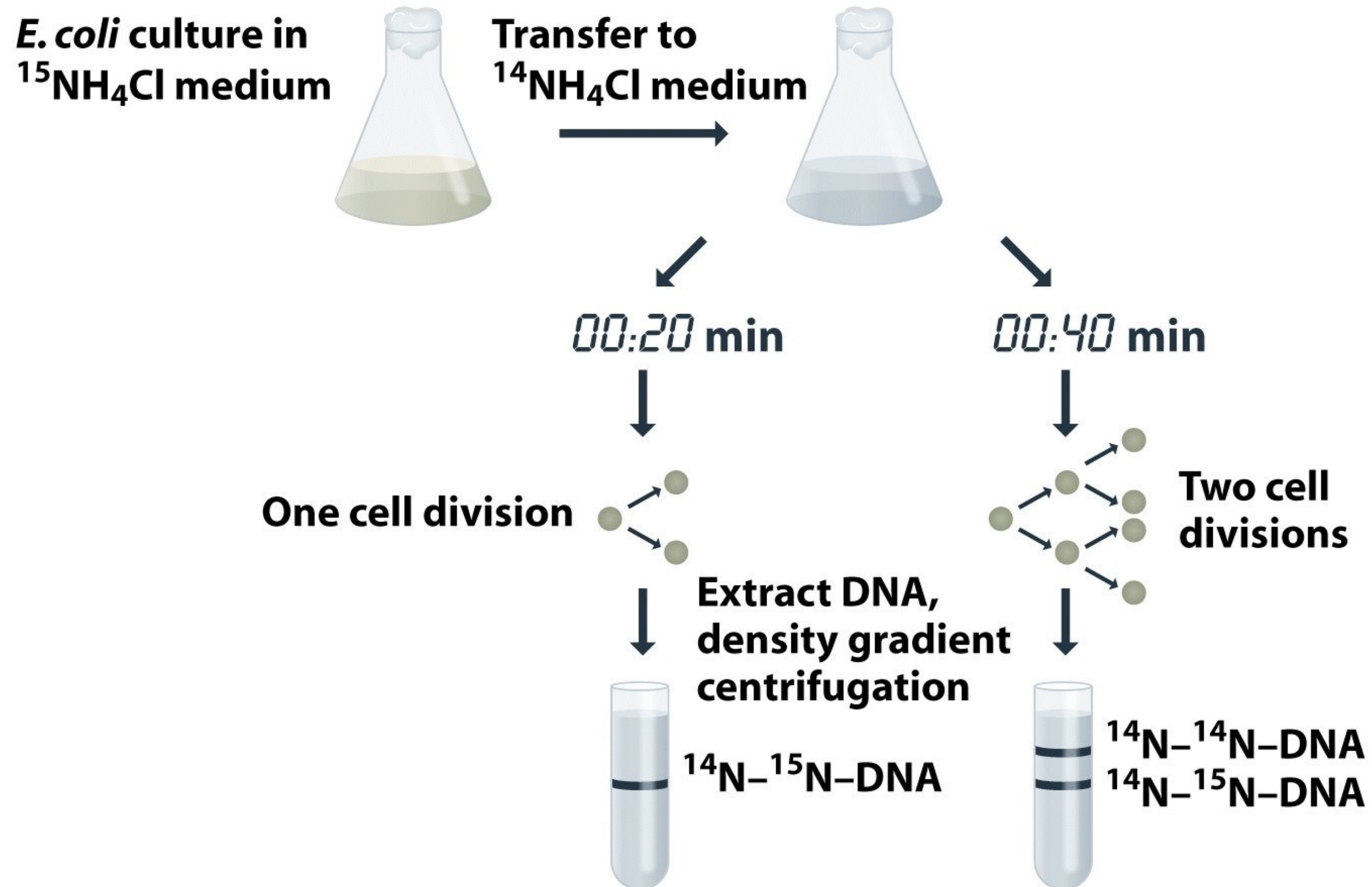


Figure 15-2 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

# Doświadczenie Meselsona i Stahla

## The experiment



# Doświadczenie Meselsona i Stahla

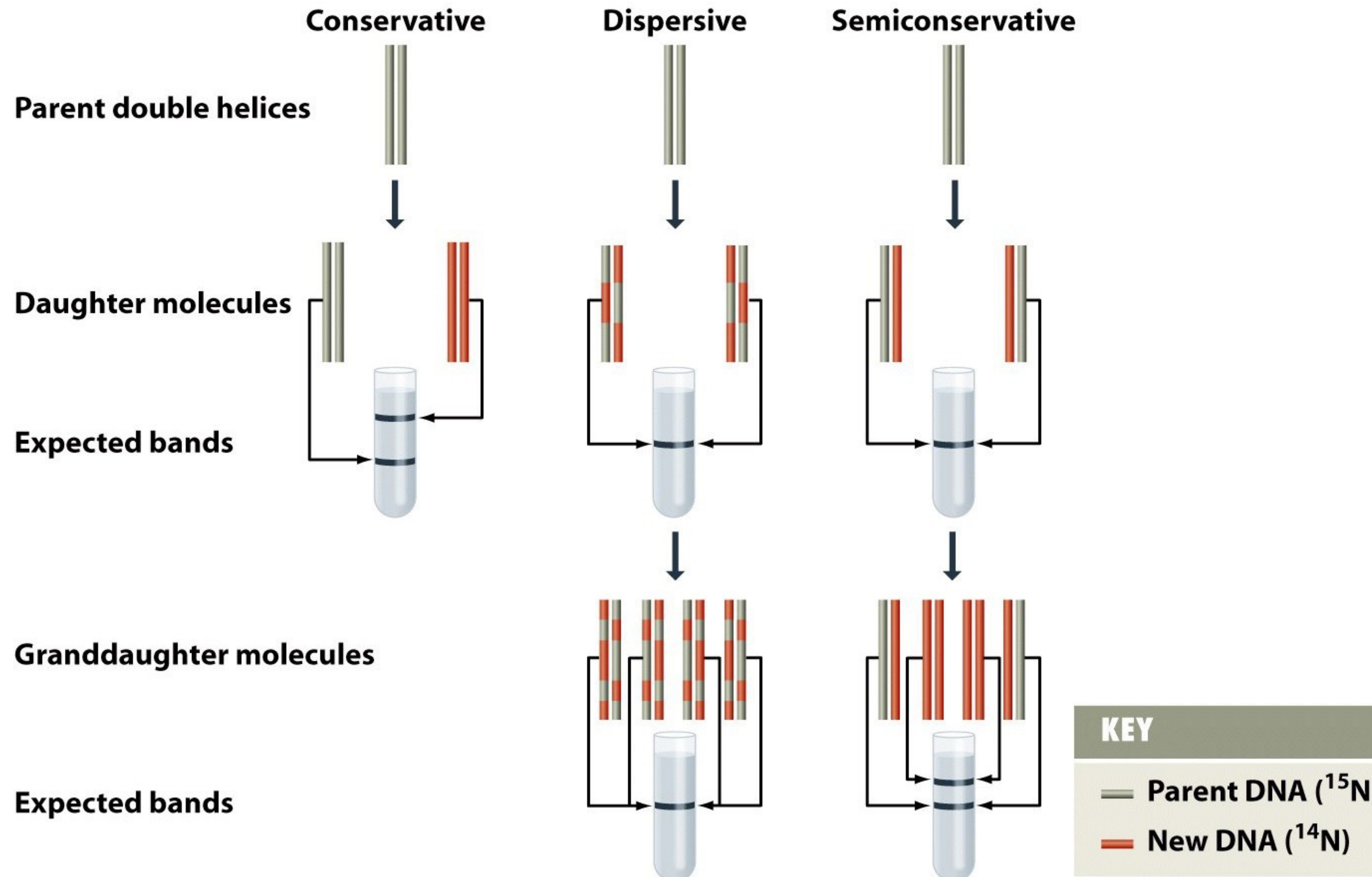
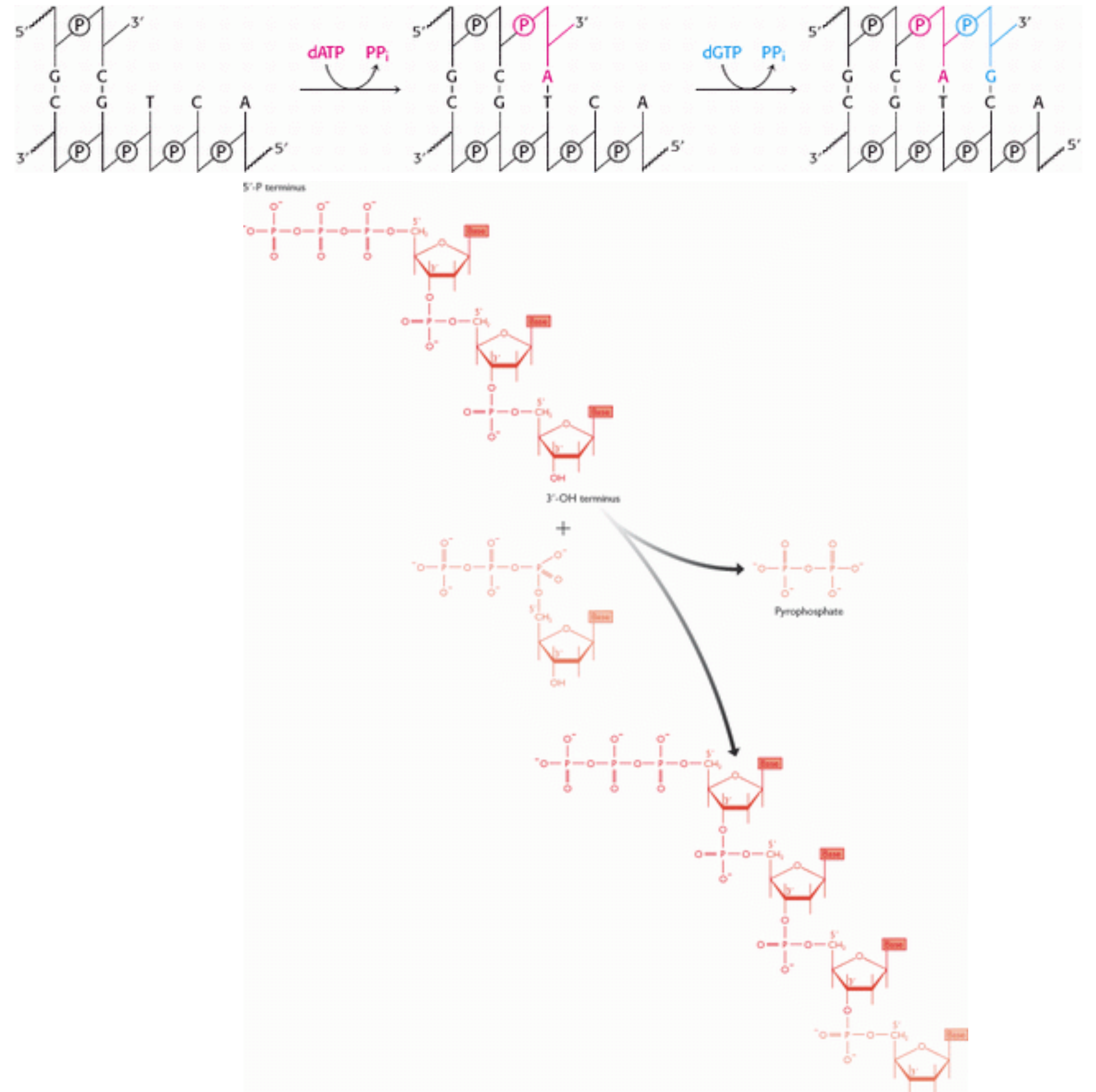


Figure 15-3b Genomes 3 (© Garland Science 2007)

# Synteza DNA - polimeraza

- Synteza DNA (i RNA też) zawsze zachodzi przez dołączanie nowych nukleotydów do grupy  $-OH$  **na końcu 3'** syntetyzowanej cząsteczki
  - zawsze w jednym kierunku!
- Substratem są trójfosforany nukleotydów, enzymem polimeraza (zależna od DNA polimeraza DNA)
- Polimeraza DNA potrafi dobudowywać nukleotydy do istniejącego łańcucha, nie potrafi rozpocząć syntezy



# Etapy replikacji

---

- Inicjacja
- Elongacja
- Terminacja

# Inicjacja u bakterii

- Replikacja rozpoczyna się w miejscu *ori*
- Rozplecenie (topnienie) podwójnej helisy DNA

## The structure of *oriC*

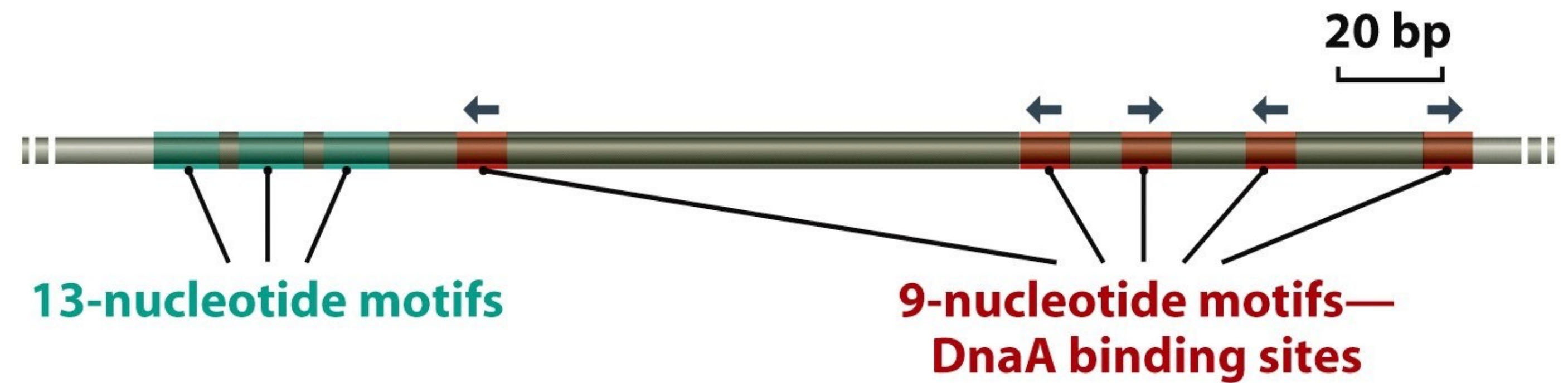


Figure 15-9a Genomes 3 (© Garland Science 2007)

## Melting of the helix

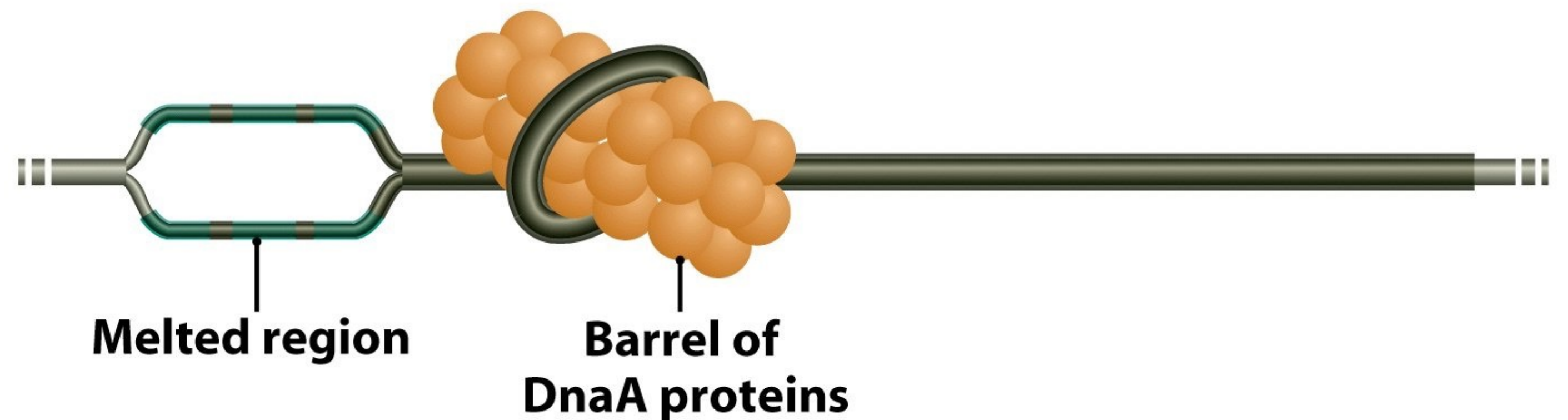
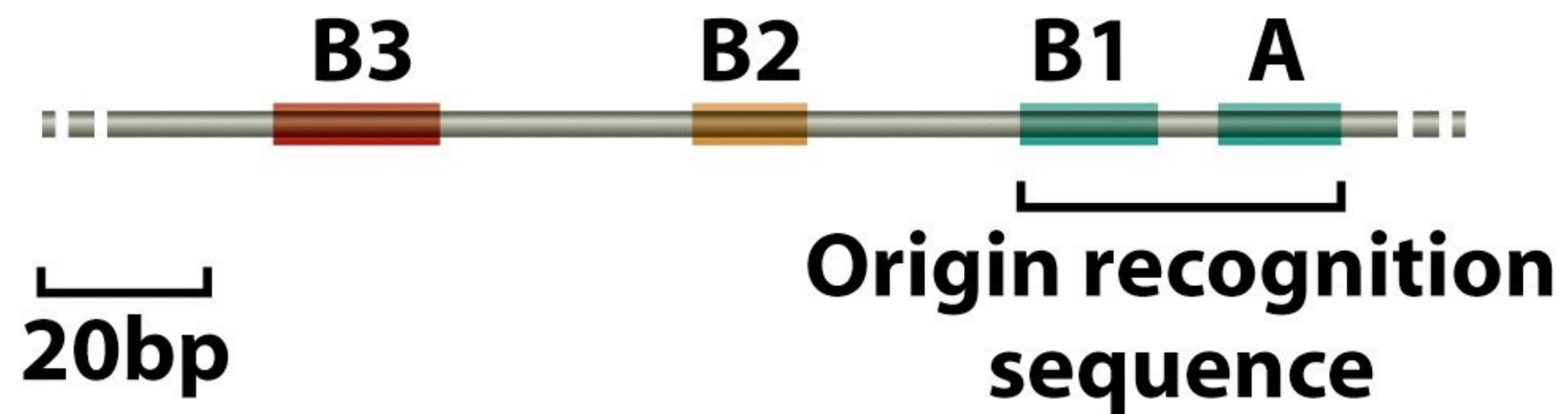


Figure 15-9b Genomes 3 (© Garland Science 2007)

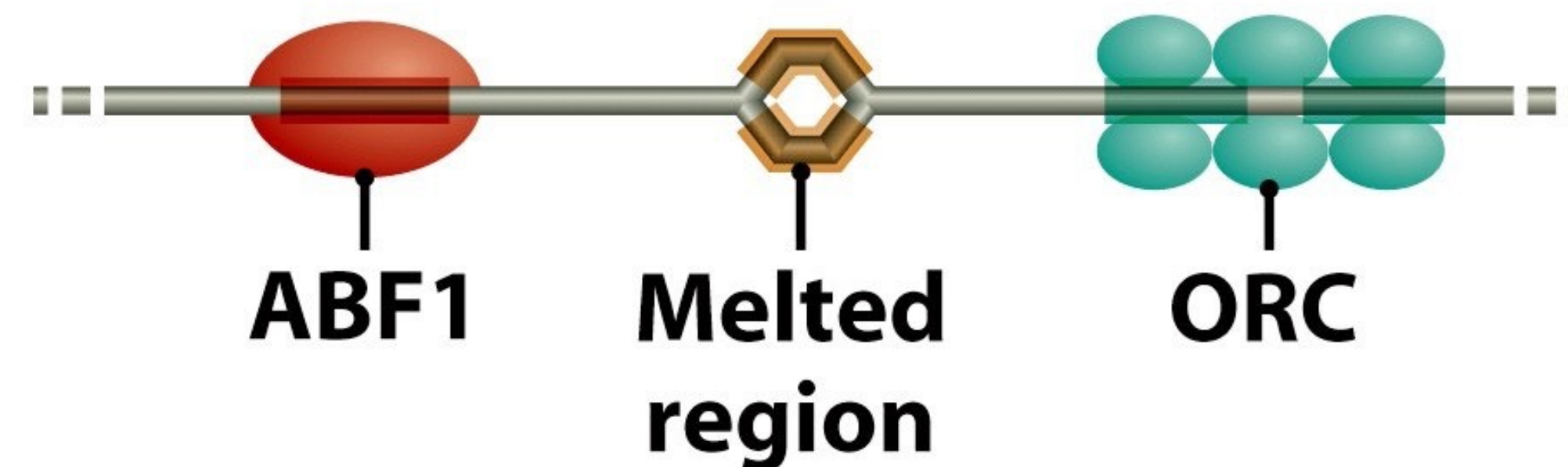


# Inicjacja u Eukaryota

## (A) Structure of a yeast origin of replication



## (B) Melting of the helix



# Elongacja

## Replication of a circular bacterial chromosome



← Direction of replication →

Figure 15-8a Genomes 3 (© Garland Science 2007)

## Replication of a linear eukaryotic chromosome

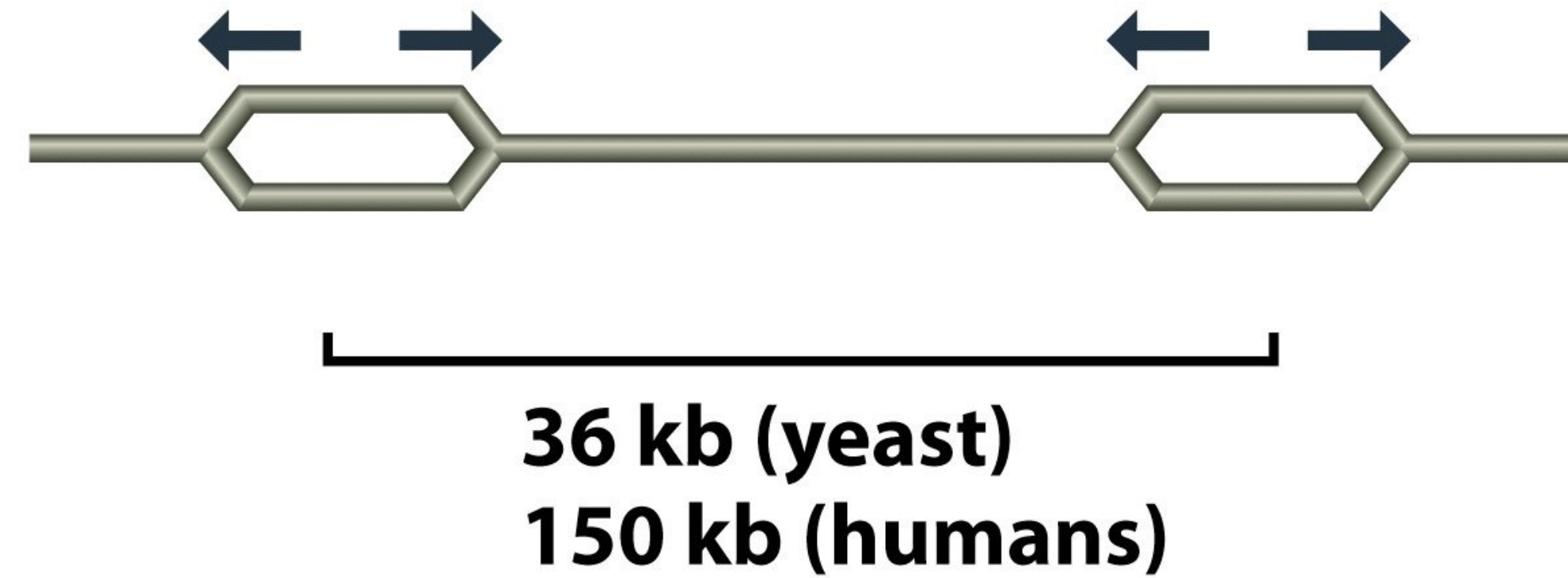
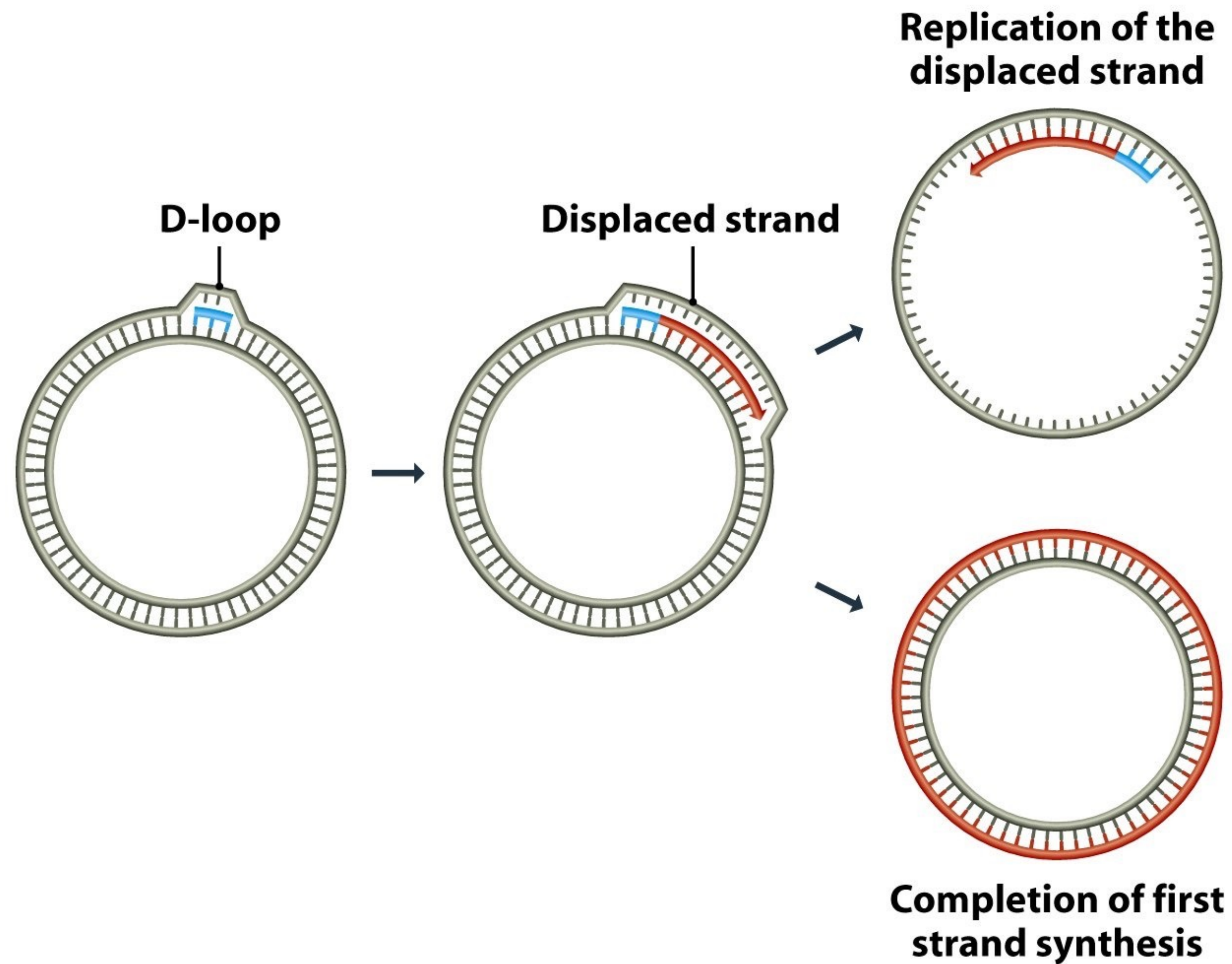
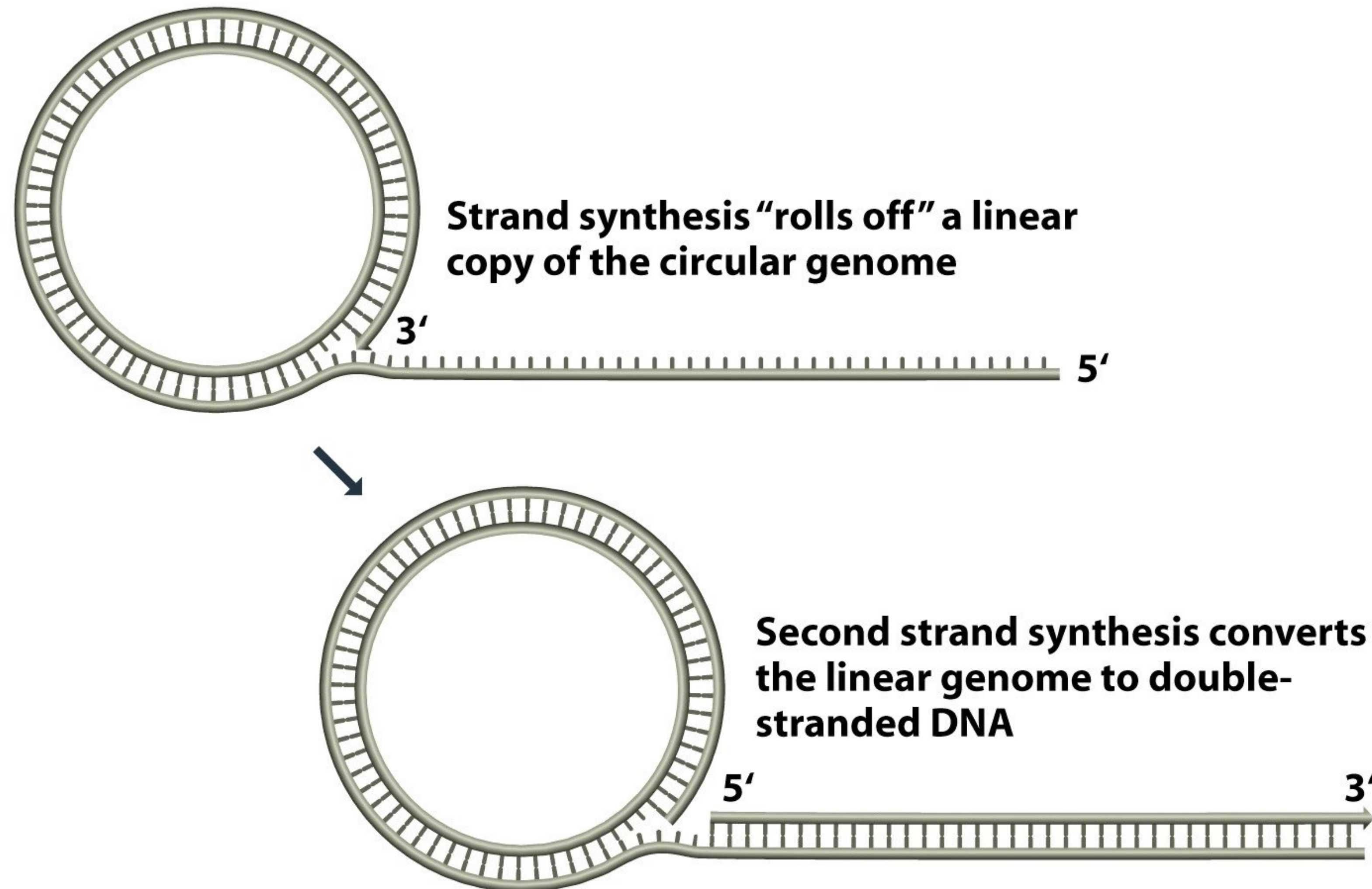


Figure 15-8b Genomes 3 (© Garland Science 2007)

# Replikacja małego genomu kolistego – pętla D



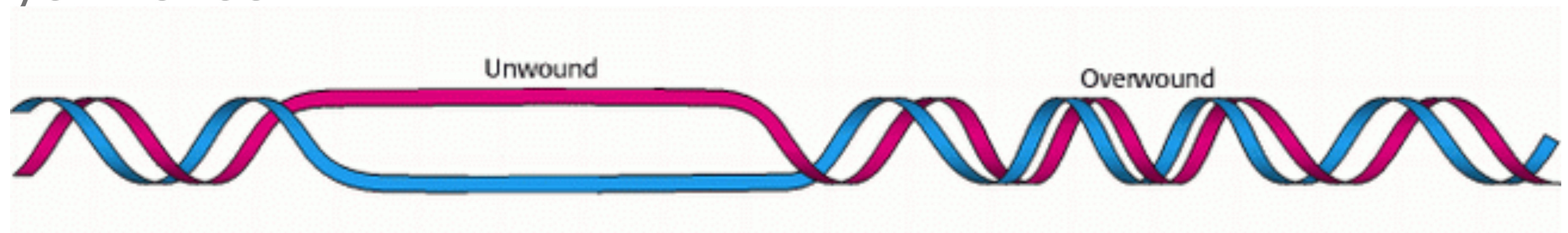
# Replikacja małego genomu kolistego – rolling circle



# Problem topologiczny

---

- Replikacja DNA postępując będzie generować naprężenia (superskręty)
- W DNA liniowym praktycznie nierozwiązywalne ze względu na upakowanie w komórce
- W DNA kolistym absolutnie nierozwiązywalne ze względu na brak wolnych końców



# Problem topologiczny - topoizomerazy

---

- Topoizomeraza typu I wprowadza nacięcie w jednej z nici, przesuwa drugą nić przez przerwę i łączy końce
- Topoizomerazy typu II nacinają obie nici

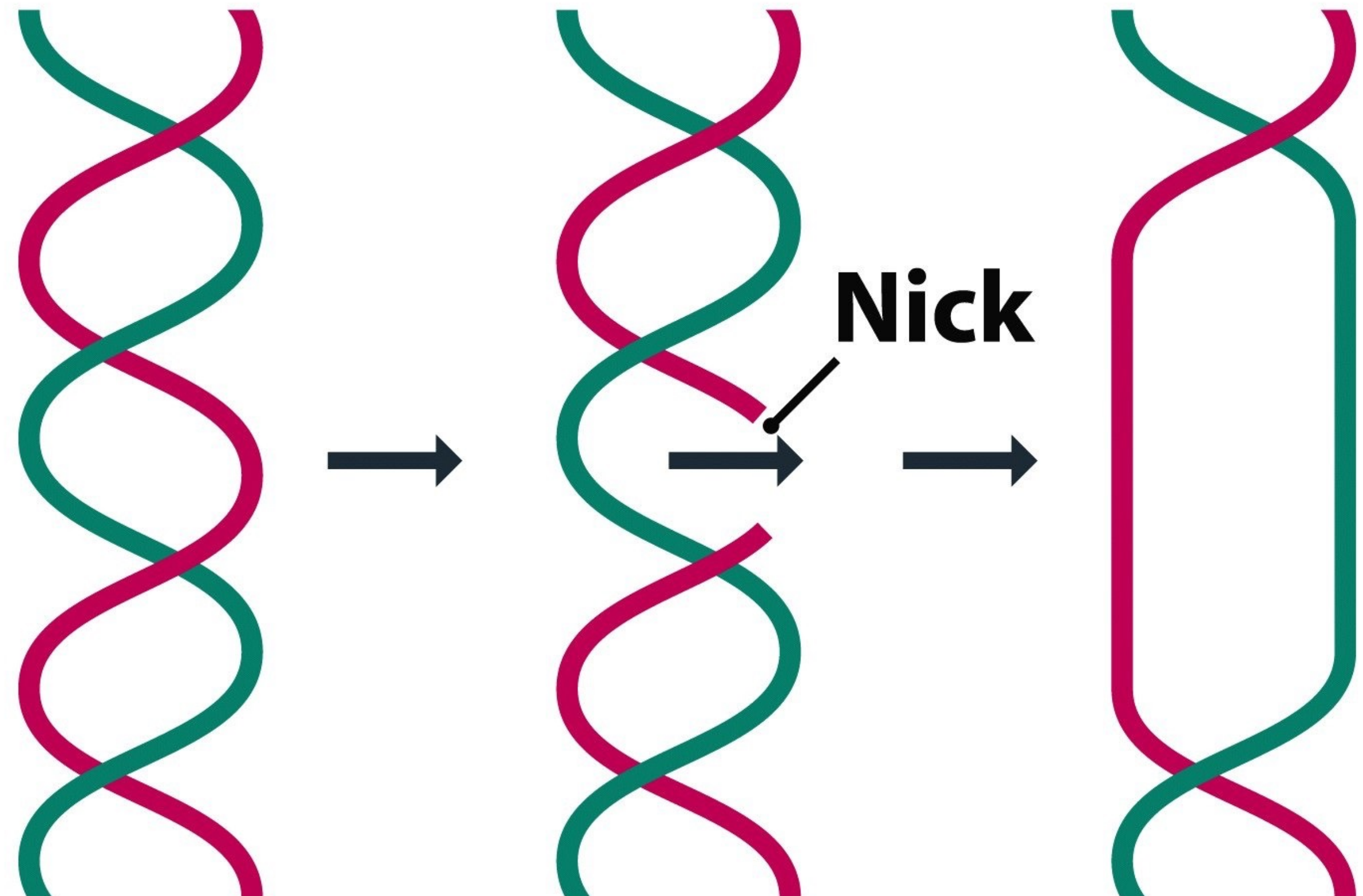
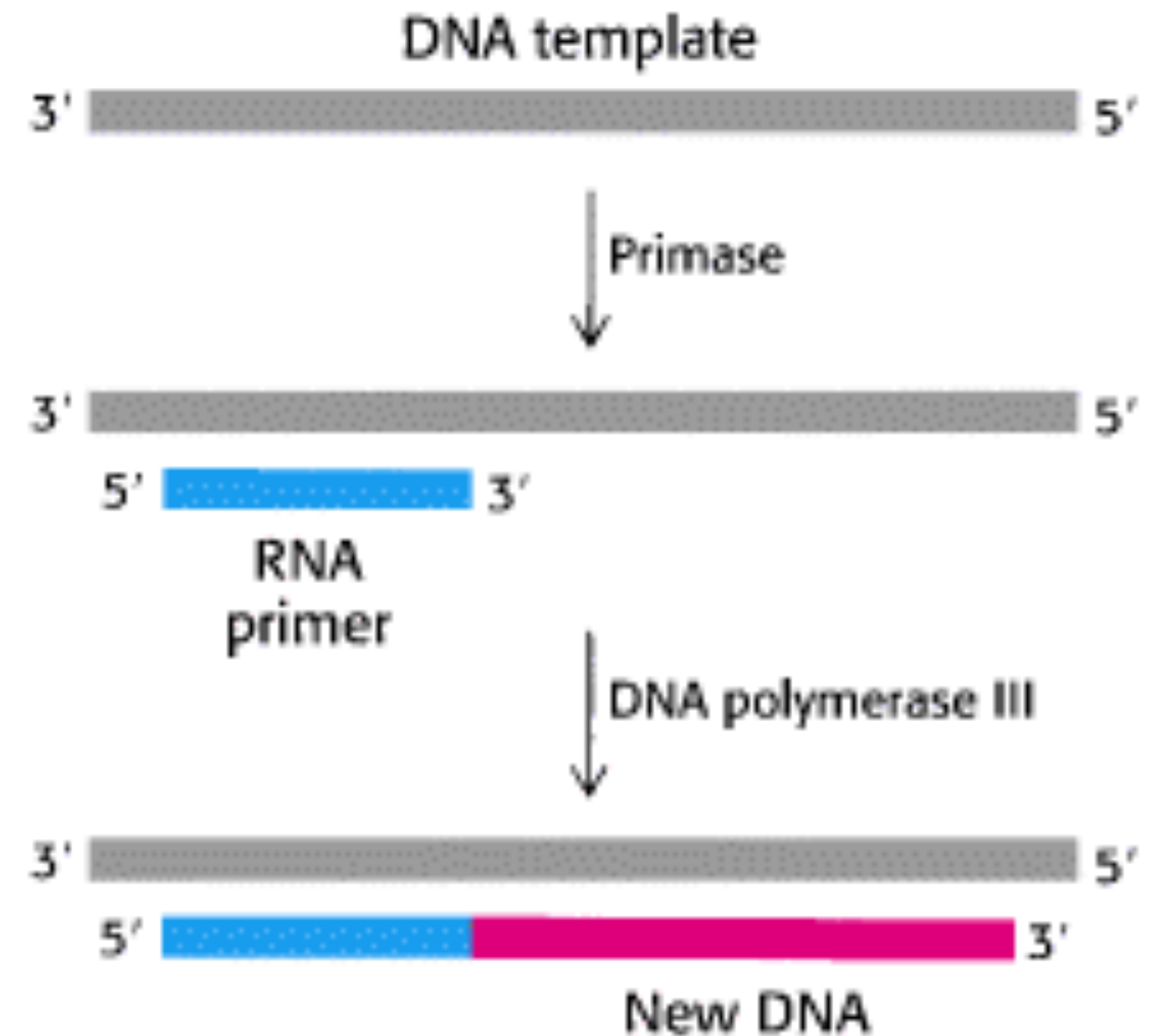


Figure 15-4 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

# Startery

---

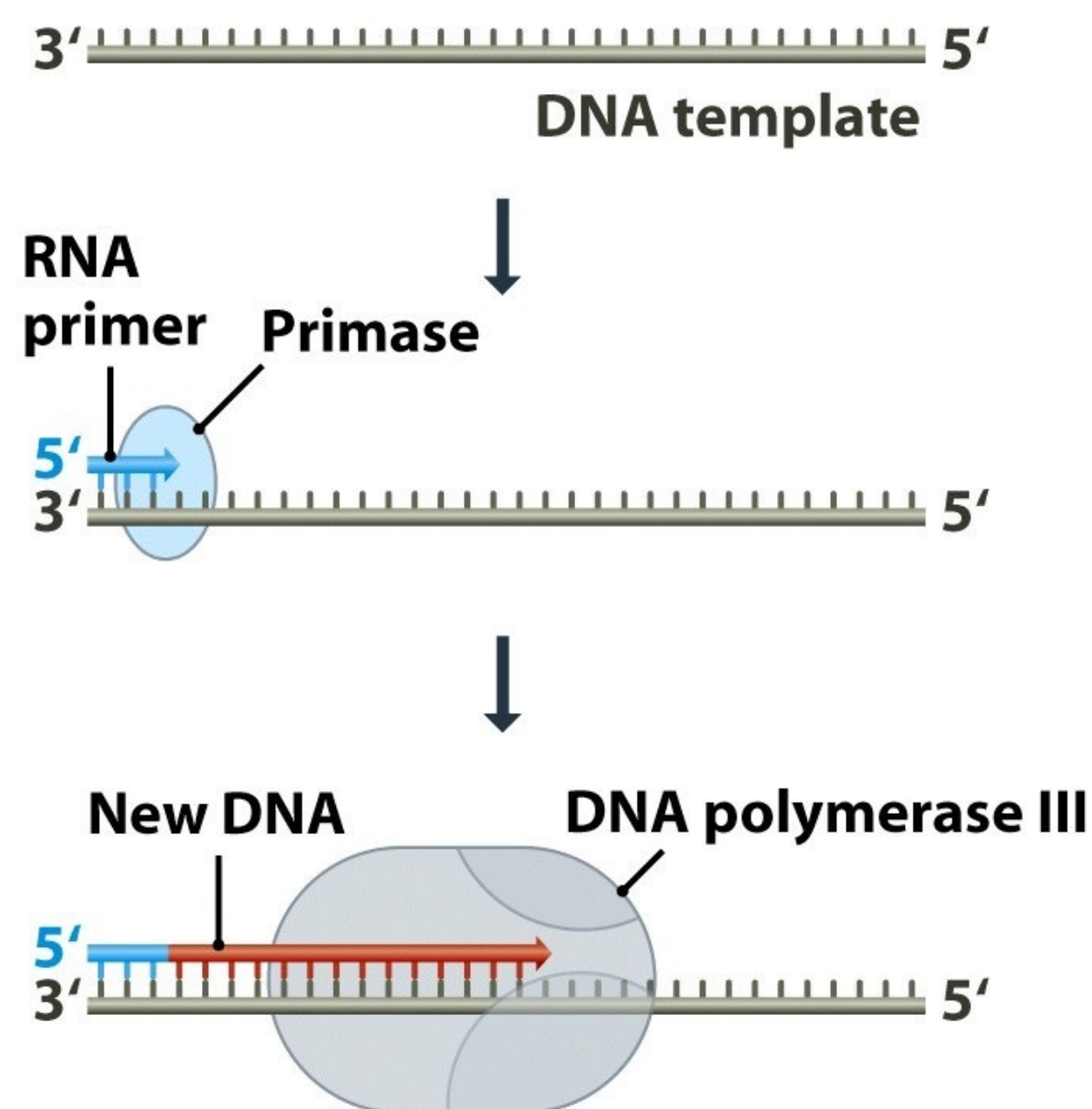
- Startery do replikacji zbudowane są z RNA
- Za ich syntezę odpowiada aktywność **prymazy**
- Prymaza (polimeraza RNA zależna od DNA) syntetyzuje starter (RNA) dla polimerazy DNA, która go wydłuża



# Prymaza

- U bakterii prymaza to odrębny enzym, syntezę DNA po niej przejmuje polimeraza DNA III
- U Eukaryota kompleks polimerazy  $\alpha$  ma aktywność prymazy i polimerazy DNA - tworzy starter RNA i zapoczątkowuje syntezę DNA, po nim syntezę przejmują inne polimerazy (np. pol  $\delta$ )

**(A) Priming of DNA synthesis in bacteria**



**(B) Priming of DNA synthesis in eukaryotes**

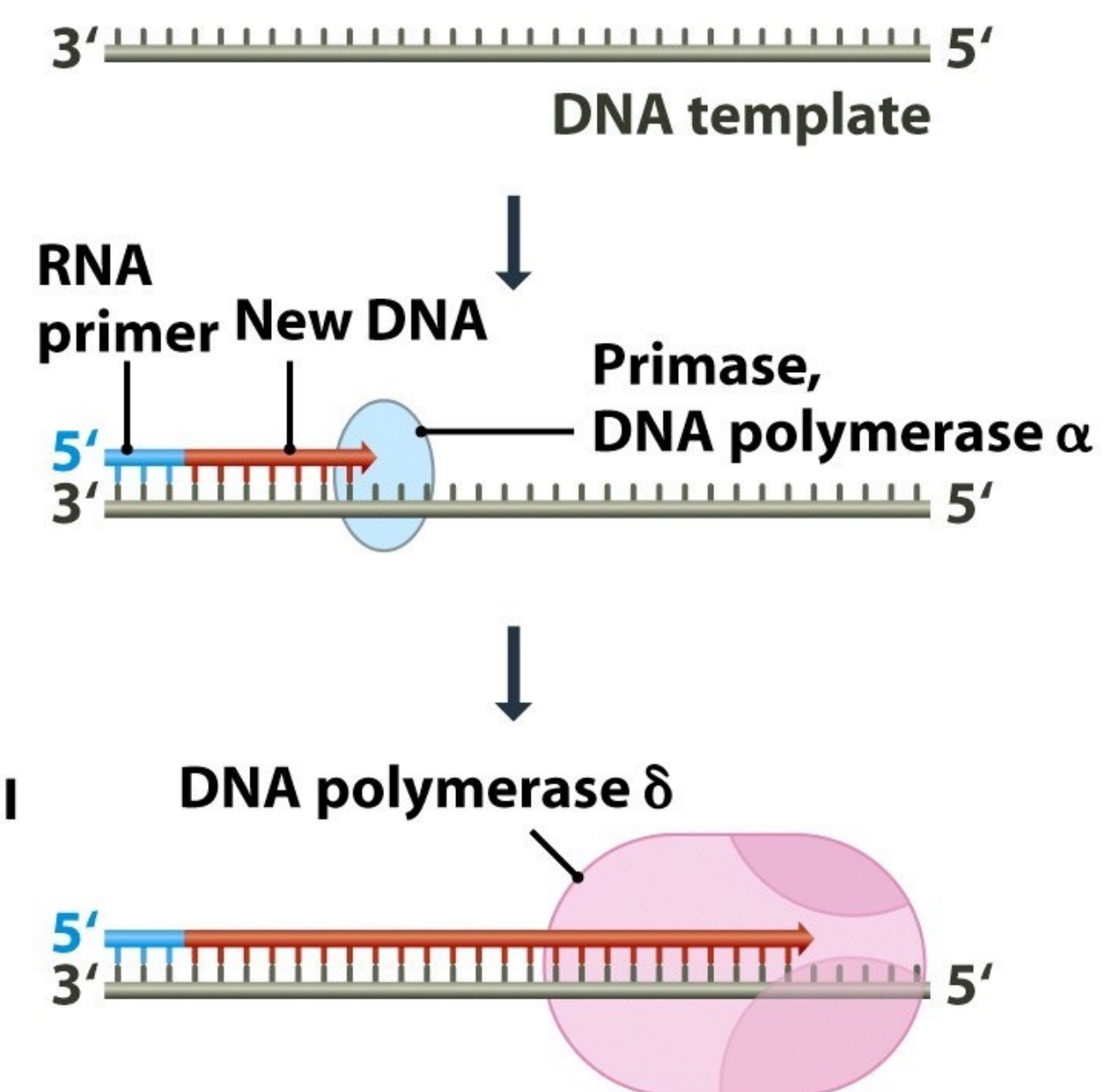
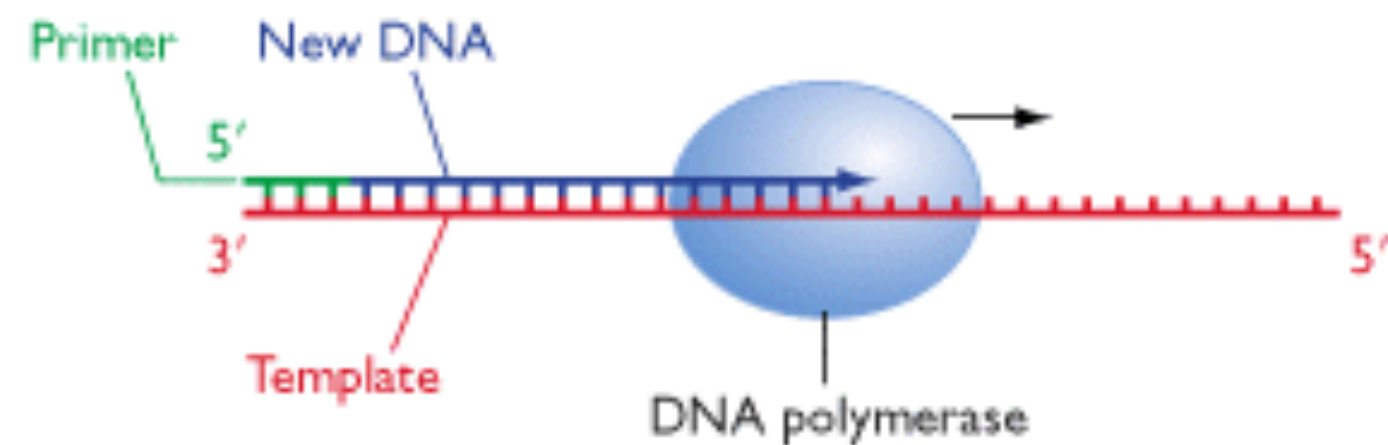


Figure 15-13 Genomes 3 (© Garland Science 2007)



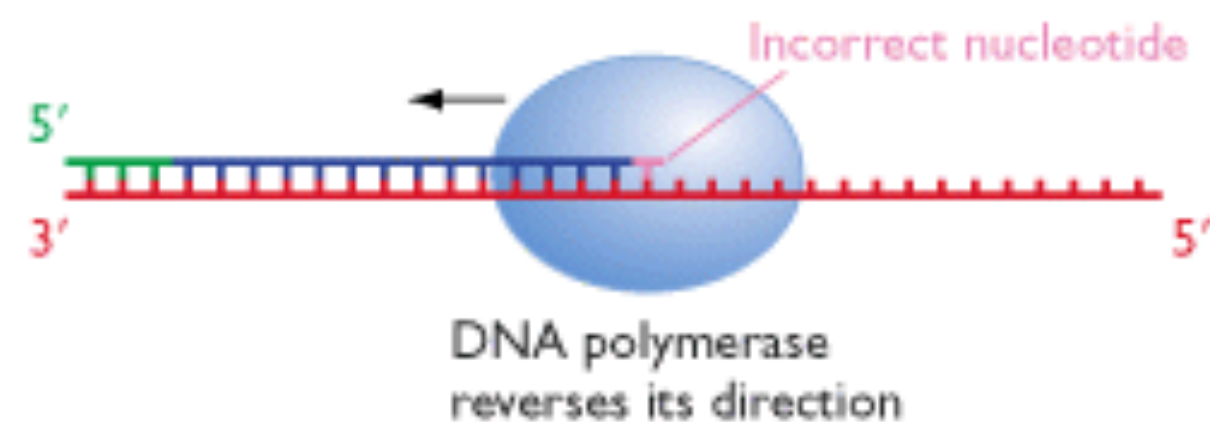
# Aktywności polimeraz DNA

(A) 5'→3' DNA synthesis



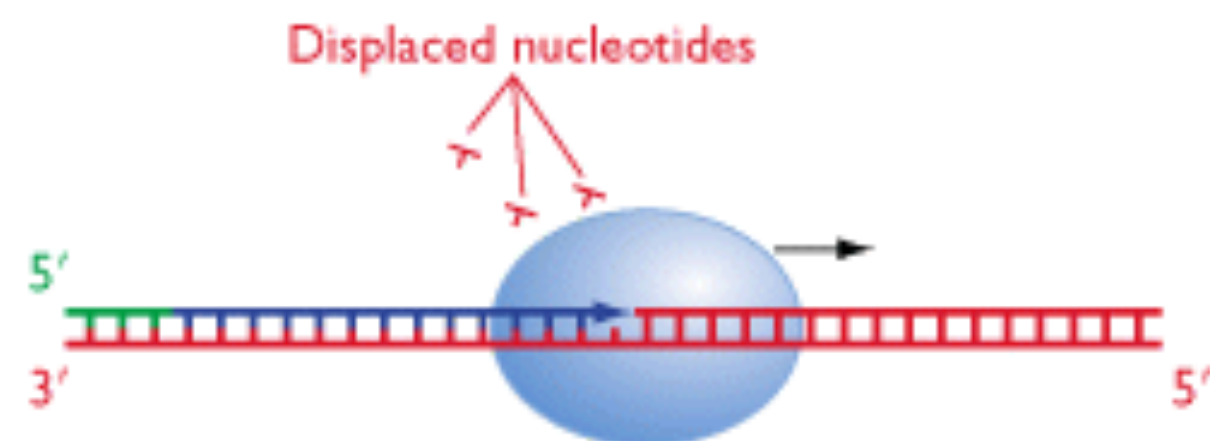
Synteza DNA – wszystkie polimerazy (z definicji).

(B) 3'→5' exonuclease activity



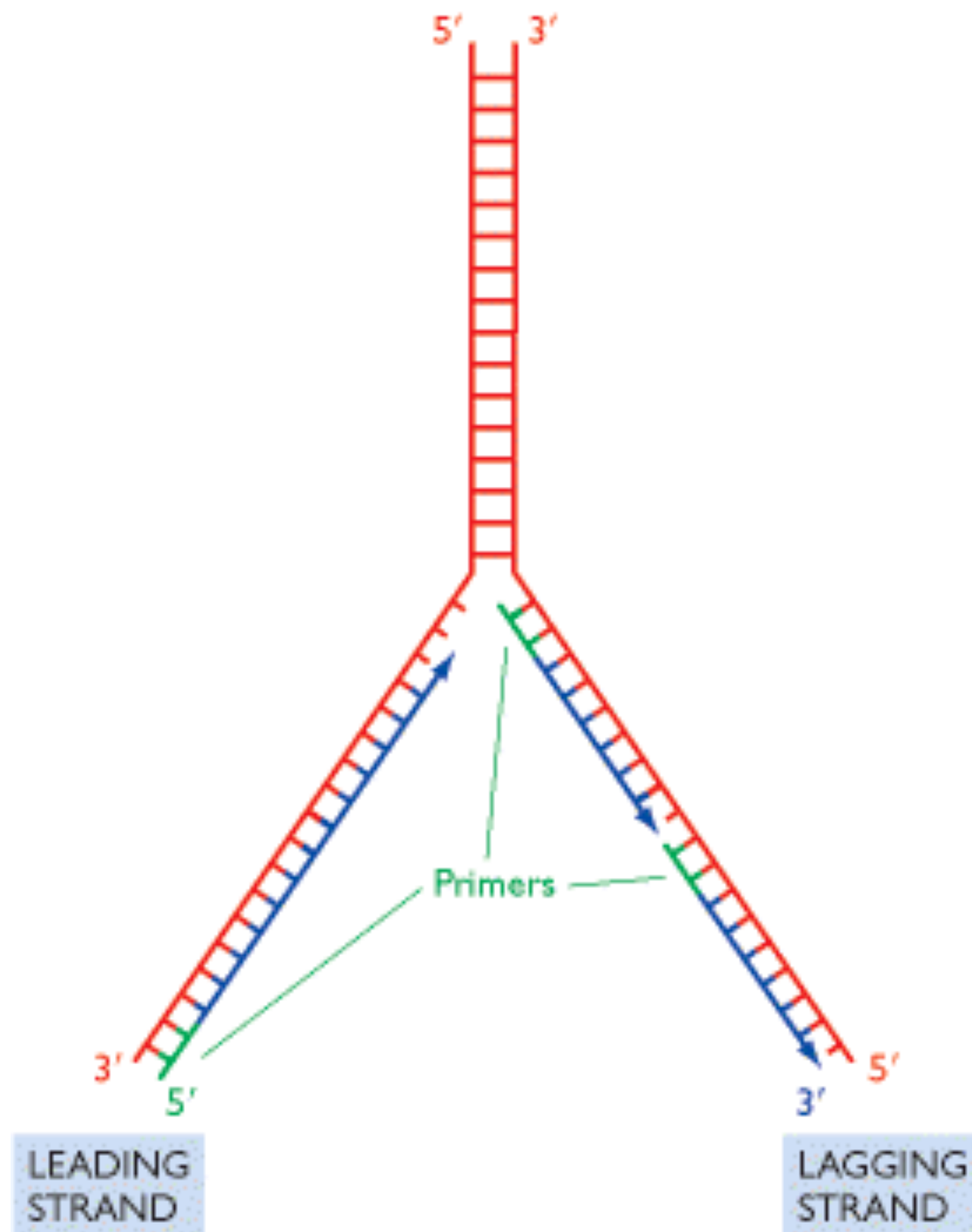
Egzonukleaza 3'-5' –  
korekcja błędów (większość polimeraz replikacyjnych, ale nie wszystkie).

(C) 5'→3' exonuclease activity

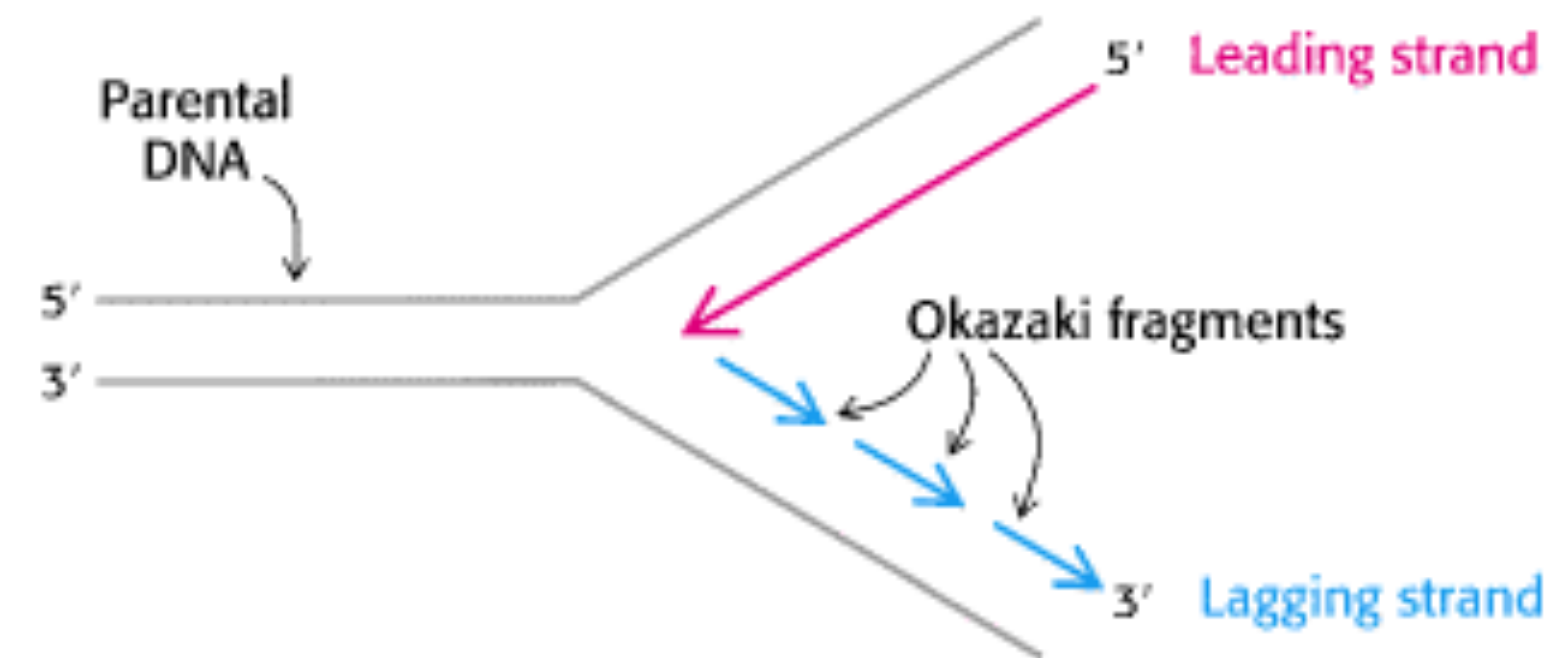


Egzonukleaza 5'-3' –  
naprawa uszkodzeń, usuwanie starterów.  
Niektóre polimerazy bakteryjne, u Eukariota jest to osobny enzym.

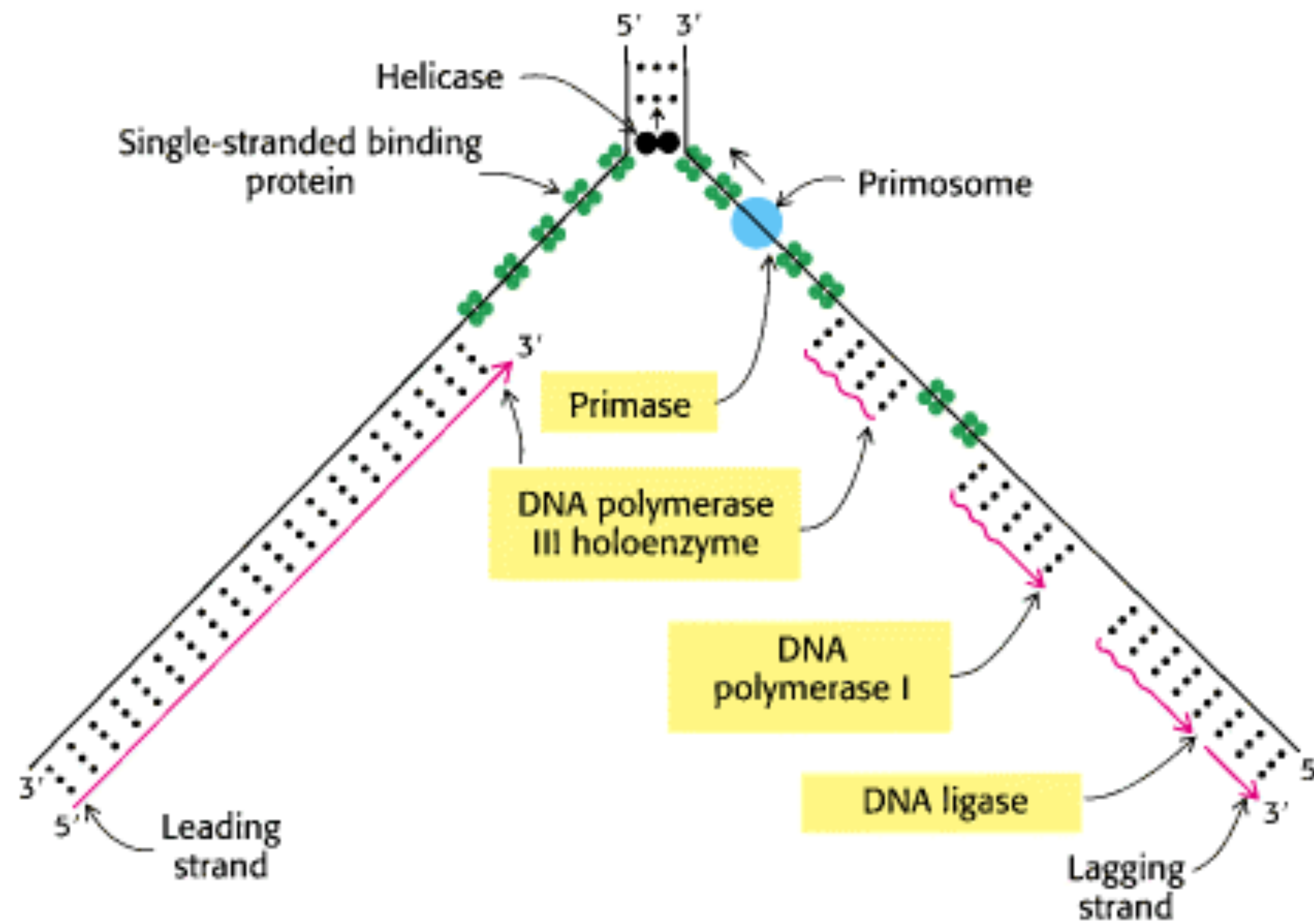
# Problem nici nieciągłej



Na nici nieciągłej trzeba co pewien odcinek ponawiać syntezę startera – fragmenty Okazaki

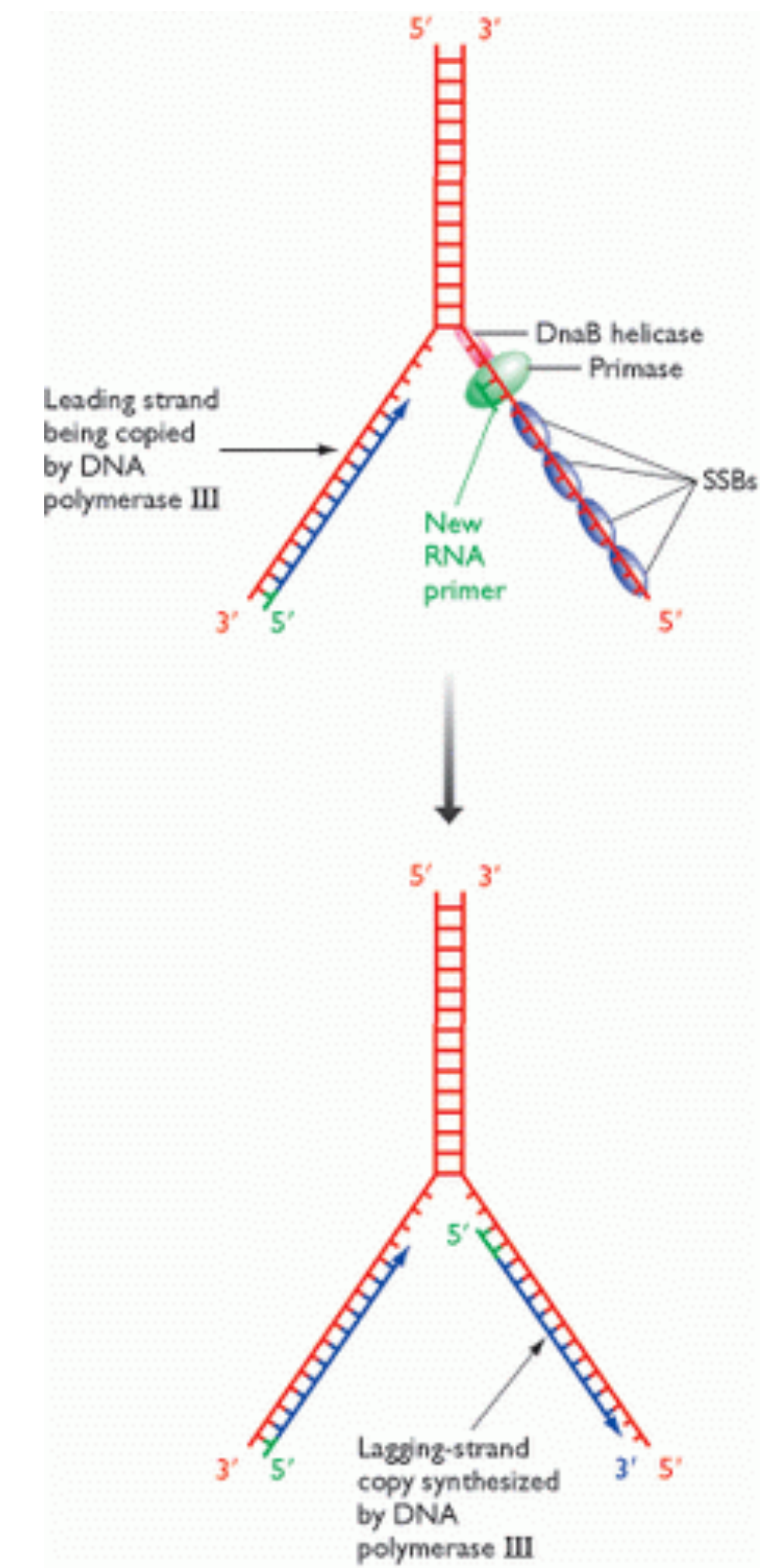
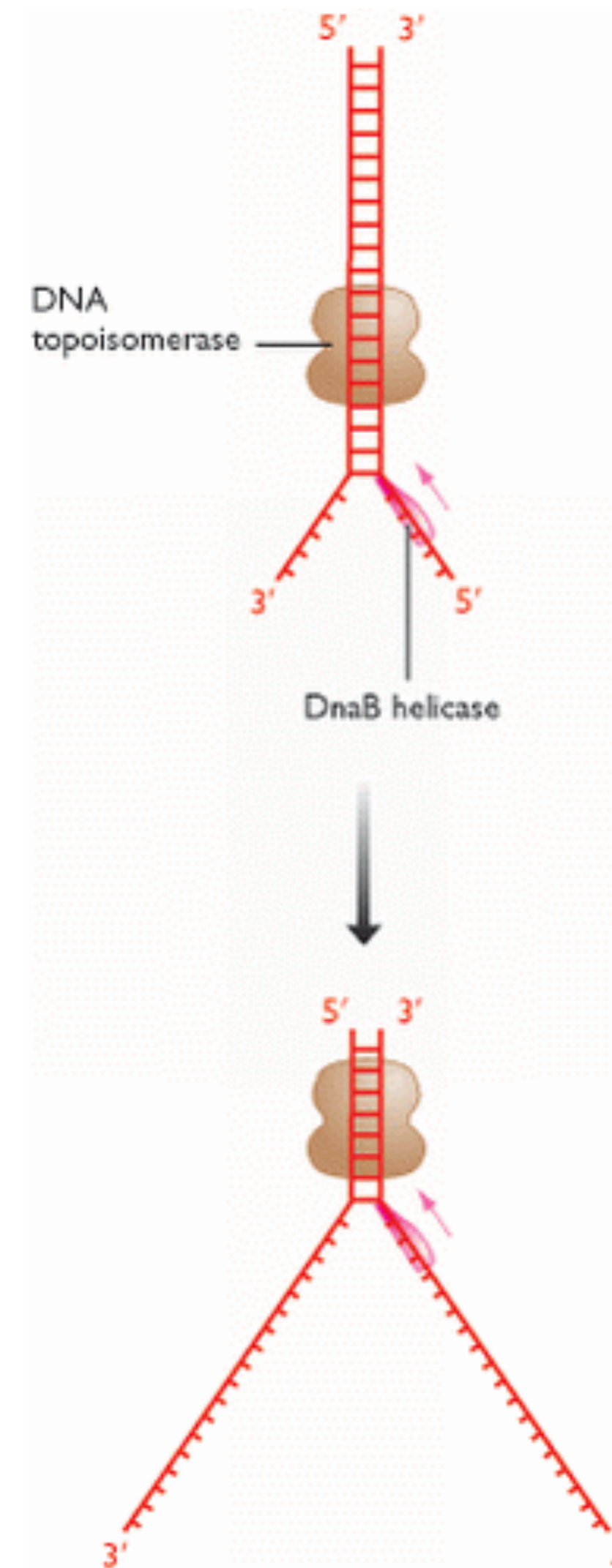


# Maszynaria replikacyjna

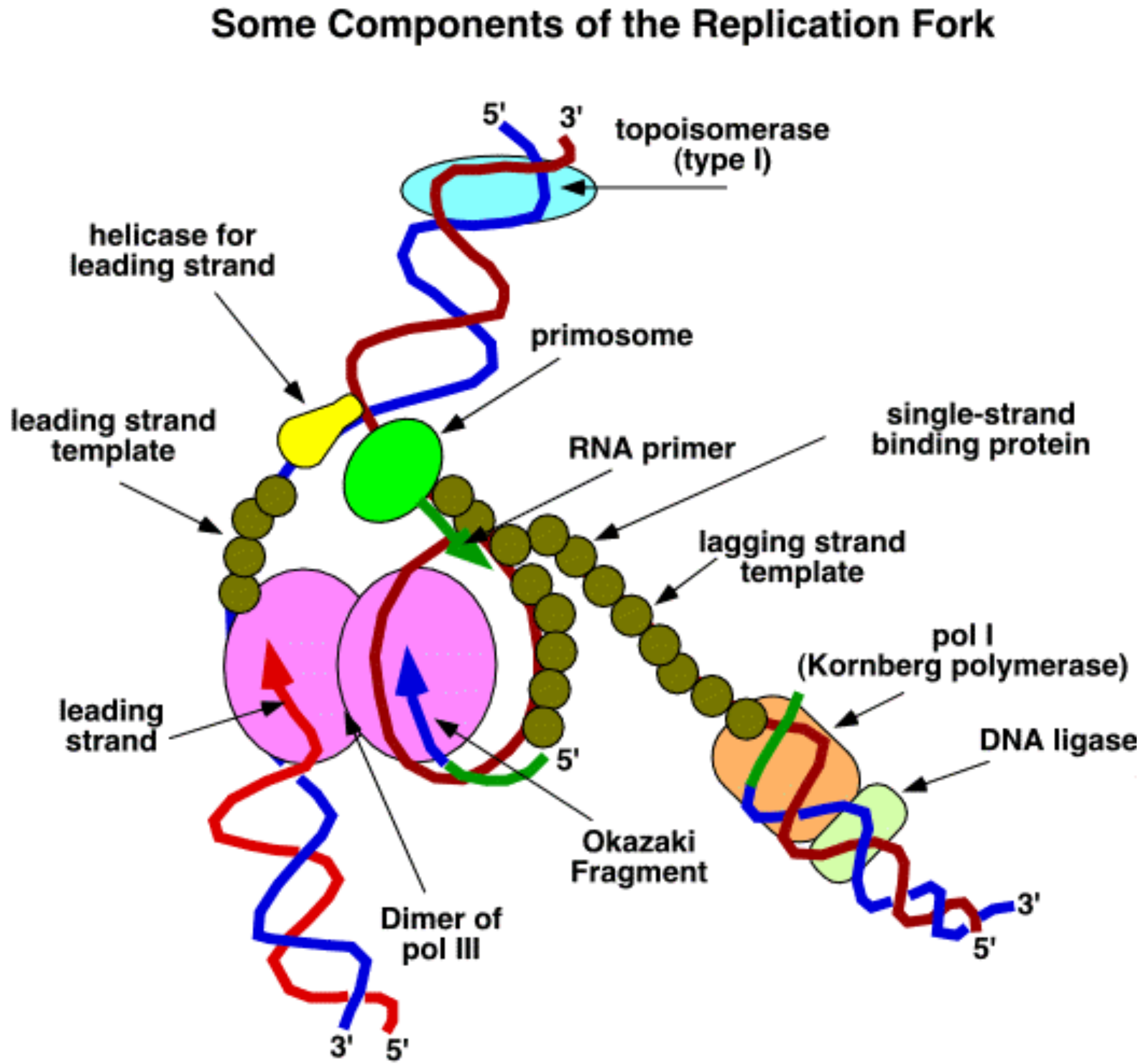
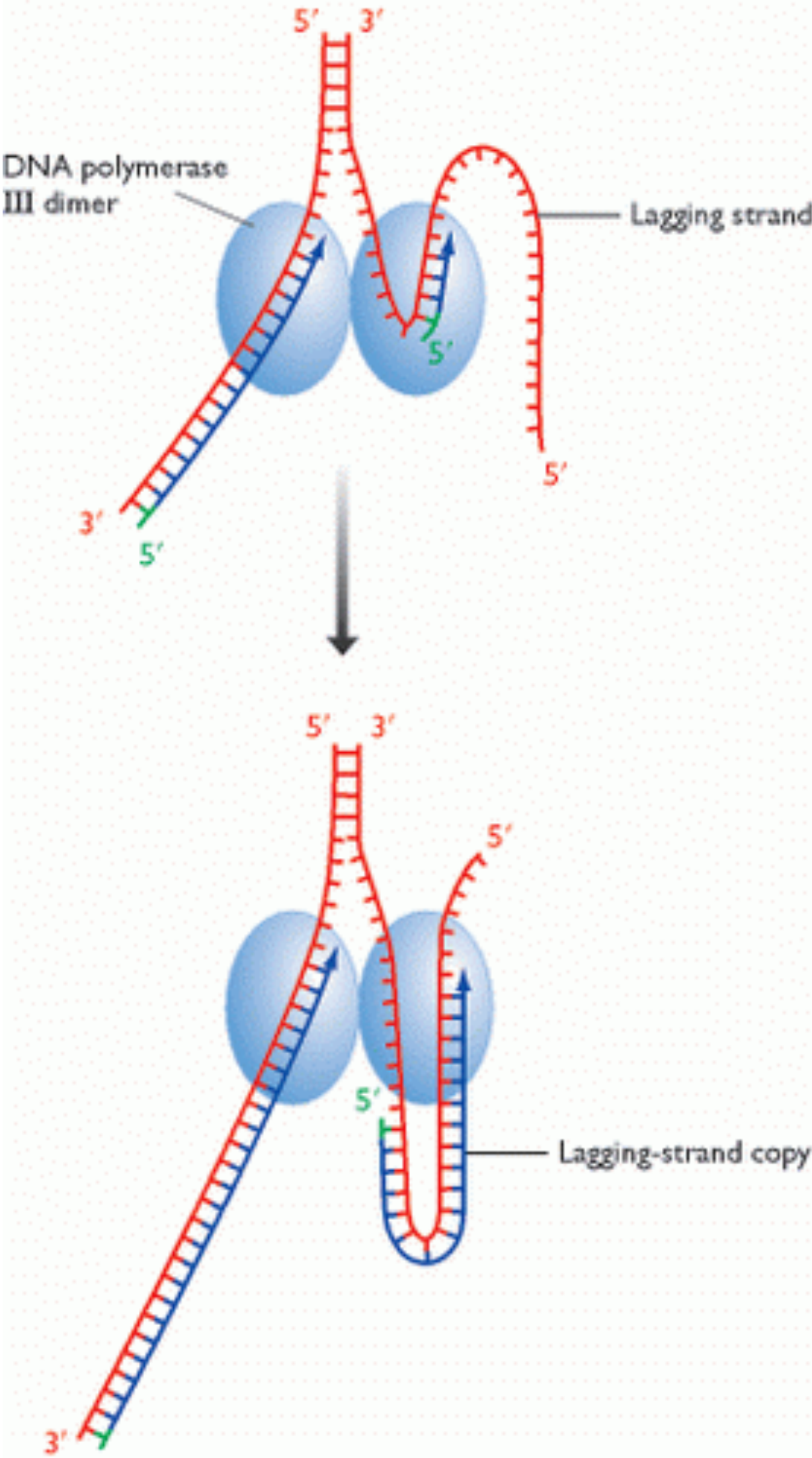


# Maszyneria replikacyjna

- Topoizomeraza - usuwa naprężenia
- Helikaza (DnaB) - rozdziela nici
- SSB – stabilizuje jednoniciowy DNA
- Prymaza – syntetyzuje startery
- Polimeraza (-y)
- Ligaza – skleja fragmenty



# Widelki replikacyjne - topologia

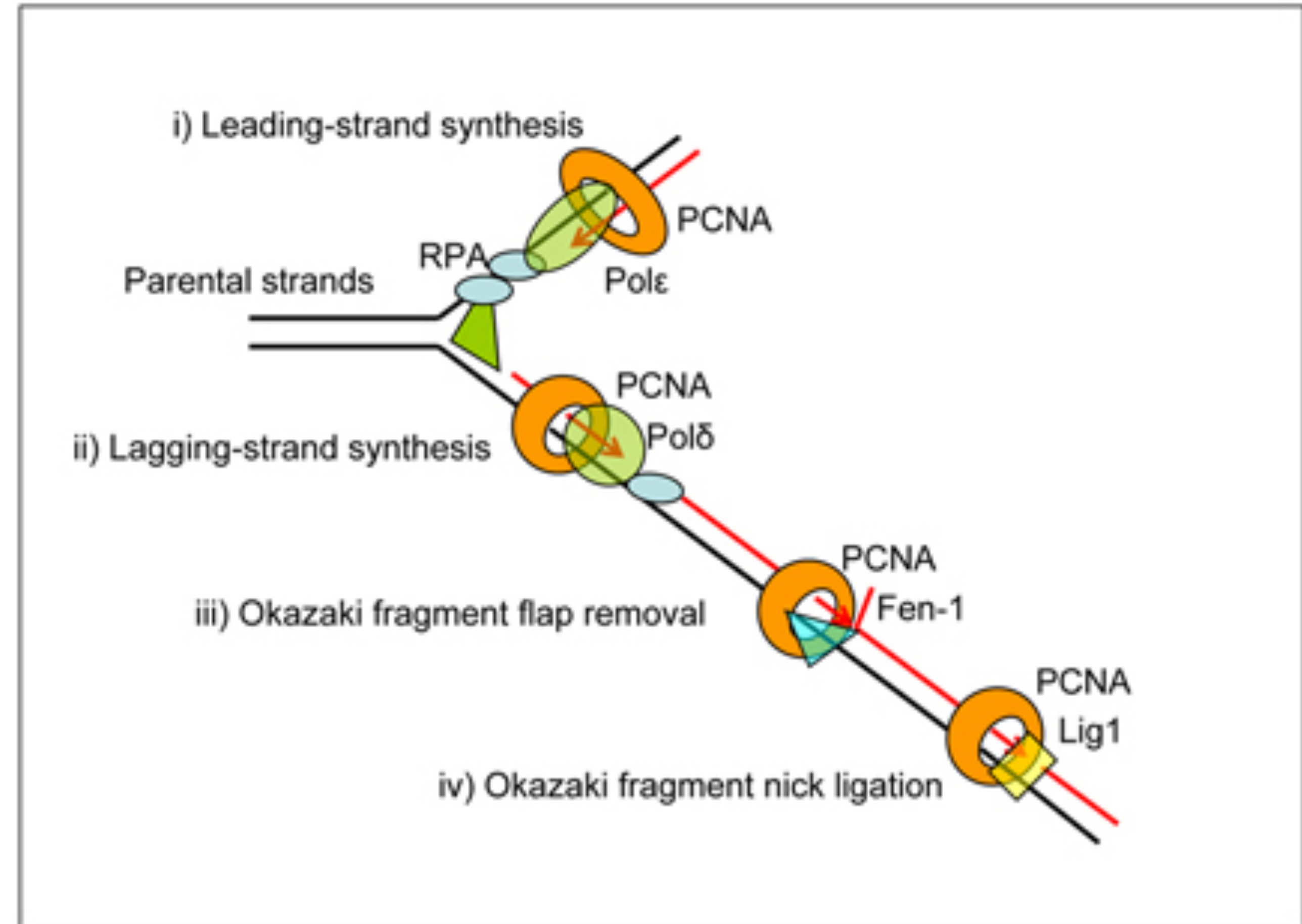




[www.dnalc.org](http://www.dnalc.org)

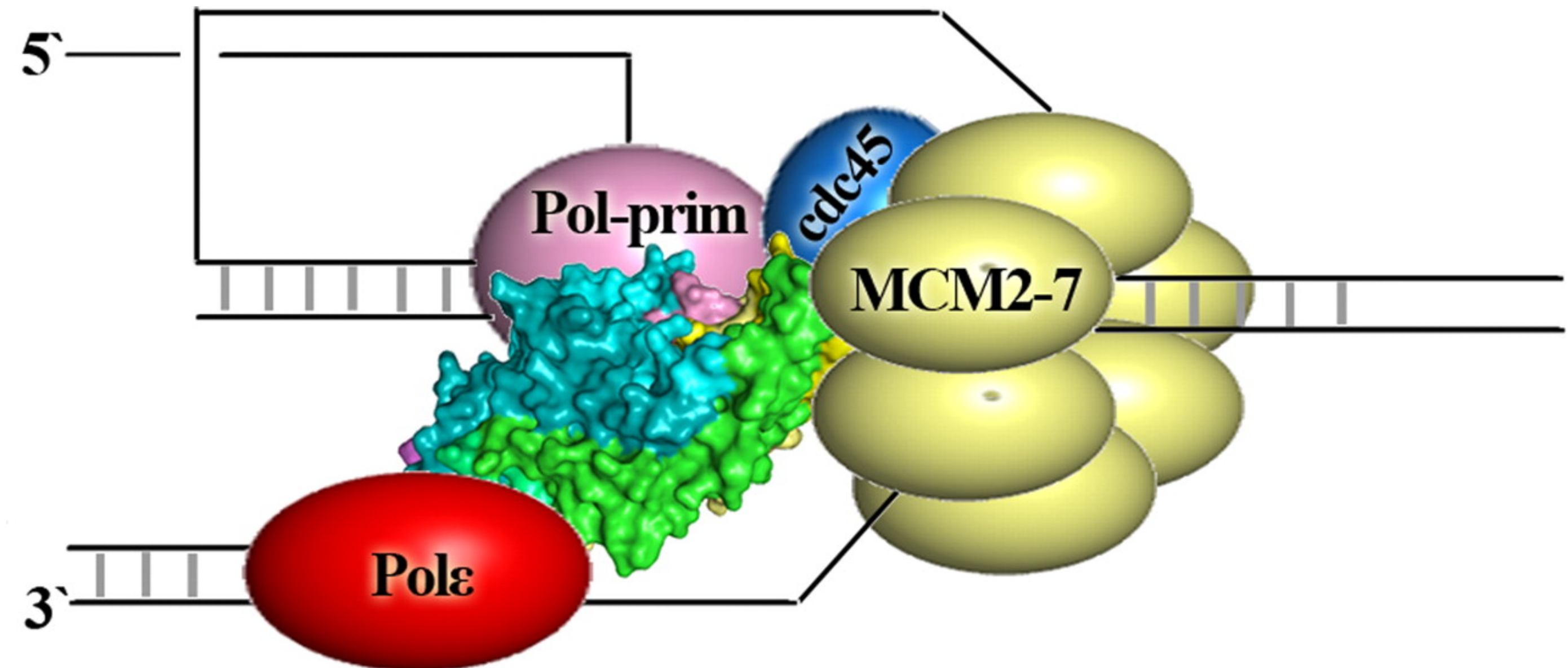
# PCNA

- Proliferating Cell Nuclear Antigen
- Komplex białkowy w formie pierścienia przesuwającego się po nici DNA w czasie replikacji
- Koordynuje różne etapy replikacji i syntezy DNA



# Inne kompleksy białkowe

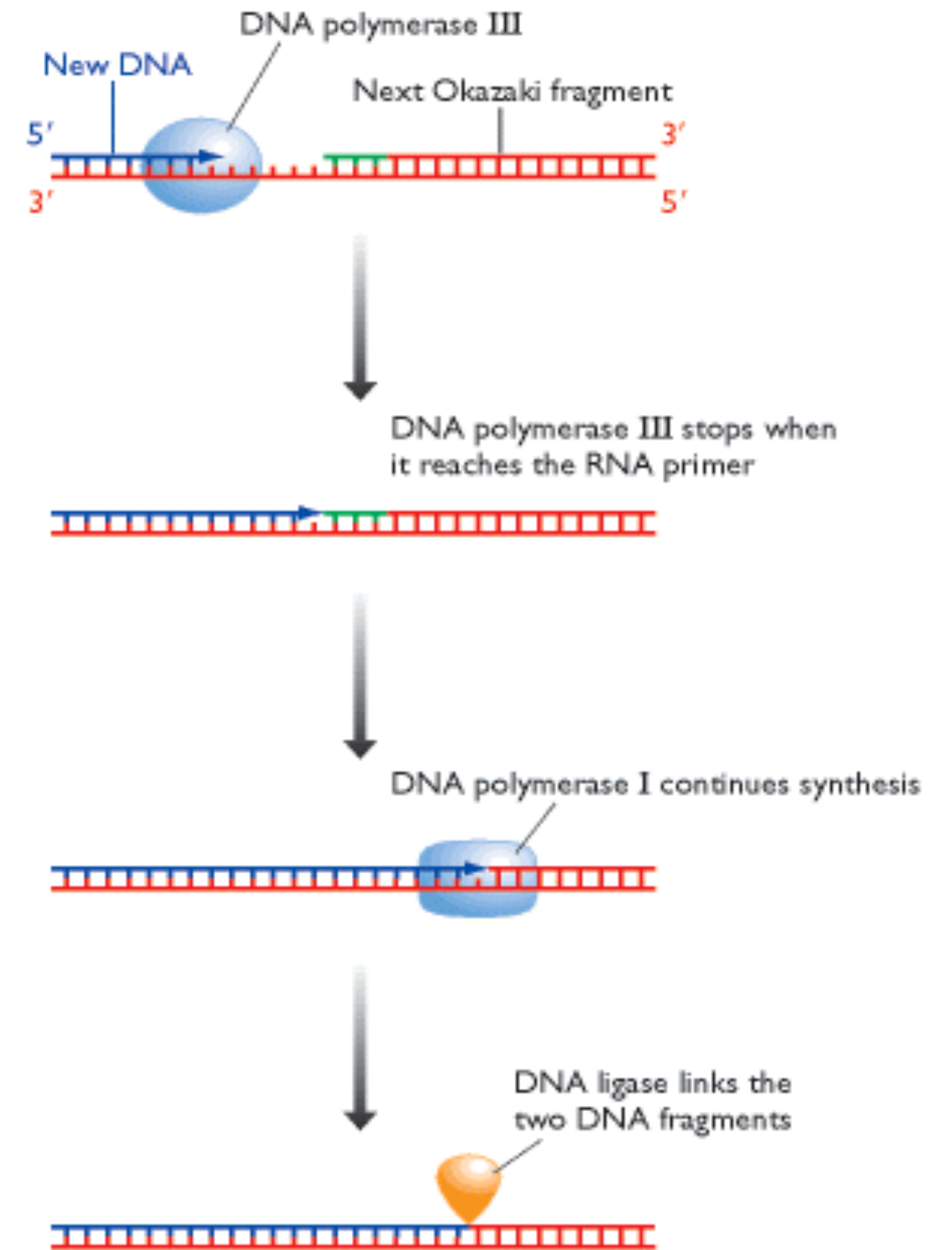
- MCM – Mini Chromosome Maintenance – pierścień przesuwający się razem z widełkami replikacyjnymi
- GINS – (Go, Ichi, Ni, San; 5,1,2,3) – kompleks współdziałający z MCM, przejście z fazy inicjacji do elongacji i utrzymanie elongacji





# Polimerazy bakteryjne

- PolIII (*PolC*) – główny enzym replikacyjny, ma aktywność Exo 3'-5' (korekta błędów), synteza do 1000 nt/s
- PolIII nie ma aktywności Exo 5'-3'
- PolI (*PolA*) – ma dodatkowo aktywność Exo 5'-3', usuwa startery i dokończy syntezę, do 20 nt/s



Ligaza łączy zsyntetyzowane fragmenty (nie jest polimerazą)

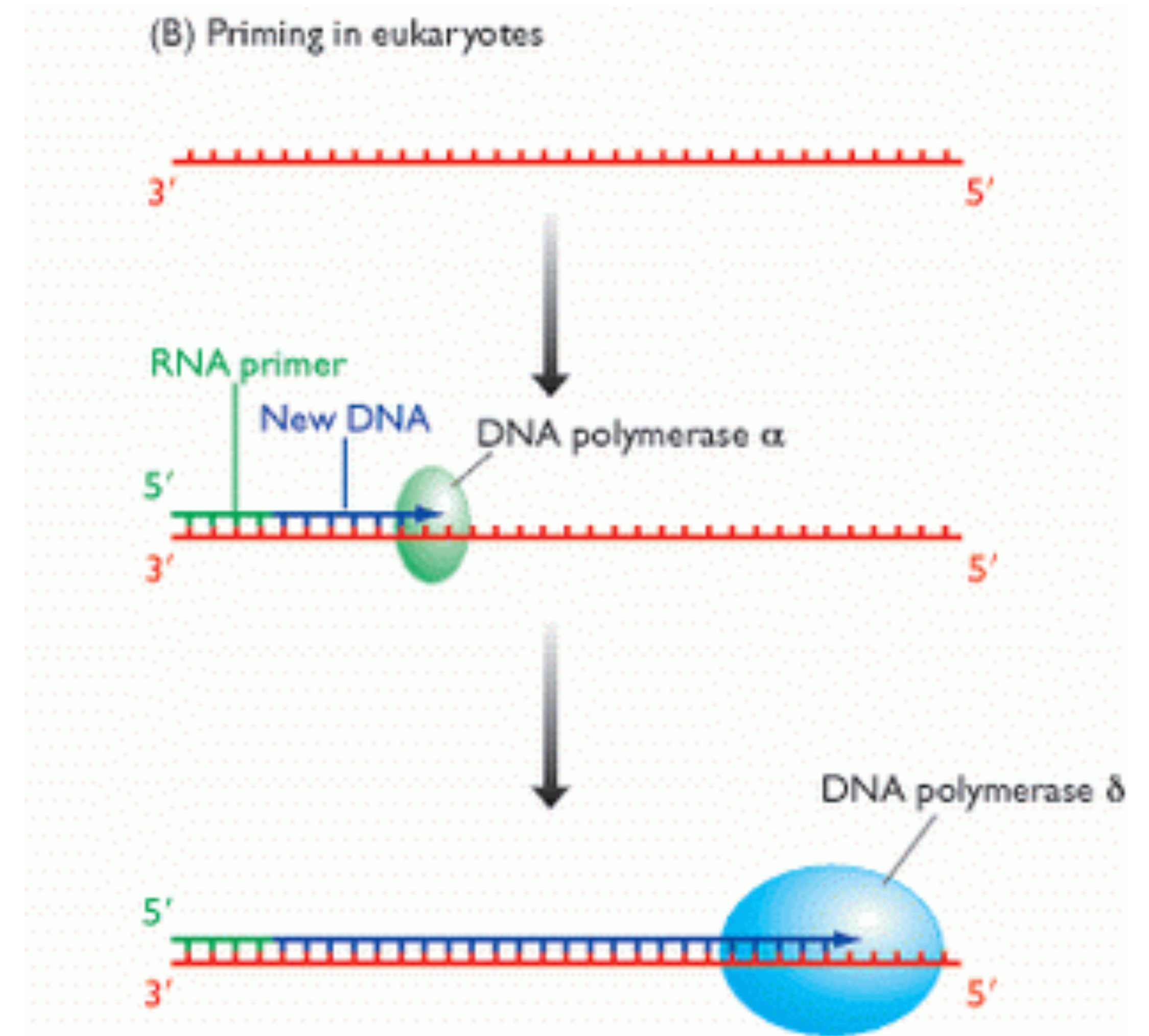
## Polimerazy bakteryjne c.d.

---

- PolIII (*PolB*) – naprawa uszkodzonego DNA w fazie stacjonarnej
- PolIV i polV – synteza DNA w fazie stacjonarnej (polIV) i przy znacznych uszkodzeniach genomu (polV)

# Polimerazy Eukaryota

- Pol  $\alpha$  – prymaza, wydłuża startery
- Pol  $\beta$  – naprawa DNA
- Pol  $\delta$  – główny enzym replikacyjny
- Pol  $\epsilon$  – replikacja, kontrola cyklu kom., naprawa DNA
- Pol  $\gamma$  – replikacja DNA w mitochondriach



Polimerazy eukariotyczne nie mają aktywności Exo 5'-3', startery RNA usuwają nukleazy FEN1, RnazaH i inne białka

# Dwie klasy polimeraz

---

- O dużej wierności – mało błędów, ale wrażliwe na uszkodzenia w matrycy
  - zatrzymują się w miejscu uszkodzenia
  - standardowe enzymy replikacyjne
- O niskiej wierności – więcej błędów, ale mniej wrażliwe na uszkodzenia matrycy
  - są w stanie kontynuować syntezę mimo uszkodzeń matrycy – **TLS (trans-lesion synthesis)**
  - mechanizm umożliwiający dokończenie replikacji uszkodzonego DNA (zapobiega rearanżacjom genomu)

# Uszkodzenia DNA i replikacja

---

- Obecność uszkodzeń w DNA hamuje inicjację replikacji
- Jeżeli w trakcie replikacji napotykanne są uszkodzenia w DNA to uruchamiane są polimerazy TLS
  - replikacja z błędami jest mniej ryzykowna, niż replikacja niedokończona
- Przy dużych uszkodzeniach DNA, przekraczających możliwości naprawy
  - u bakterii - uruchomienie systemu SOS (replikacja za wszelką cenę)
  - u wielokomórkowych Eukaryota - zatrzymanie cyklu (G0), apoptoza

# System SOS u bakterii

- Przy rozegłych uszkodzeniach matrycy (miejsca AP, fotoprodukty, uszkodzone zasady)
- Białko RecA pokrywa matrycę
- Polimeraza V z RecA tworzy mutasom
- Replikacja zachodzi, ale generuje wiele błędów

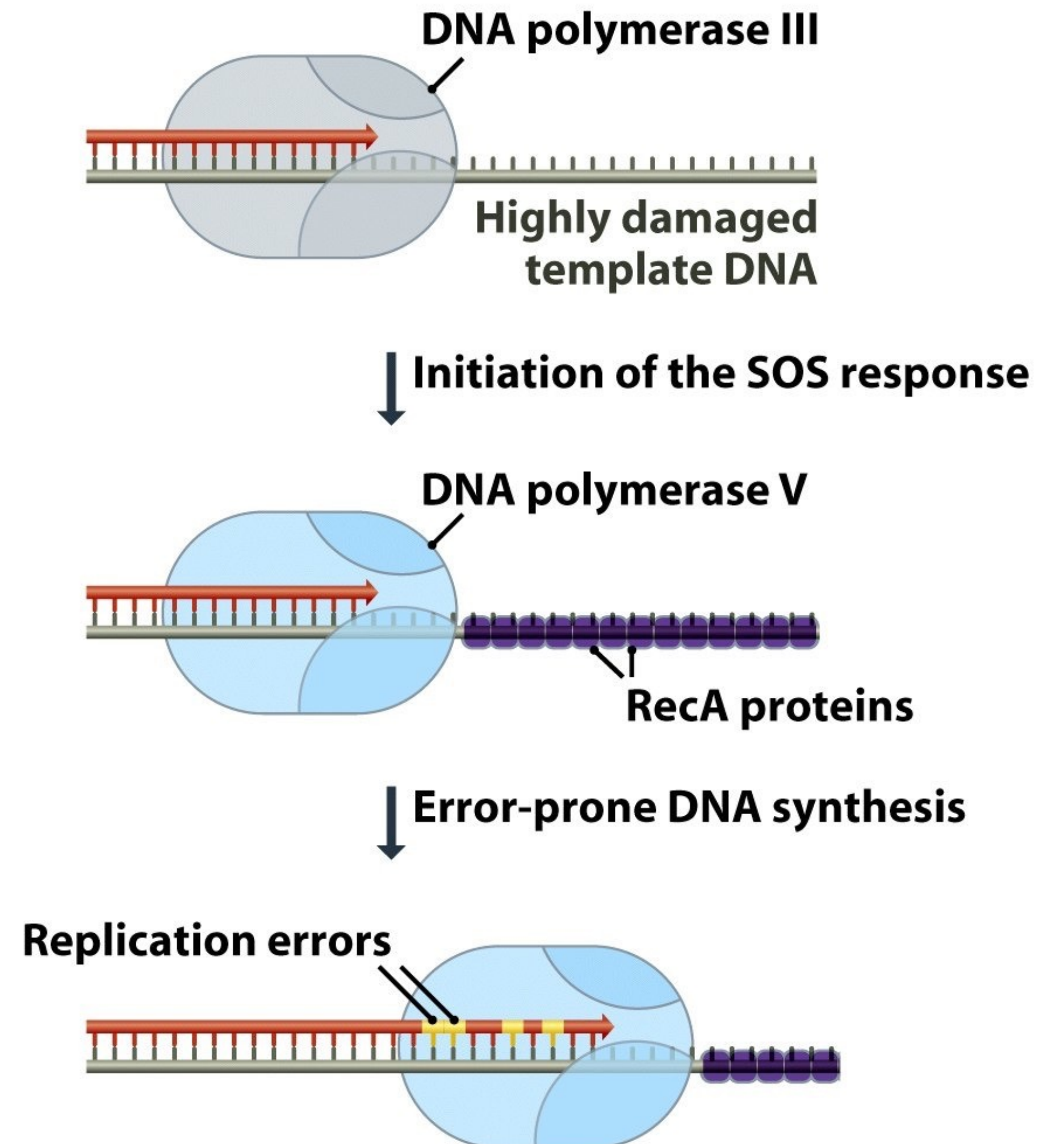
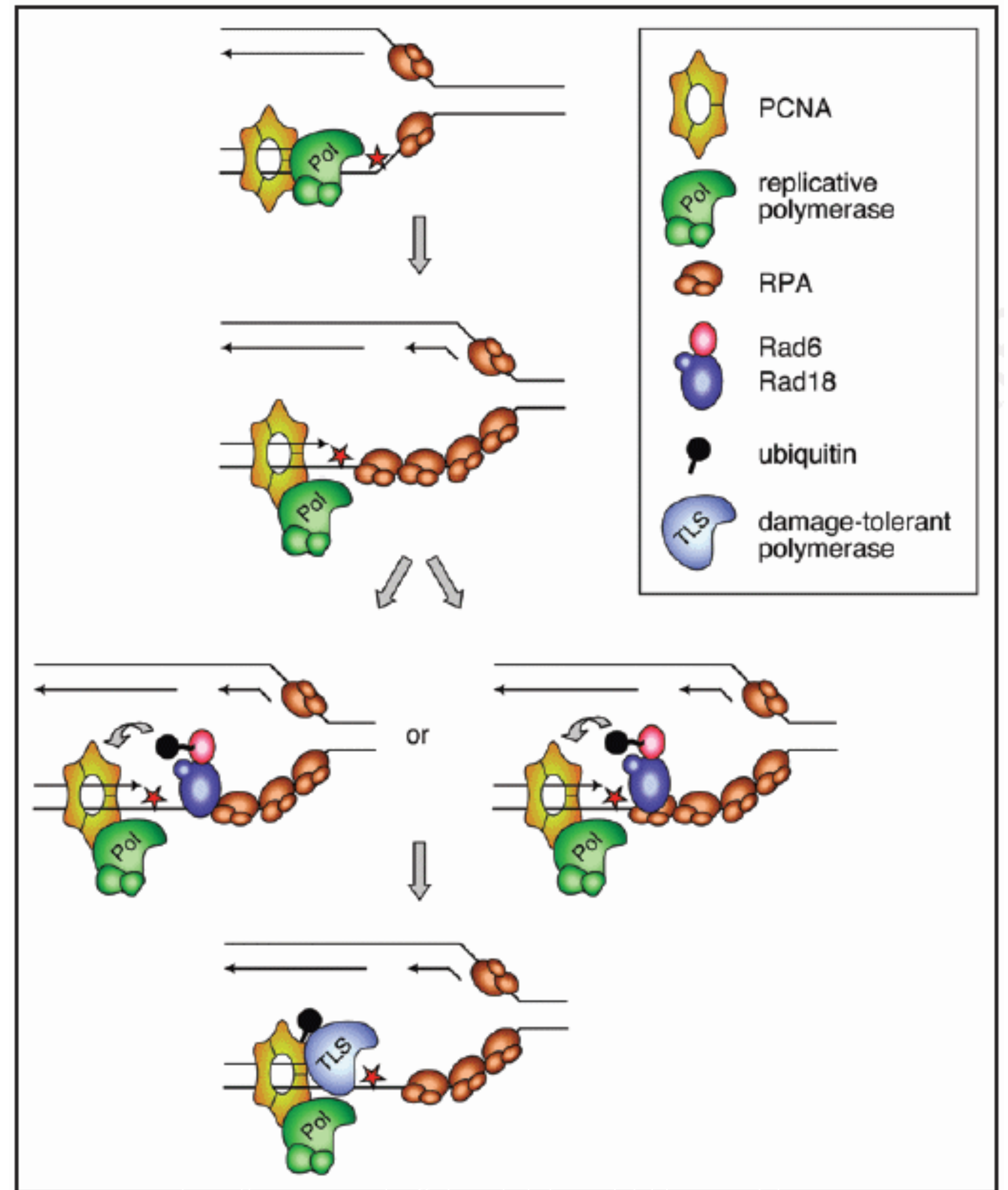


Figure 16-29 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

# Rola PCNA

- Ubikwitynacja i deubikwitynacja PCNA przełącza między replikacją TLS i wierną



## Trochę zamieszania

---

- Synteza DNA rozpoczyna się zawsze od startera RNA?
- Replikacja DNA rozpoczyna się od miejsca *ori*?



# Synteza DNA rozpoczyna się zawsze od startera RNA?

---

- Odkryty w 2013 enzym PrimPol, aktywny w mitochondriach ssaków
- Jest polimerazą DNA typu TLS
- Jest w stanie zainicjować syntezę DNA od startera z DNA!!

Molecular Cell  
**Article**

## PrimPol, an Archaic Primase/Polymerase Operating in Human Cells

Sara García-Gómez,<sup>1</sup> Aurelio Reyes,<sup>2</sup> María I. Martínez-Jiménez,<sup>1</sup> E. Sandra Chocrón,<sup>1</sup> Silvana Mourón,<sup>3</sup> Gloria Terrados,<sup>1,7</sup> Christopher Powell,<sup>2</sup> Eduardo Salido,<sup>5</sup> Juan Méndez,<sup>3,6</sup> Ian J. Holt,<sup>4,6</sup> and Luis Blanco<sup>1,6,\*</sup>

<sup>1</sup>Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC-UAM, 28049 Madrid, Spain

<sup>2</sup>MRC Mitochondrial Biology Unit, Wellcome Trust/MRC Building, Cambridge CB2 0XY, UK

<sup>3</sup>Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), 28029 Madrid, Spain

<sup>4</sup>MRC National Institute for Medical Research, Mill Hill, London NW71AA, UK

<sup>5</sup>Hospital Universitario de Canarias, Universidad de la Laguna, 38320 Tenerife, Spain

<sup>6</sup>These authors are co-senior authors

<sup>7</sup>Present address: Institute of Molecular Biology and Tumor Research (IMT), Philipps-Universität Marburg, 35032 Marburg, Germany

\*Correspondence: [lblanco@cbm.uam.es](mailto:lblanco@cbm.uam.es)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2013.09.025>

# Replikacja DNA rozpoczyna się od miejsca *ori*?

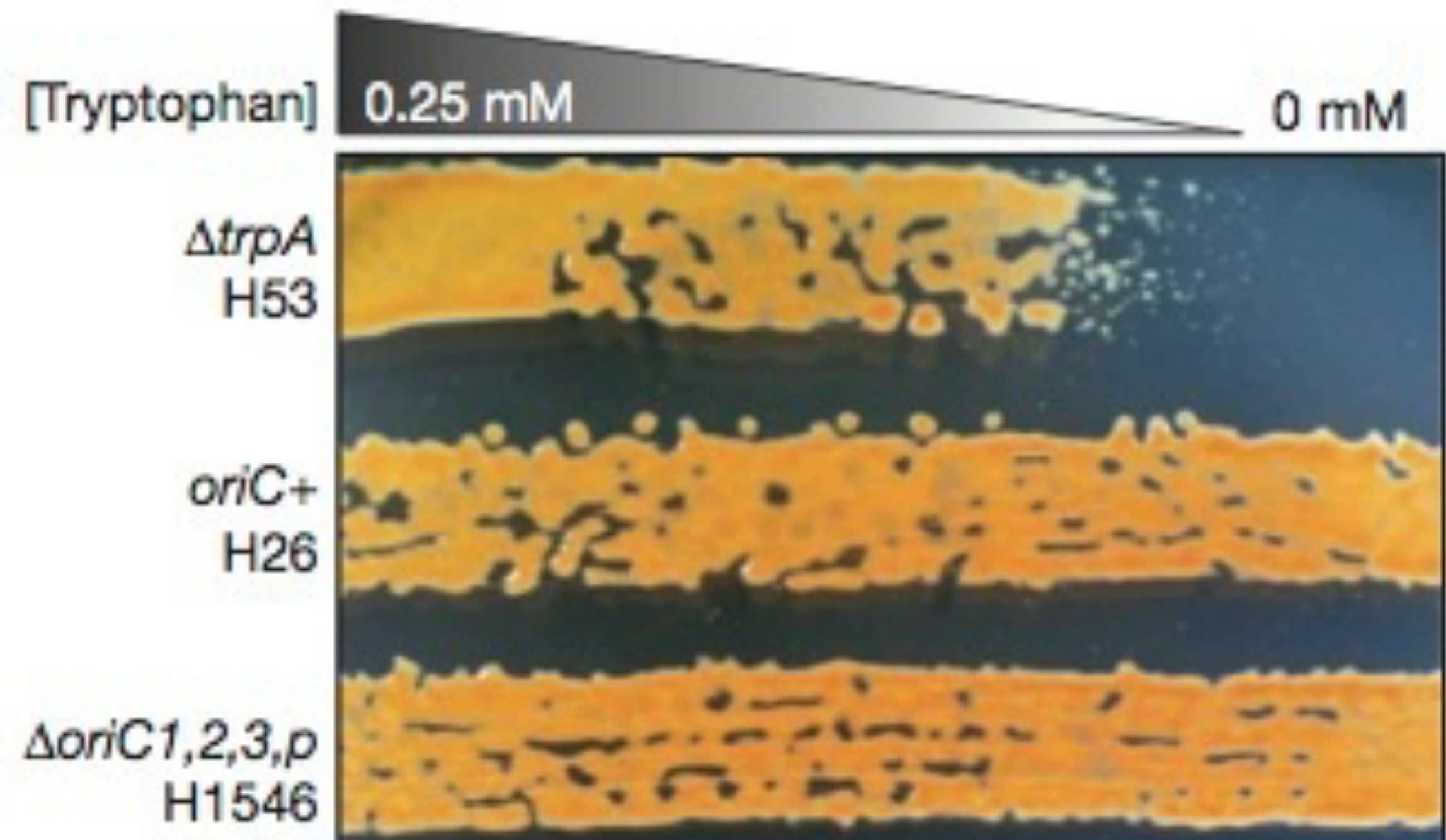
- Szczep *Haloferax volcanii* (Archaea) pozbawiony wszystkich miejsc *ori*
- Rośnie nawet szybciej od dzikiego
- Inicjacja replikacji przez rekombinację

## LETTER

doi:10.1038/nature12650

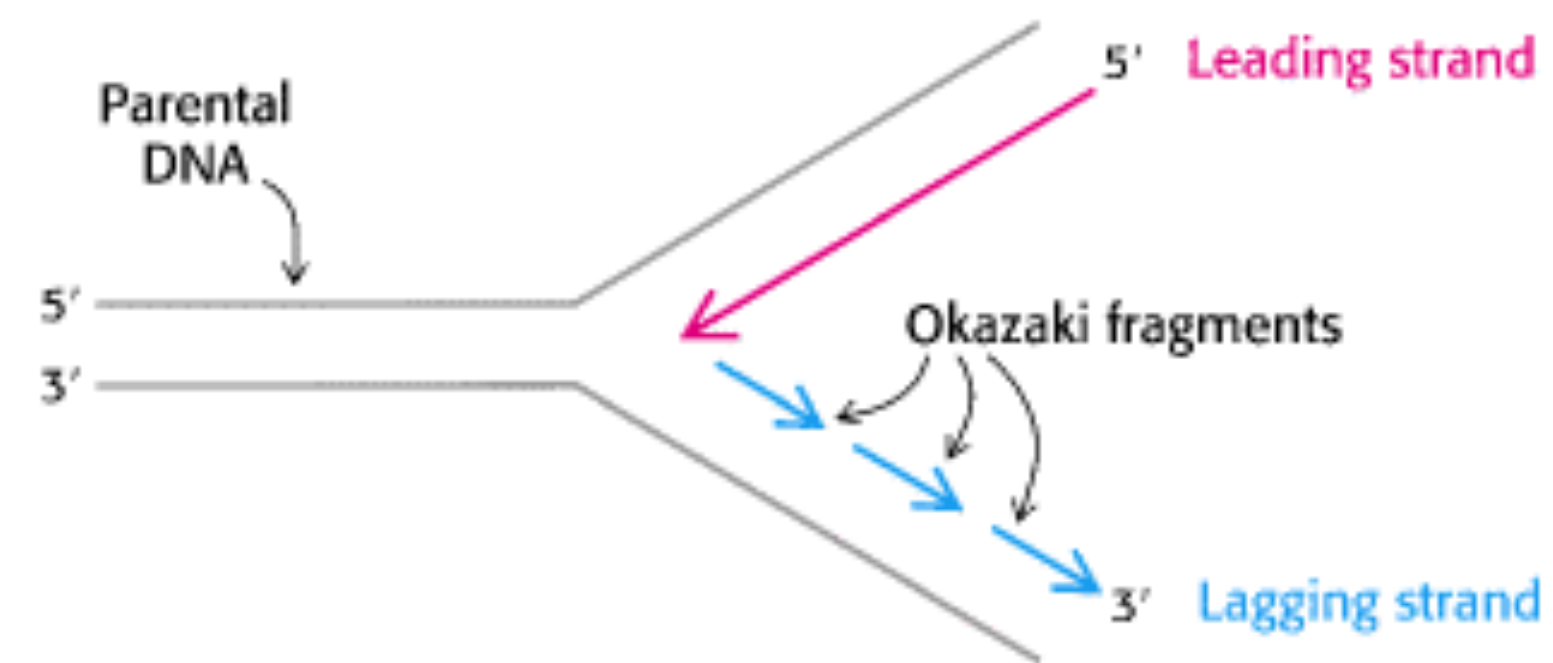
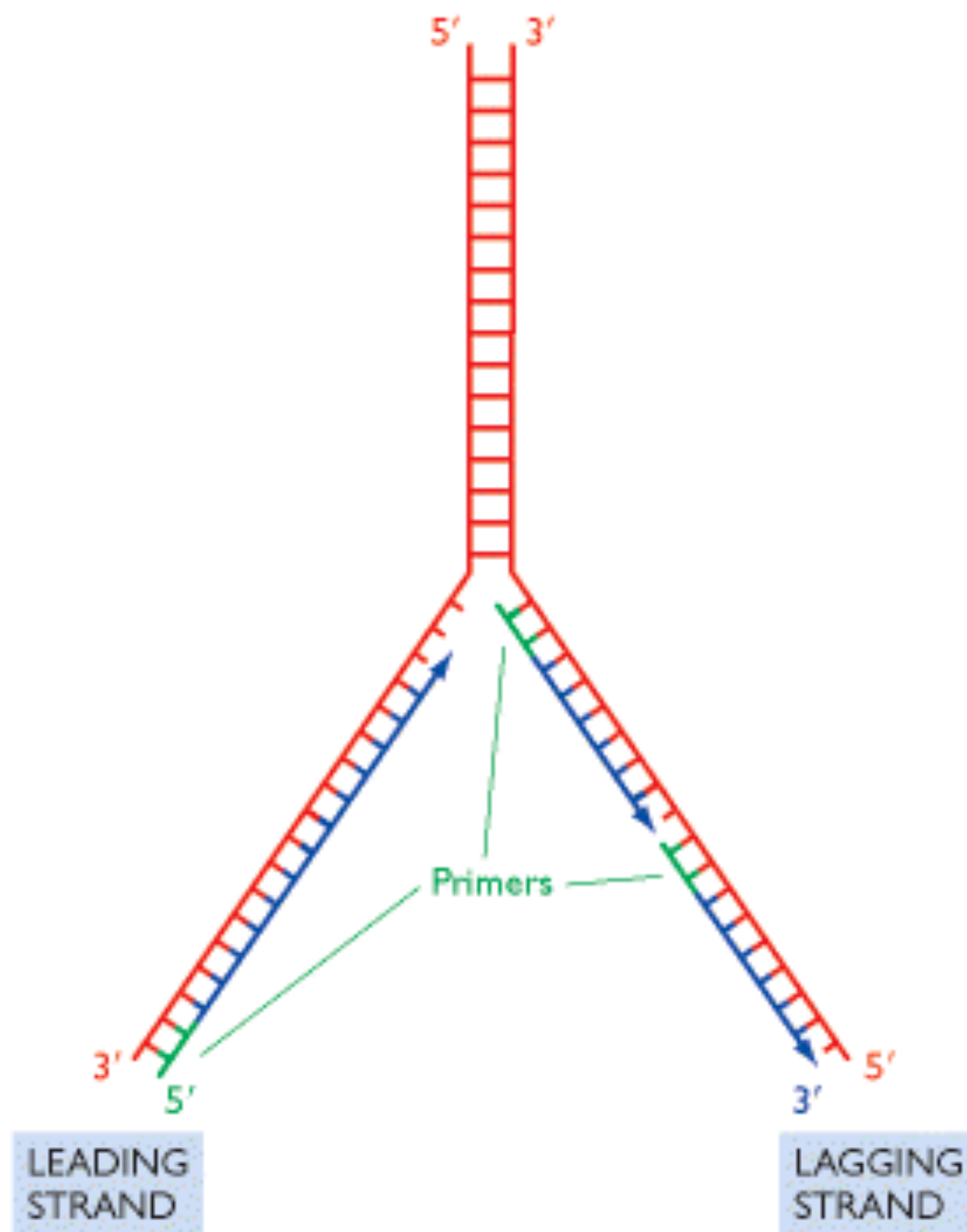
### Accelerated growth in the absence of DNA replication origins

Michelle Hawkins<sup>1\*</sup>, Sunir Malla<sup>2</sup>, Martin J. Blythe<sup>2</sup>, Conrad A. Nieduszynski<sup>1\*</sup> & Thorsten Allers<sup>1\*</sup>



# Problem nici nieciągłej

Na nici nieciągłej trzeba co pewien odcinek ponawiać syntezę startera – fragmenty Okazaki



# Problem zakończenia replikacji DNA liniowego

- Na końcu cząsteczki nie ma skąd zacząć nowego fragmentu Okazaki na nici opóźnionej
- Cząsteczka potomna będzie skrócona

## The final Okazaki fragment cannot be primed

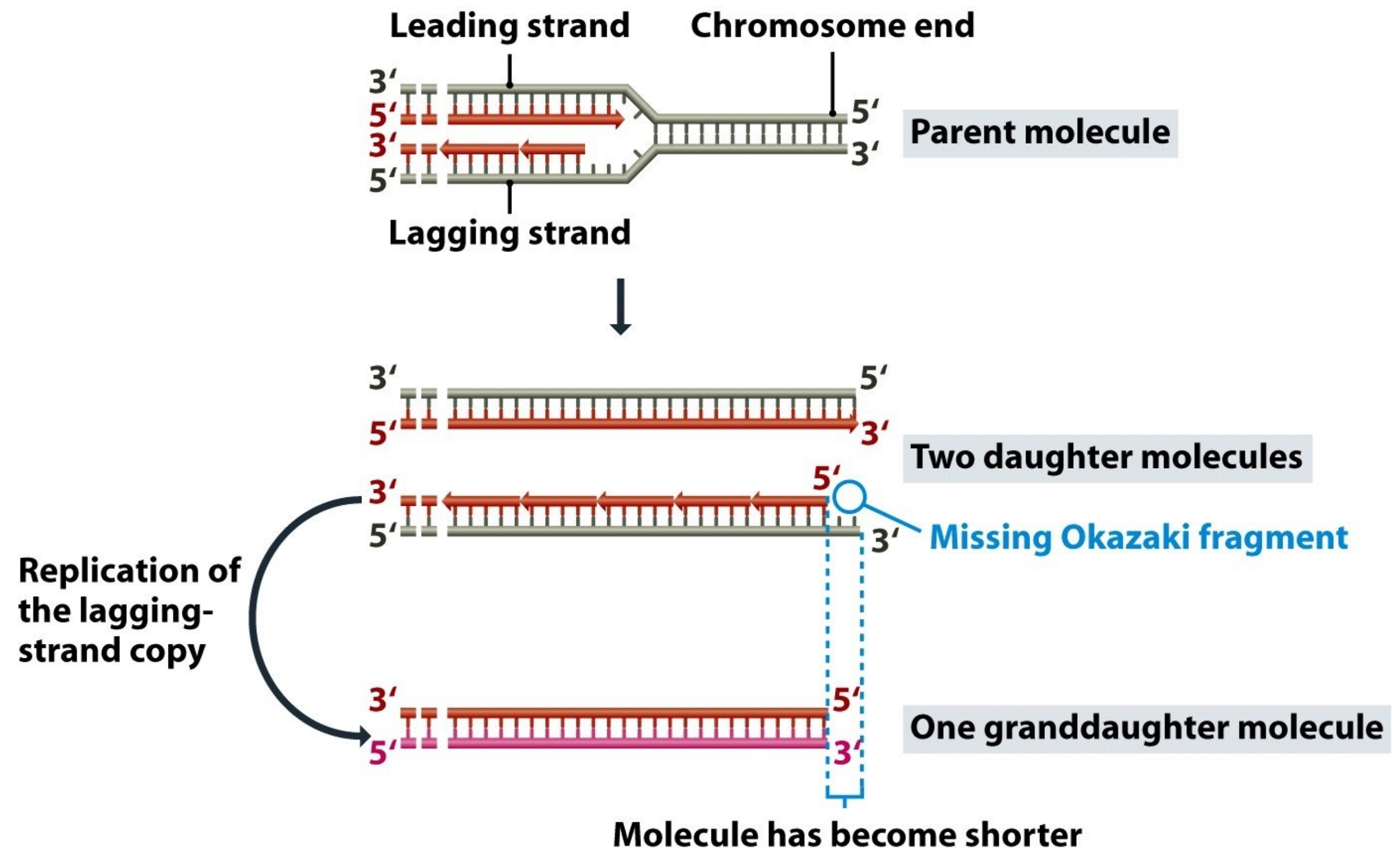
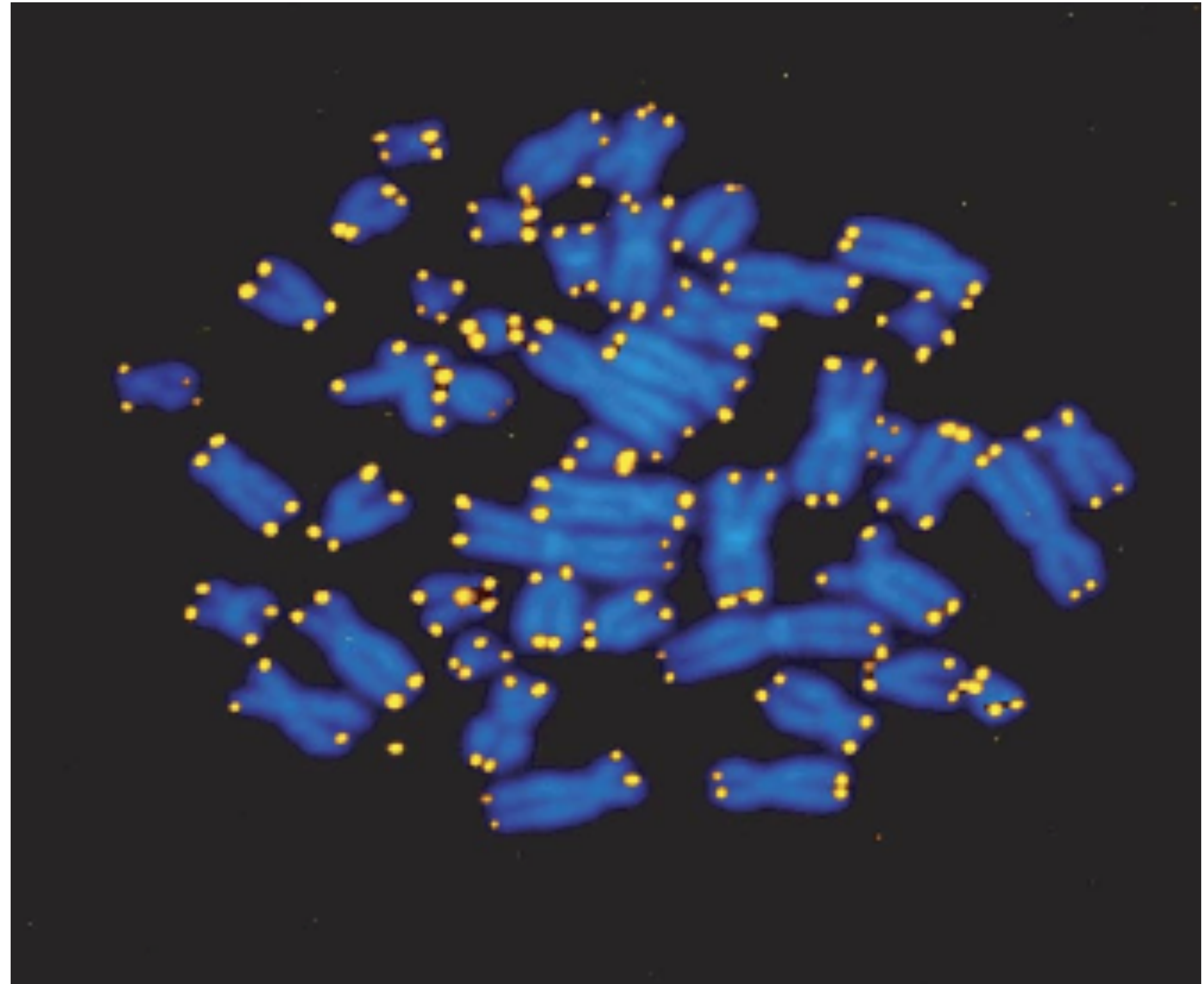


Figure 15-24a Genomes 3 (© Garland Science 2007)

# Telomery

---

- Końce chromosomów
- Sekwencje powtórzone (TTAGGG)
- Skracają się przy każdym podziale komórki
- W niektórych komórkach mogą jednak być odtwarzane



# Telomery i telomeraza

- Telomeraza może wydłużać telomery wykorzystując fragment RNA
- Skracanie telomerów ogranicza liczbę podziałów niektórych komórek
- Aktywacja telomerazy związana jest z uniesmiertelnianiem komórek nowotworowych

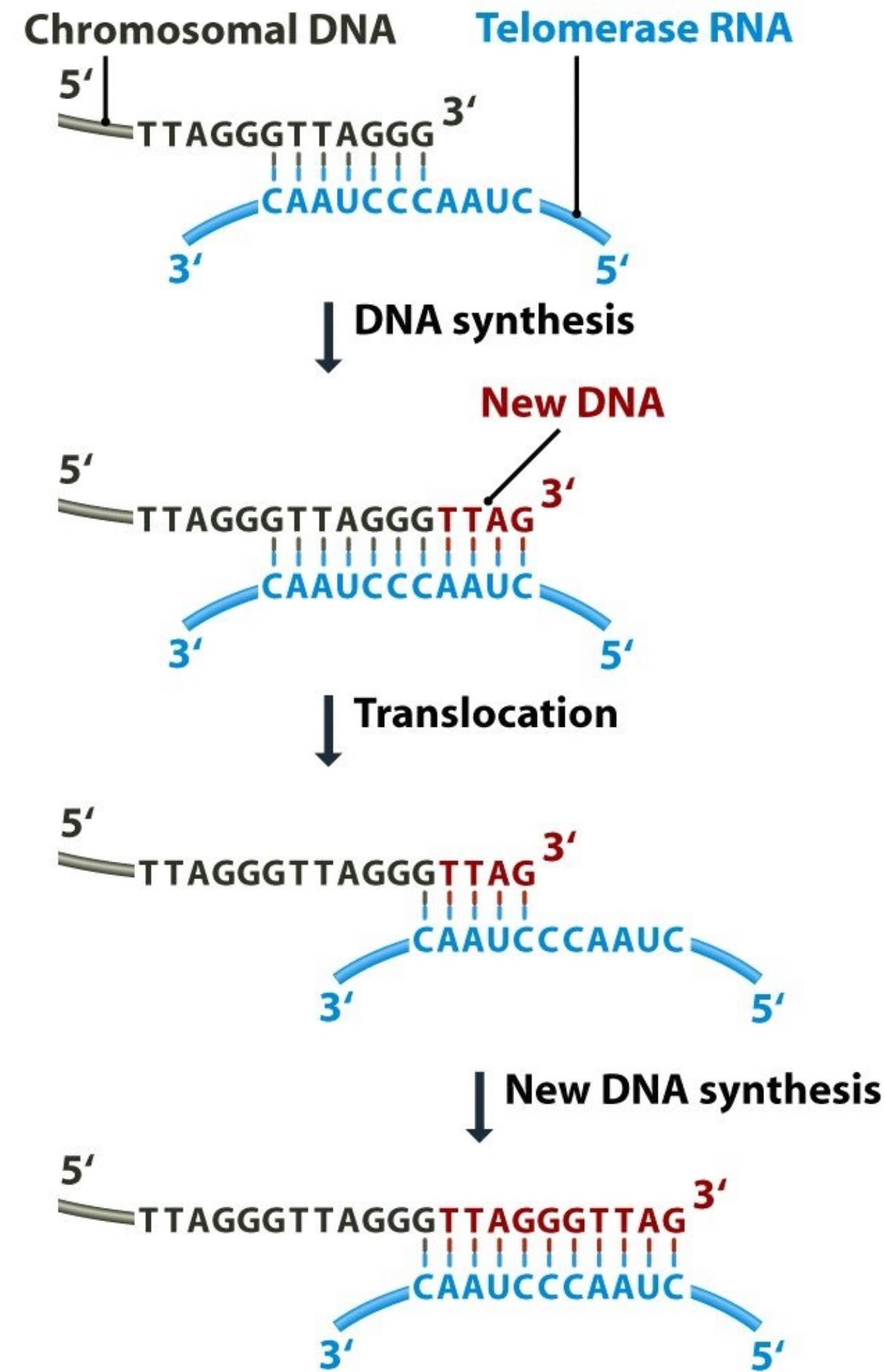


Figure 15-25 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

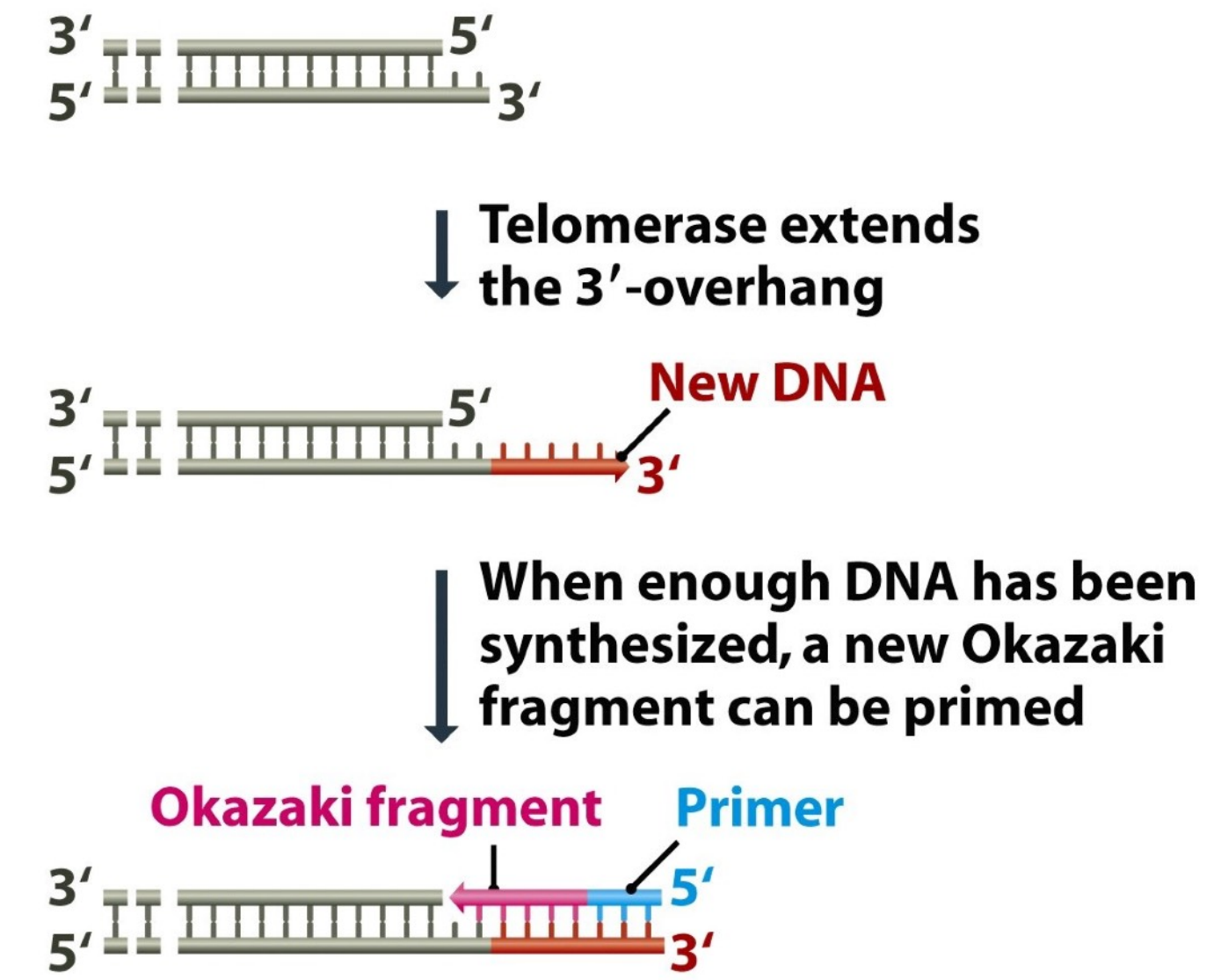
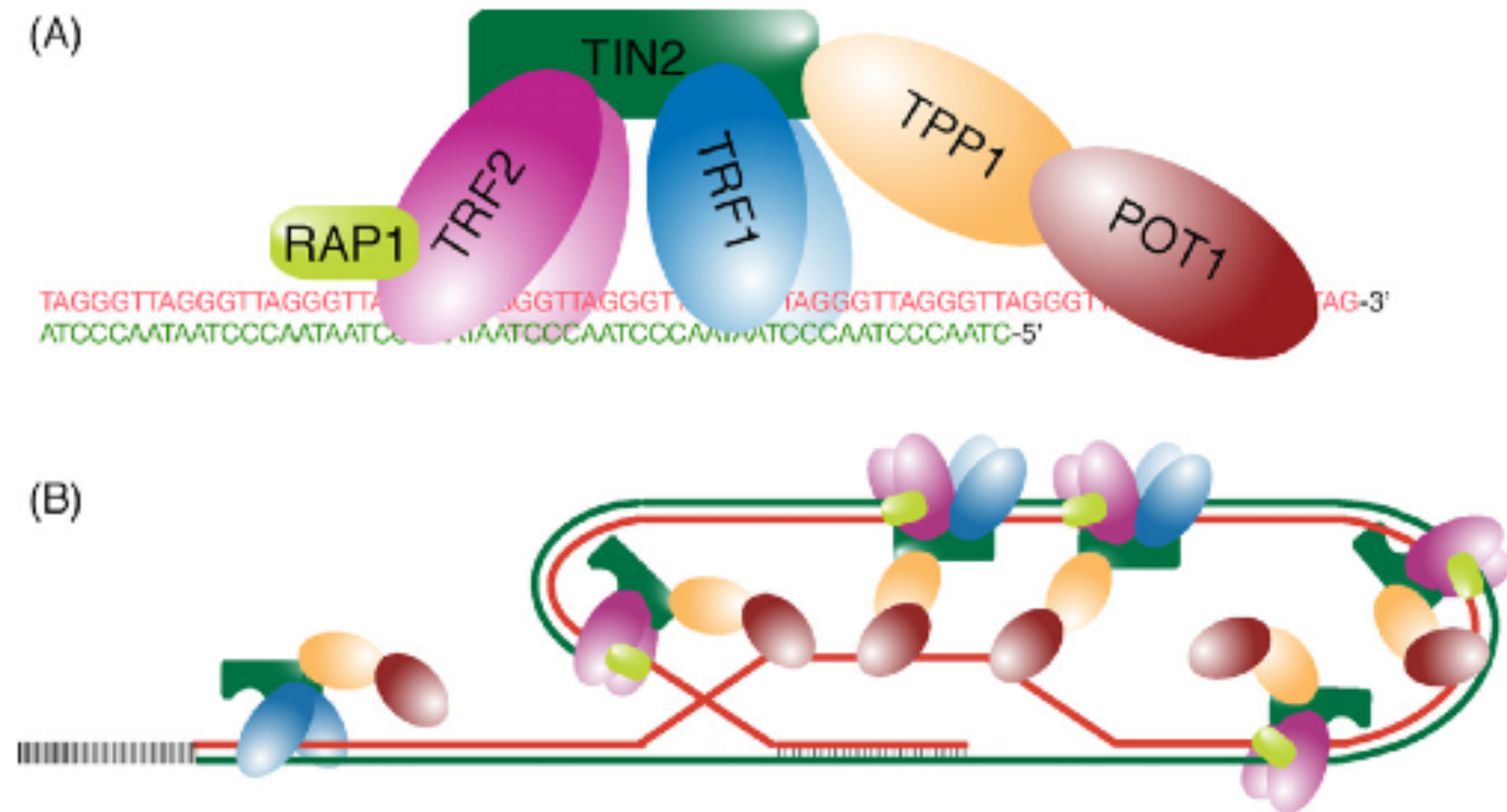


Figure 15-26 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

# Kompleks chroniący końce chromosomów

- Shelterin (ang. shelter = schronienie)
- Pozbawienie telomerów białek indukuje odpowiedź naprawy uszkodzeń DNA
- chromosom bez telomeru nieodróżnialny od chromosomu pękniętego



# Telomery a starzenie

---

- Komórki somatyczne mają ograniczoną liczbę możliwych podziałów – granica Hayflicka
- Komórki linii płciowej (i macierzyste) dzielą się bez ograniczeń
- Granica Hayflicka związana jest ze skracaniem się telomerów
  - Aktywacja telomerazy wystarcza do unieśmiertelnienia i umożliwienia nieograniczonych podziałów



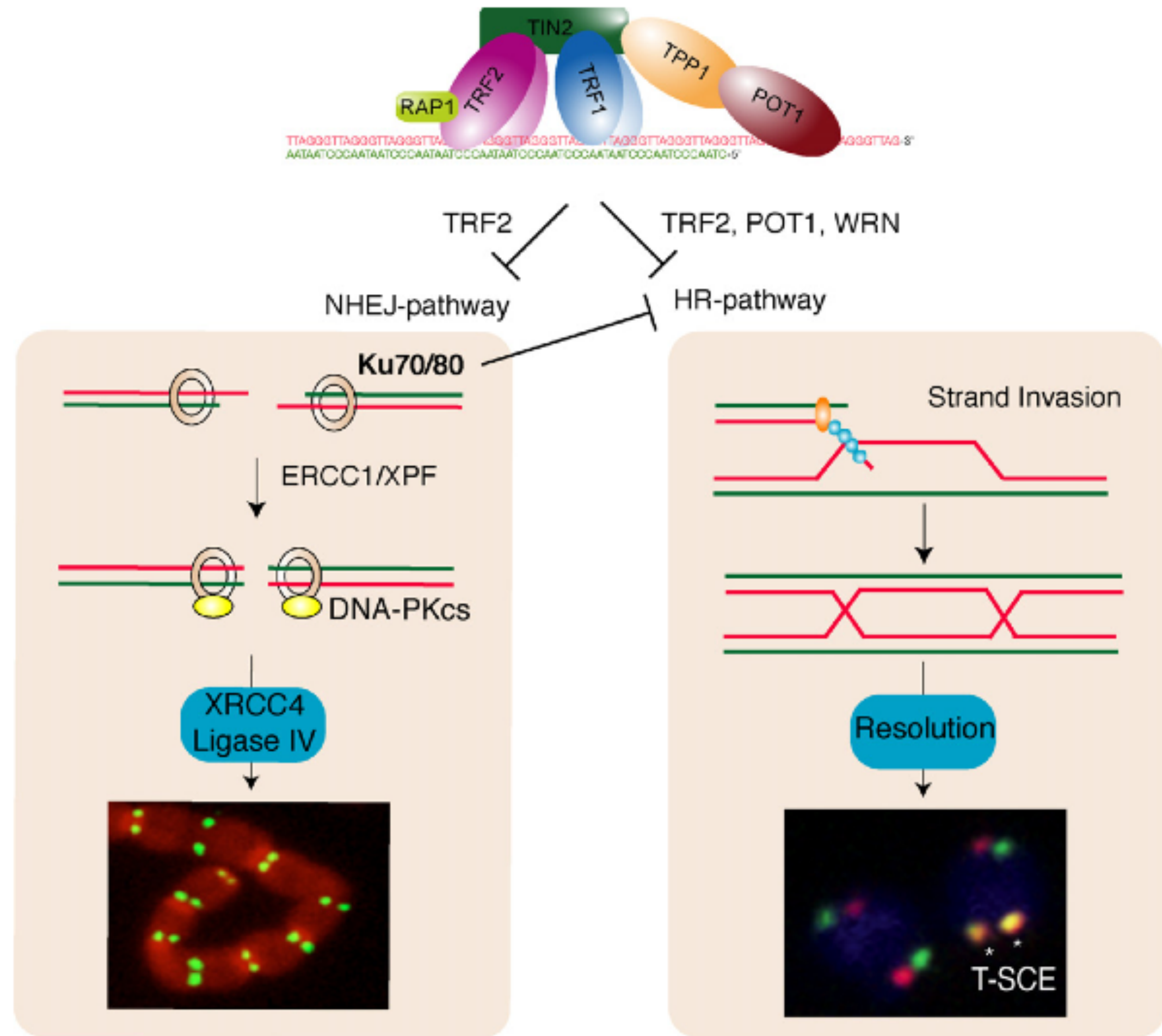
# Los komórki, która utraciła telomery

---

- Aktywacja szlaków odpowiedzi na uszkodzenia DNA
- Sygnał uszkodzeń genomowych – zastopowanie cyklu komórkowego (tzw. kryzys replikacyjny)
- Ograniczenie zdolności podziałowej jest ważnym mechanizmem ochronnym
  - Zapobieganie nowotworom
  - Utrzymywanie zróżnicowania klonalnego populacji komórek macierzystych

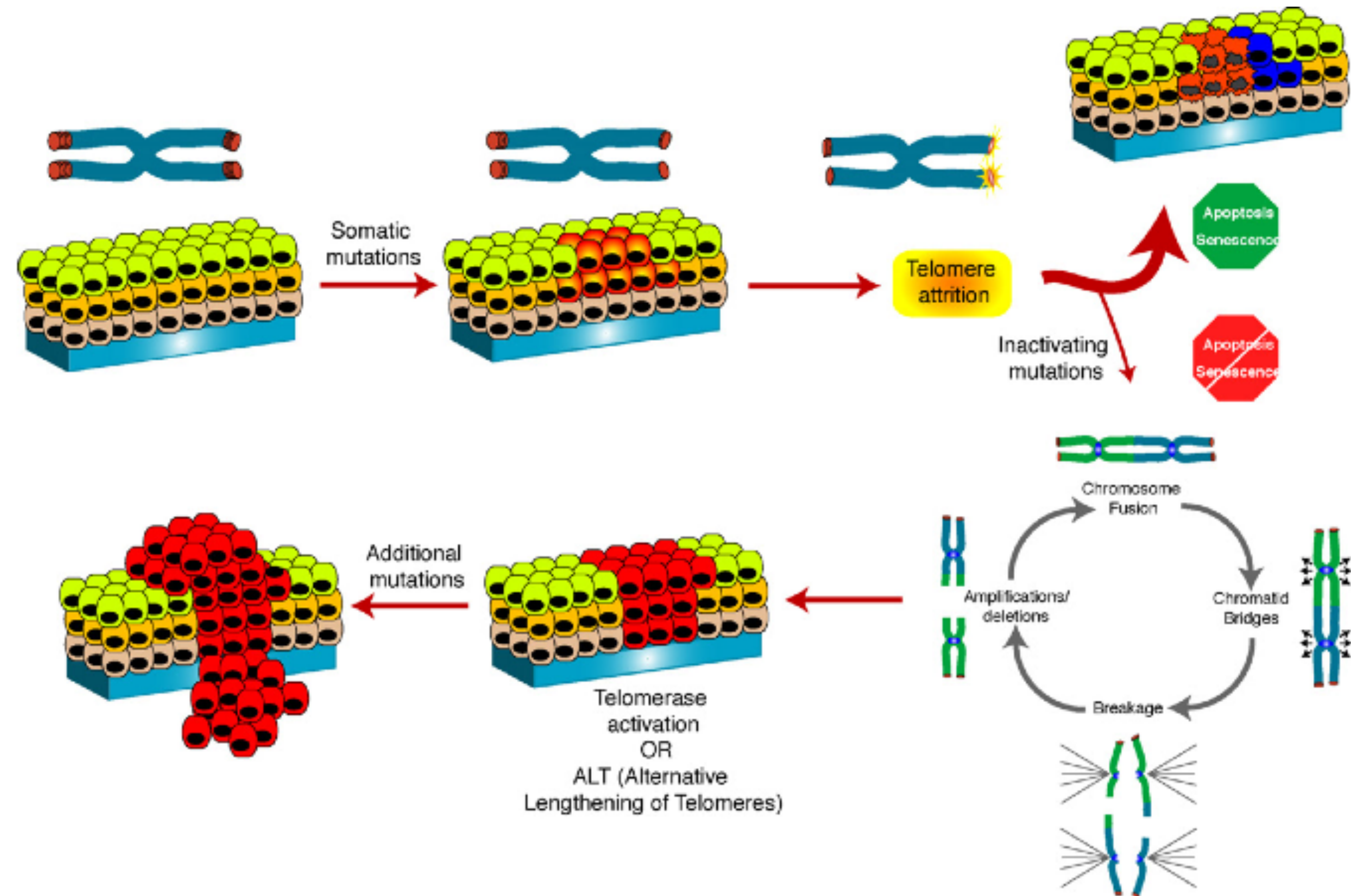
# Telomery a odpowiedź na uszkodzenia DNA

- Kompleks shelterin hamuje odpowiedź na pęknięcia DNA
- Chromosomy bez telomerów stają się substratami dla szlaków naprawy pęknięć dwuniciowych (DSBR)
- Prowadzi to do rearanżacji genomu



# Telomery a nowotwory

- W komórkach z defektywnym szlakiem odpowiedzi na uszkodzenia DNA (np. defekty p53) komórki ze skróconymi (lub uszkodzonymi) telomerami wciąż się dzielą
- Efektem są rearanżacje chromosomów (fuzje, translokacje)
- W komórkach nowotworowych ponowna aktywacja telomerazy



# Dwa oblicza telomerów

---

- Telomery chronią przed uszkodzeniami DNA i zaburzeniami chromosomów, które mogą prowadzić do nowotworzenia, ale...
- Aktywność telomerazy unieśmiertelnia komórki (aktywna w 90% nowotworów)

# Telomery a starzenie

- U drożdży defekt telomerazy – ustanie podziałów po kilku pokoleniach
- U roślin, bezkręgowców i myszy – podobnie (defekt po kilku pokoleniach)
- U człowieka – nawet częściowa utrata telomerazy (heterozygota) powoduje poważne defekty:
  - niedokrwistość
  - defekty układu odpornościowego
  - zwłóknienie płuc

## Telomerase complex

### hTERT mutations:

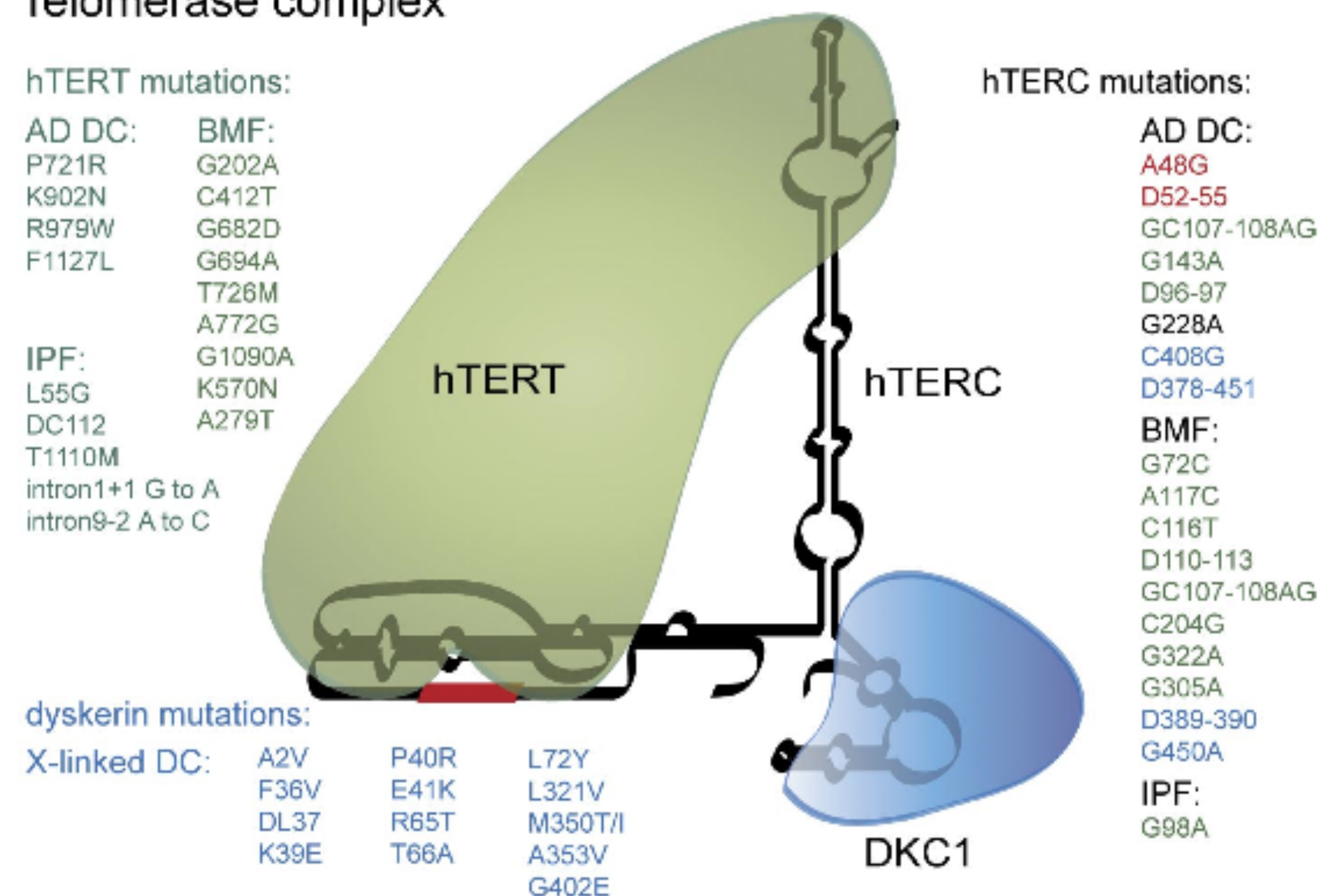
AD DC:	BMF:
P721R	G202A
K902N	C412T
R979W	G682D
F1127L	G694A
	T726M
	A772G
IPF:	G1090A
L55G	K570N
DC112	A279T
T1110M	
intron1+1 G to A	
intron9-2 A to C	

### dyskerin mutations:

X-linked DC:	A2V	P40R	L72Y
	F36V	E41K	L321V
	DL37	R65T	M350T/I
	K39E	T66A	A353V
			G402E

### hTERC mutations:

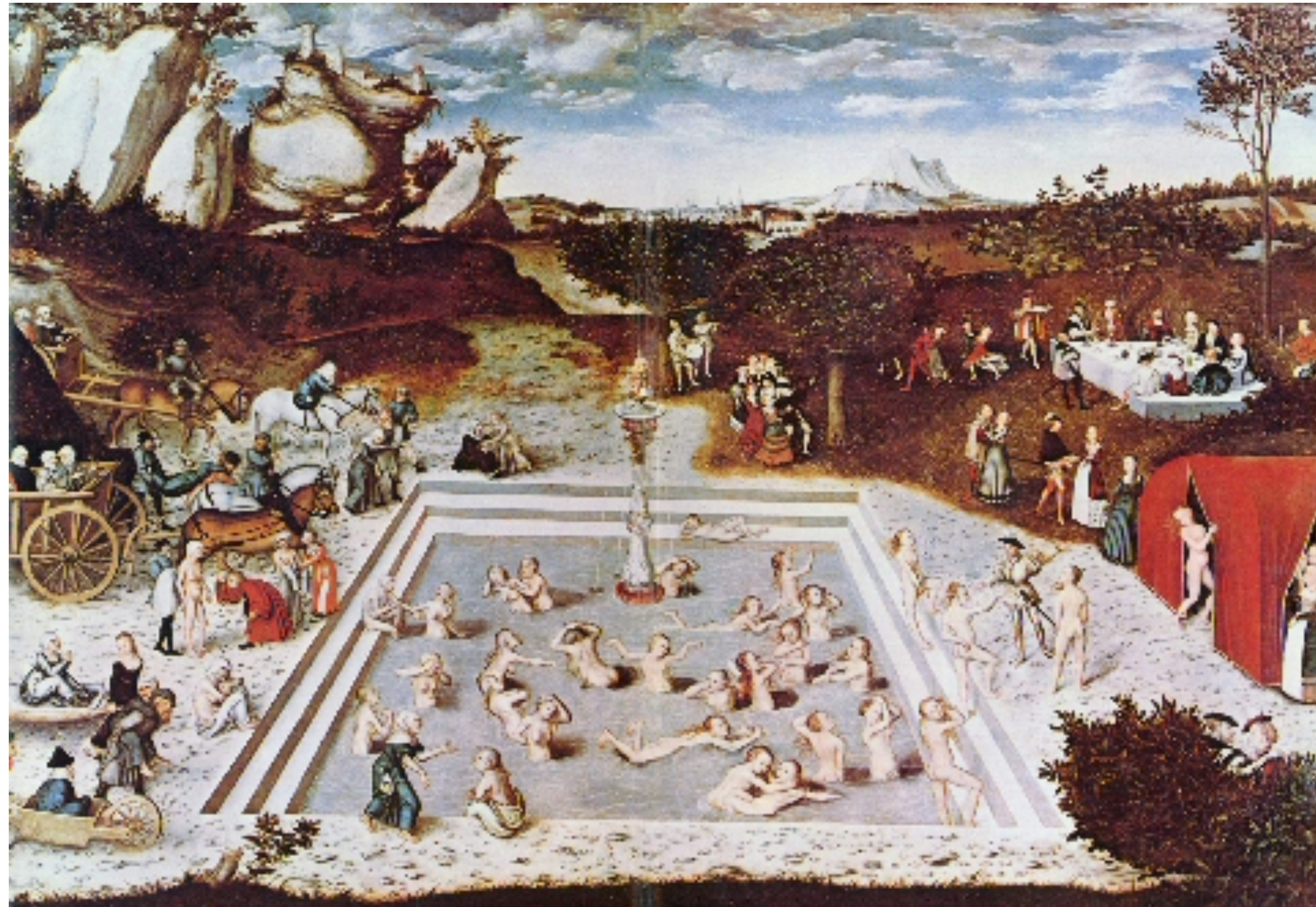
AD DC:
A48G
D52-55
GC107-108AG
G143A
D96-97
G228A
C408G
D378-451
BMF:
G72C
A117C
C116T
D110-113
GC107-108AG
C204G
G322A
G305A
D389-390
G450A
IPF:
G98A



# Co nam może dać telomeraza

---

- Wieczna młodość??
- Leki przeciwnowotworowe?



# Wieczna młodość?

---

- Starzenie się komórek somatycznych, nie dzielących się (np. układ nerwowy) – nie zależy od telomerów
- Telomery odgrywają rolę w starzeniu się komórek macierzystych i komórek układu odpornościowego
- Skracanie telomerów jest ważnym mechanizmem przeciwnowotworowym
- Systemy podtrzymujące stabilność DNA komórek somatycznych nie są lepsze, niż jest to absolutnie niezbędne (teoria “*disposable soma*”)

# “Magiczna” telomeraza



So now you know why RENEUE™ is such a paradigm-shifting product. It delivers the exact enzymes that degrade past your 25th birthday. It's just like bringing a dying plant back to life with just some water and fertilizer. **RENEUE™ is the "water and fertilizer that your cells need to flourish."**

## "But is it easy to use?"

**Yes! RENEUE™ is available as a 30-milliliter (30cc), single-dose liquid.** This single vial of RENEUE™ represents a **"full-body cellular reset"** for a full-grown adult. RENEUE™ is taken orally every 6 months. You can drink the product right from the bottle, or mix it into your favorite beverage. **It doesn't get easier than that!**

(RENEUE™ is sold as a dietary supplement only, and is not sold to treat, prevent, diagnose, or cure any diseases or illnesses. Please consult a physician before taking this or any dietary supplement. If you are pregnant or nursing you should be aware that RENEUE™ contains grain alcohol to extend shelf life--equivalent to drinking 1 shot of 80-proof alcohol. )

JAN  
MARINI  
SKIN RESEARCH®

[Where To Buy](#) : [About Jan Marini](#) : [Skin Care Management System](#) : [Products](#) : [News](#) : [Testimonials](#) : [Contact Us](#)

AGE INTERVENTION®  
Regeneration Booster  
Reset Your Cells' Aging Clock!

- Overview •
- Face Cream •
- Face Serum •
- Hands •
- Eye Cream •
- Regeneration Booster •

The Science of Topical Telomerase Enzyme Therapy

A clock that regulates aging.

How your genes behave that your genetic lifespan is determined by telomerase. Telomerase de...

RéVive.  
RESEARCH. RENEWAL. RESULTS.™

## PEAU MAGNIFIQUE

### Peau Magnifique Resets Your Skin's Aging Clock...

Peau Magnifique. Big words for even bigger results in bio-engineered skincare. RéVive continues to push the envelope further from the scalpel to the test tube. Peau Magnifique resets your skin's "aging clock" by a minimum of five years. Telomerase converts resting adult stem cells to newly minted skin cells, i.e. recruits youth. The results are incredible and life changing.

What you will immediately notice is; Increased glow with a more robust appearance. A smoother, more even skin tone. Will reduce redness and inflammation.

Long-term you will have: Stimulated generation of new skin cells. Firmer skin with a 45% reduction in wrinkles. Increased long-term skin clarity.

**The Peau Magnifique will be presented in our limited edition luxury gift box.**

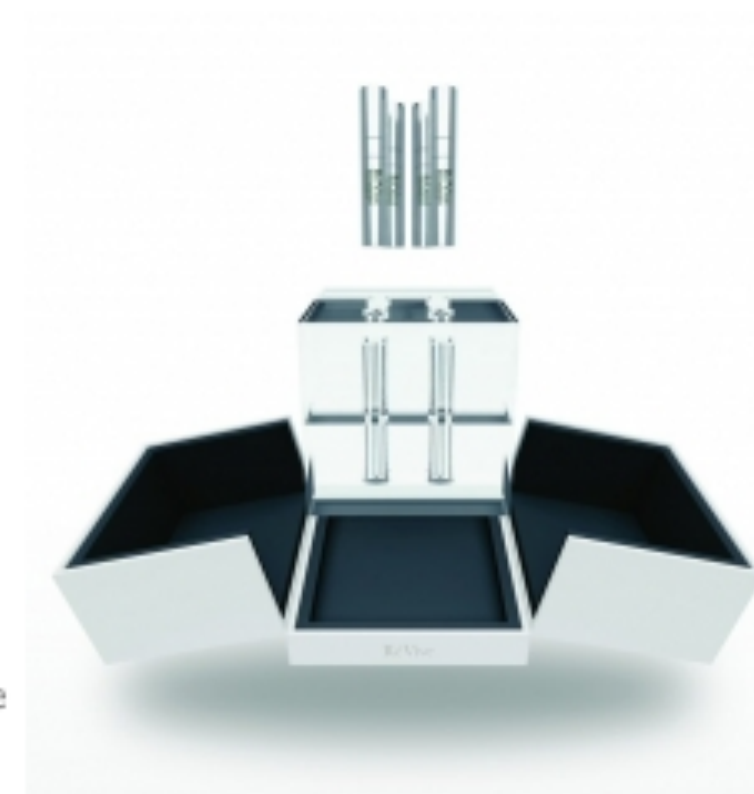
**Complimentary Revive Deluxe Travel Set with your order**

**9 Bonus Awards**

**Reference: RV-401-PM**

**£875.00**

**Exportable Info**  
Select Currency:





# “Magiczna moc telomerazy” c.d.

STRONA GŁÓWNA > KOSMETYKI > PRZECIWMARSZCZKOWA KURACJA Z TELOMERAMI W TLE

## Przeciwmarszczkowa kuracja z telomerami w tle

09-03-2010



zmien rozmiar tekstu **A<sup>+</sup>** **A<sup>-</sup>**

**Dr Irena Eris wprowadza na rynek nową linię kosmetyków dla dojrzałych kobiet. Seria Telomeric wykorzystuje mechanizmy działania telomerów w procesie redukcji zmarszczek i widocznego odmładzania skóry.**

Telomery - z greckiego telos „koniec” + meros „część” - to specyficzne czapeczki znajdujące się na końcach chromosomów, które chronią DNA przed uszkodzeniami. Bez nich chromosomy ulegałyby skracaniu przy każdym kolejnym podziale komórki. Wraz z każdym podziałem telomery ulegają skróceniu - są więc swoistym zegarem molekularnym odmierzającym, ile razy komórka może się podzielić. Gdy telomery ulegają skróceniu, komórki się starzeją.

Odkrycie mechanizmu działania telomerów zostało uhonorowane Nagrodą Nobla 2009 w dziedzinie fizjologii i medycyny. Badania nad telomerami przyczyniły się do bliższego poznania mechanizmów starzenia się organizmu, nowotworzenia, niektórych chorób dziedzicznych. Teraz odkrycie to znalazło także swoje zastosowanie w kosmetyce. Aktywny składnik kosmetyków z nowej linii - Telomeric, ma utrzymywać telomery w dobrym stanie, a przez to opóźnić wejście w fazę starzenia fibroblastów.



Seria TELOMERIC polecana jest kobietom po 60 roku życia. Według producenta kosmetyki zapewnią sprężyste, wyraziste kontury twarzy oraz jednolity kolor skóry, bez bruzd, rumienia, rozszerzonych porów i przebarwień.

OPRAC.: SENIOR.PL

Zastrzeżenia odpowiedzialności

POWIADOM ZNAJOMEGO DODAJ LINK WERSJA DO DRUKU KANAŁ RSS

# Terapie przeciwnowotworowe

---

- Telomeraza jest aktywna w >90% nowotworów
- Inhibitory telomerazy
  - chemiczne
  - siRNA
  - przeciwciała (szczepienia)



## The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2009

"for the discovery of how chromosomes are protected by telomeres and the enzyme telomerase"



Photo: Gerbil, Licensed by Attribution Share Alike 3.0

**Elizabeth H. Blackburn**

🕒 1/3 of the prize

USA

University of California  
San Francisco, CA, USA



Photo: Gerbil, Licensed by Attribution Share Alike 3.0

**Carol W. Greider**

🕒 1/3 of the prize

USA

Johns Hopkins University  
School of Medicine  
Baltimore, MD, USA



Photo: Jussi Pulkkonen

**Jack W. Szostak**

🕒 1/3 of the prize

USA

Harvard Medical School;  
Massachusetts General  
Hospital  
Boston, MA, USA;  
Howard Hughes Medical  
Institute

# Stabilność genomu

---

Mutageneza i naprawa DNA.

# Literatura

---

- Brown, rozdział 16
- Allison, rozdział 7

# Dokładność replikacji

---

- Systemy replikacyjne współczesnych organizmów są bardzo dokładne
- Żadna replikacja nie może być pozbawiona błędów
  - równowaga informacji i energii - nieskończona dokładność wymaga nieskończonej energii
- Zmienność informacji genetycznej jest nieuchronna
  - podstawa procesu ewolucji

# Zmiany genomu

---

- Wielkoskalowe
  - Zmiany liczby i formy chromosomów, duplikacje całych genomów
  - Rearanżacje chromosomowe
  - Dotyczą dużej liczby genów, fenotyp plejotropowy
- Mutacje
  - Dotyczą jednego, bądź niewielkiej liczby genów

# Powstawanie mutacji - teorie

---

- **Spontaniczne**

- powstają przypadkowo, środowisko może wpływać na częstość (np. mutageny) mutacji, ale nie na to, w którym genie zachodzą

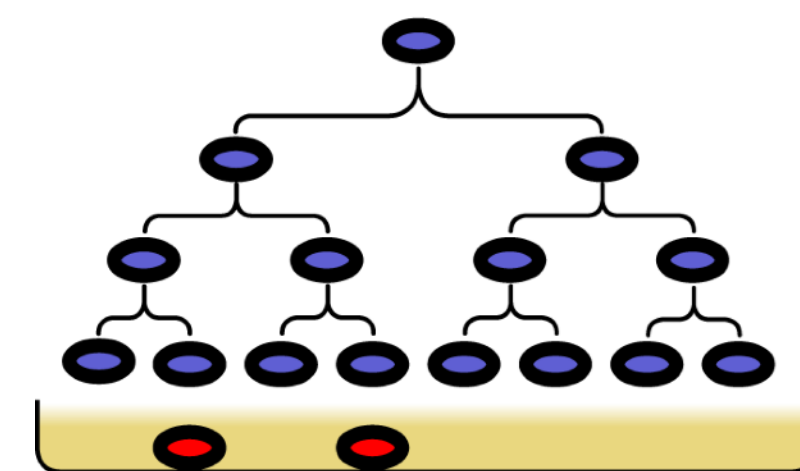
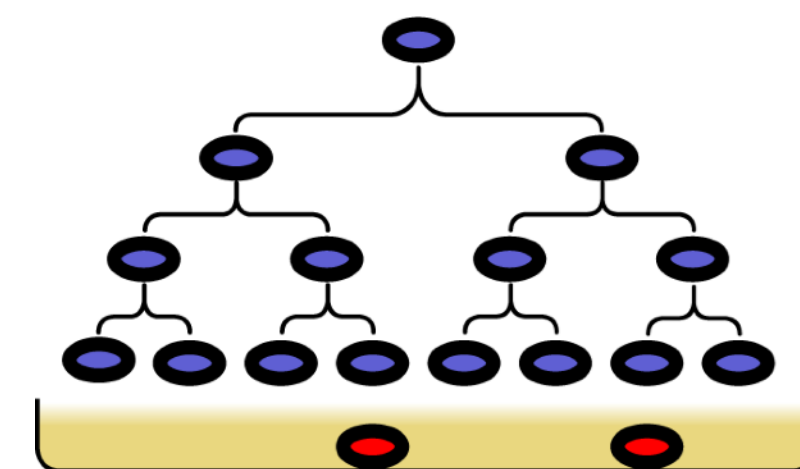
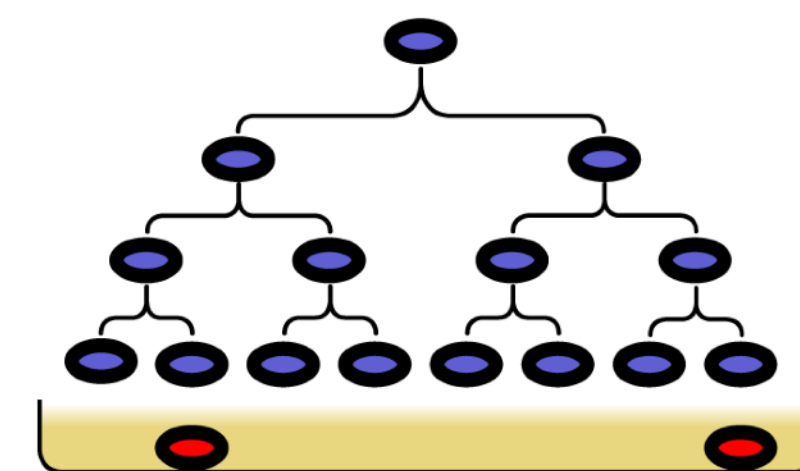
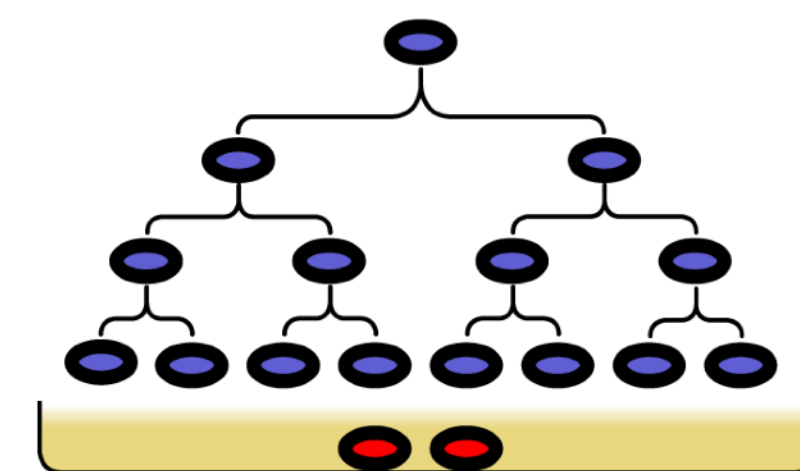
- **Indukowane**

- powstają w konkretnym genie w odpowiedzi na czynnik selekcyjny

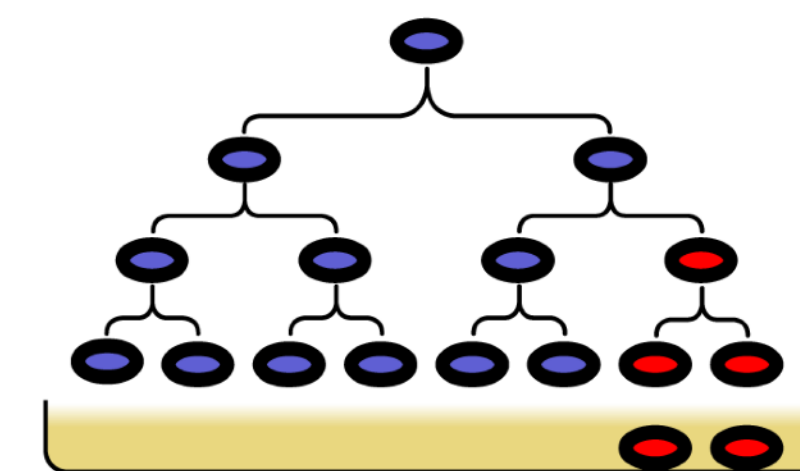
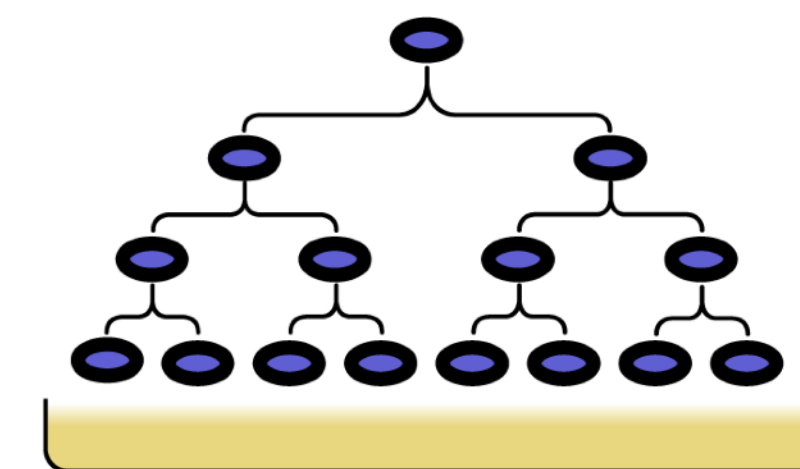
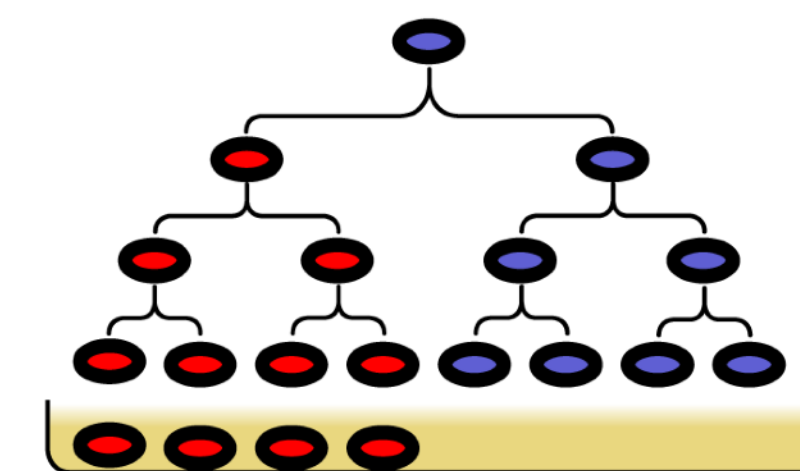
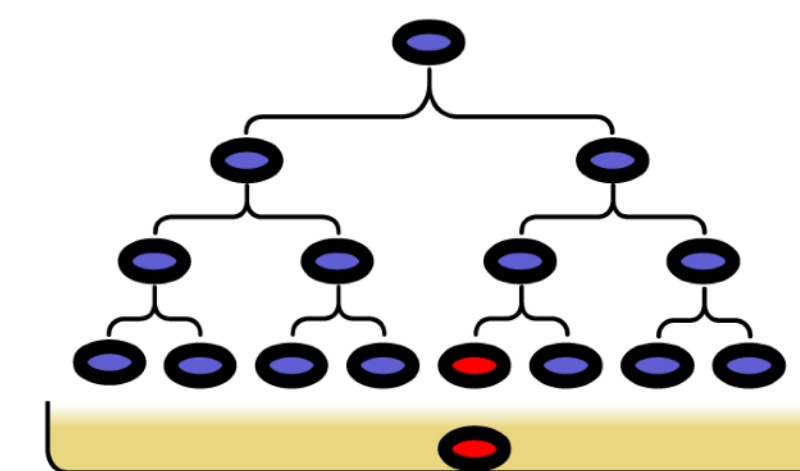


# Test fluktuacyjny

- Pojawianie się mutantów *E. coli* opornych na faga T1
- Jeżeli pojawiają się w odpowiedzi na kontakt z fagiem, to fluktuacje liczby opornych kolonii z każdej hodowli będą niewielkie
- Jeżeli pojawiają się spontanicznie, to liczba opornych kolonii będzie zmienna, zależnie od tego, kiedy w hodowli pojawił się mutant

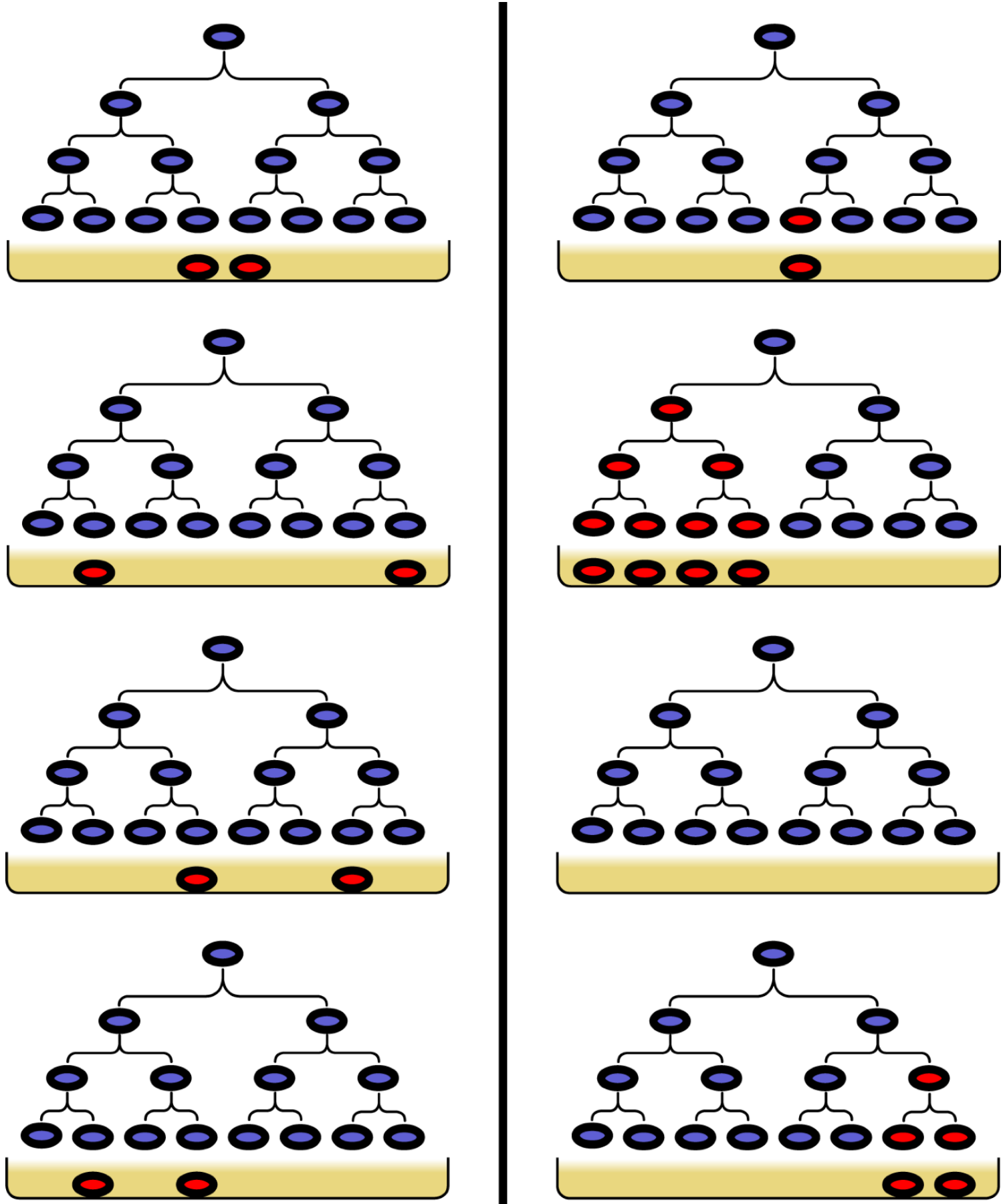


indukowane



spontaniczne

# Test fluktuacyjny



indukowane

spontaniczne

Number of T1-Resistant Bacteria		
Sample No.	Same Culture (Control)	Different Cultures
1	14	6
2	15	5
3	13	10
4	21	8
5	15	24
6	14	13
7	26	165
8	16	15
9	20	6
10	13	10
Mean	16.7	26.2
Variance	15.0	2178.0

Source: After Luria and Delbrück (1943).

Luria & Delbrück, 1943

# Poziom molekularny DNA

---

- Podstawienia (punktowe)
  - Tranzycje
    - zmiana puryny w purynę, pirymidyny w pirymidynę
  - Transwersje
    - zmiana puryny w pirymidynę i vice versa
  - Tranzycje są częstsze – tautomeria zasad i inne mechanizmy błędnego włączania nukleotydów prowadzą do tranzycji, tranzycje łatwiej wymykają się mechanizmom naprawy
- Delecje i insercje
- Rearanżacje na dużą skalę

# Mutacja

---

- Trwała, przekazywana przy replikacji zmiana sekwencji nukleotydowej w materiale genetycznym
- Nie każde uszkodzenie DNA jest mutacją – staje się nią dopiero po utrwaleniu i przekazaniu do cząsteczki (lub cząsteczek) potomnych

# Mutacja i naprawa

## A mutation

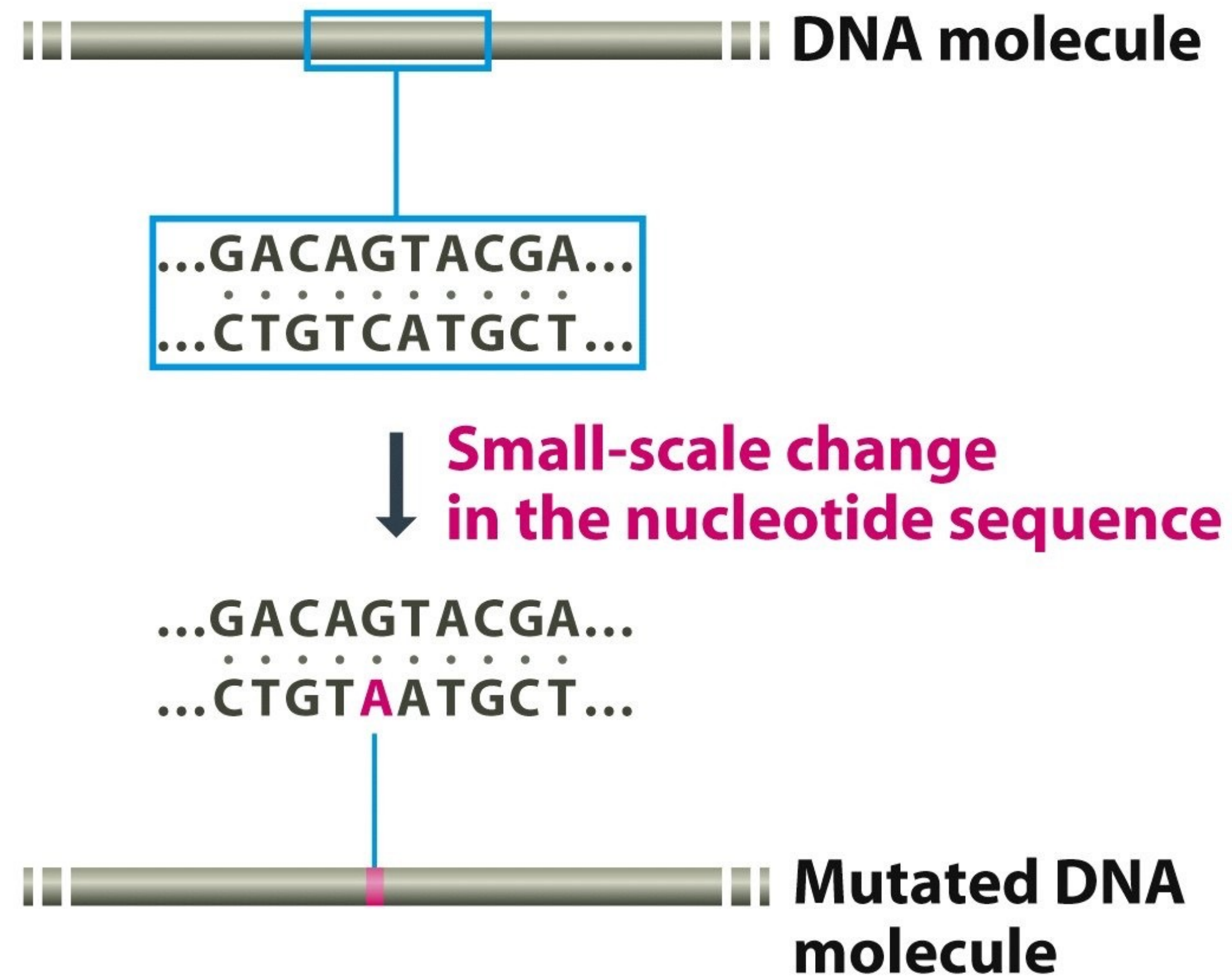


Figure 16-1a Genomes 3 (© Garland Science 2007)

## DNA repair

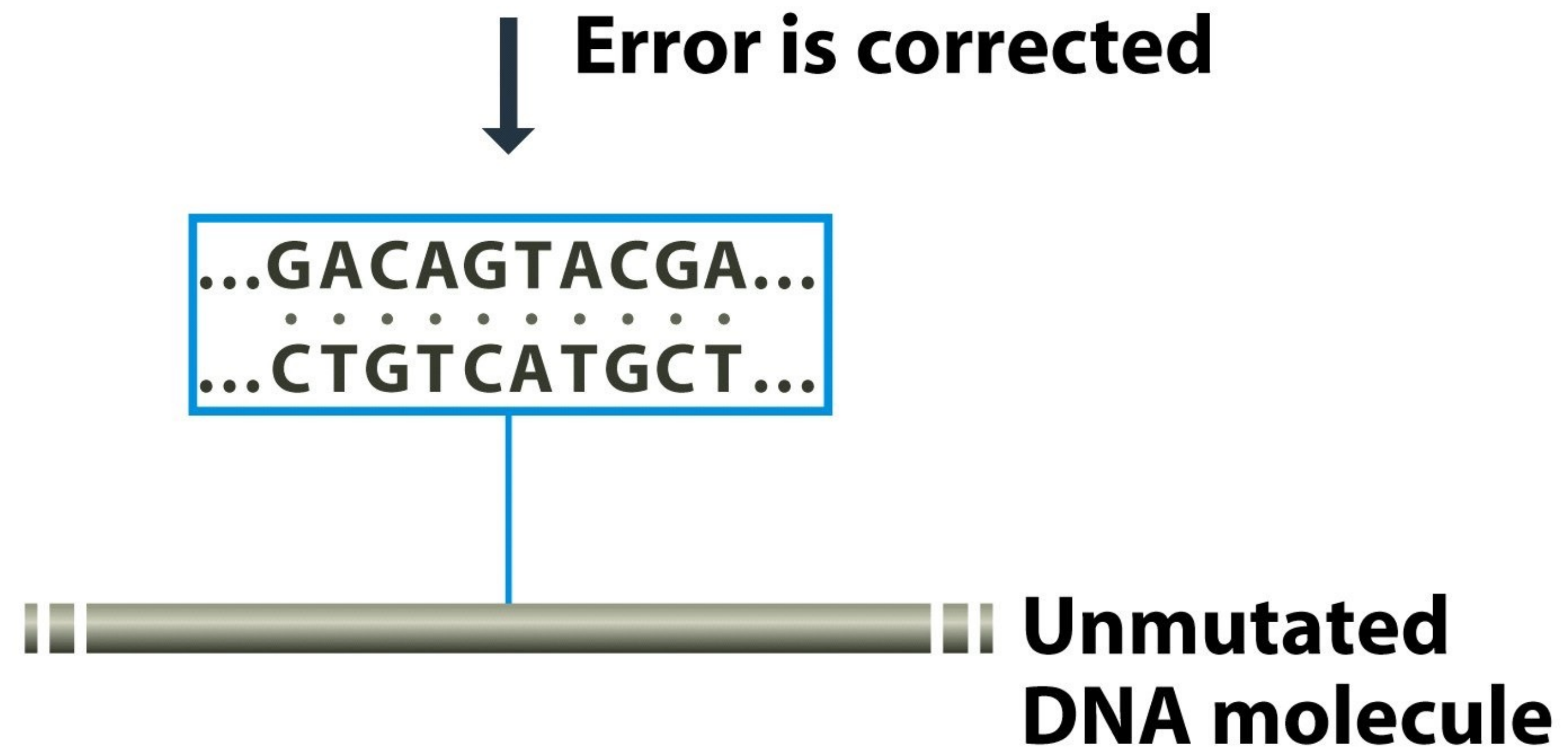
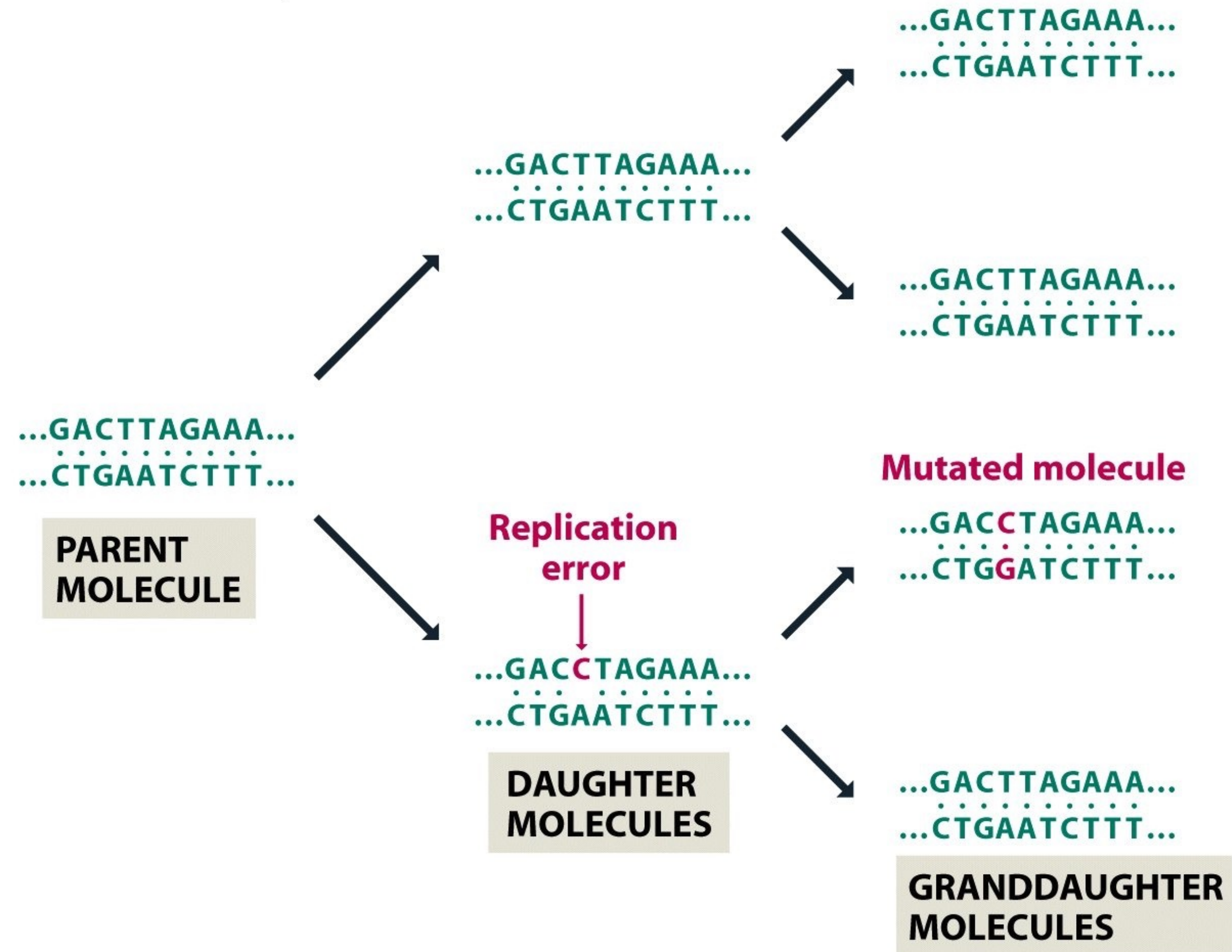


Figure 16-1b Genomes 3 (© Garland Science 2007)

# Replikacja utrwała zmiany

## An error in replication



# Przyczyny mutacji

---

- Mutacje spontaniczne
  - Nieuniknione błędy podczas replikacji
- Mutacje indukowane
  - Błędy w wyniku działania czynników uszkadzających DNA lub zaburzających replikację – mutagenów
- Podział nie jest ścisły – mechanizmy nieraz są podobne, wiele mutagenów zwiększa częstość błędów o mechanizmie takim, jak przy mutacjach spontanicznych

# Dokładność replikacji

- Specyficzność parowania nukleotydów nie jest zbyt wysoka (~5%)
- Mechanizm **selekcji nukleotydów** polimerazy: na 3 etapach:
  - wiązanie nukleotydu z polimerazą
  - przenoszenie do centrum aktywnego
  - dołączanie do 3' końca syntetyzowanego łańcucha
- Mechanizm **korekcji błędów**:
  - Aktywność egzonukleazy 3'-5'
  - Usuwanie niewłaściwie wstawionego nukleotydu
  - Zasada konkurencji między aktywnością polimerazy a egzonukleazy

## Nucleotide selection

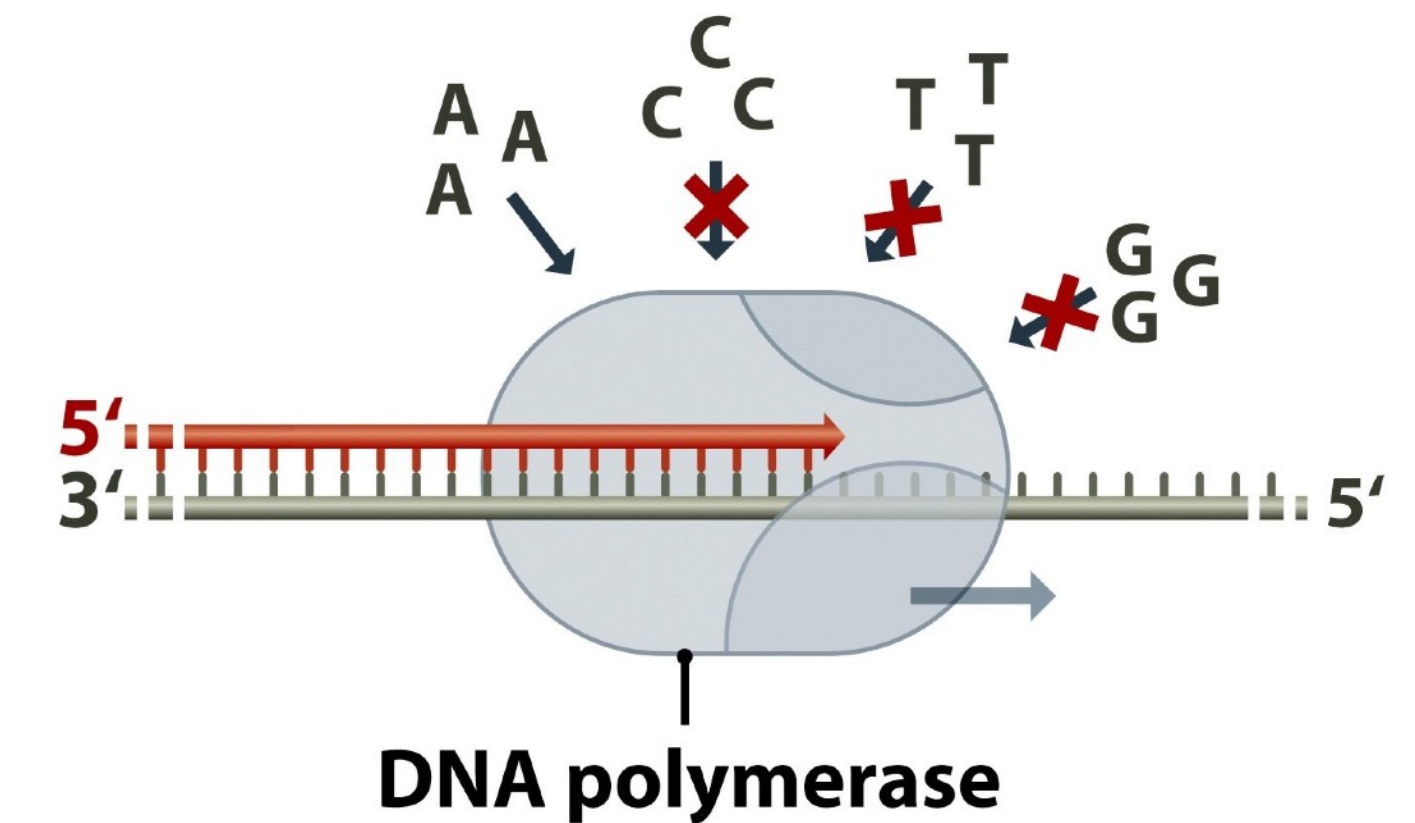
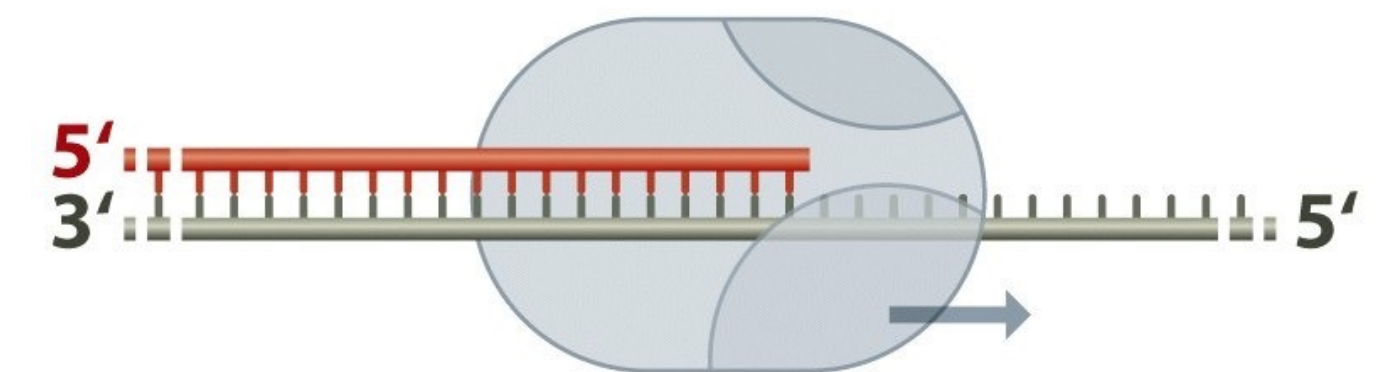
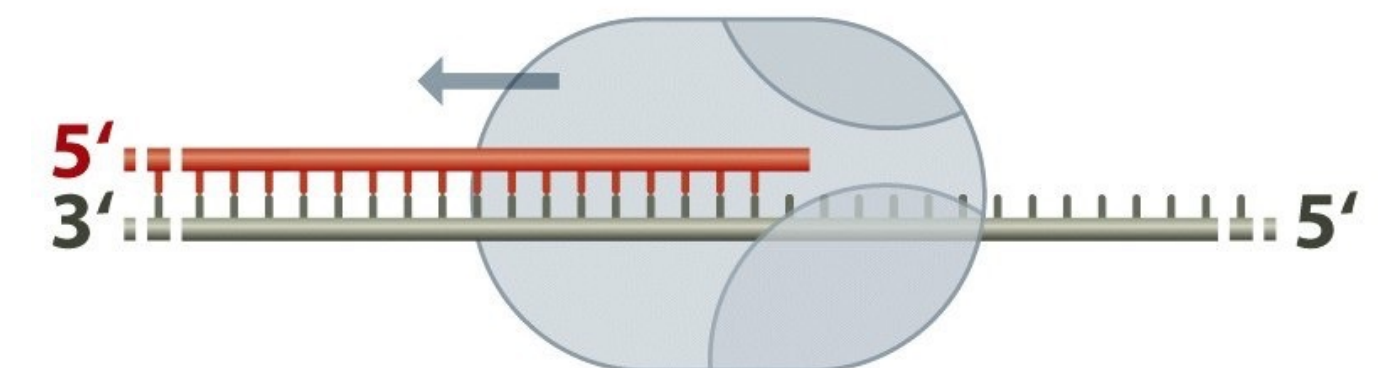


Figure 16-3a Genomes 3 (© Garland Science 2007)

## "Proofreading"



Last nucleotide is  
base-paired  
**POLYMERASE WINS**



Last nucleotide is not  
base-paired  
**EXONUCLEASE WINS**

Figure 16-3b Genomes 3 (© Garland Science 2007)



# Dokładność replikacji

---

- Ostatecznie polimeraza jest bardzo dokładnym enzymem
- U *E. coli* częstość błędów 1:10<sup>7</sup> wstawianych nukleotydów
- Częstość błędów na nici opóźnionej 20x wyższa niż na wiodącej
  - PolI mniej dokładna niż PolIII

# Mutacje spontaniczne – tautomeria zasad

- Zasady azotowe występują w formach tautomerycznych keto i enol (T, G, U) oraz amino i imino (A, C)
- Dominuje forma ketonowa (lub aminowa) i ona daje właściwe parowanie
- Rzadszy tautomer enolowy/iminowy może dać niewłaściwe parowanie

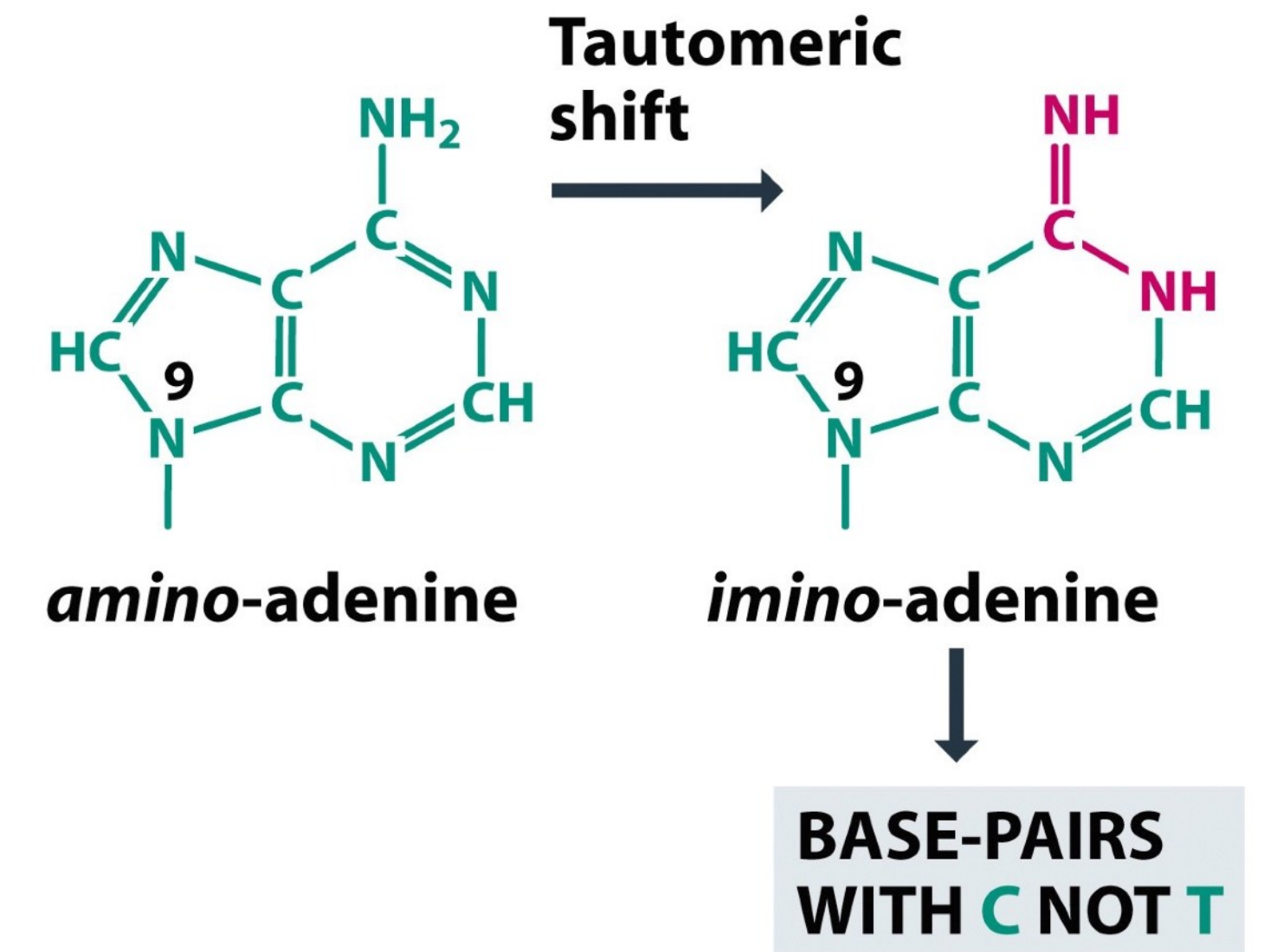


Figure 16-4 part 2 of 3 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

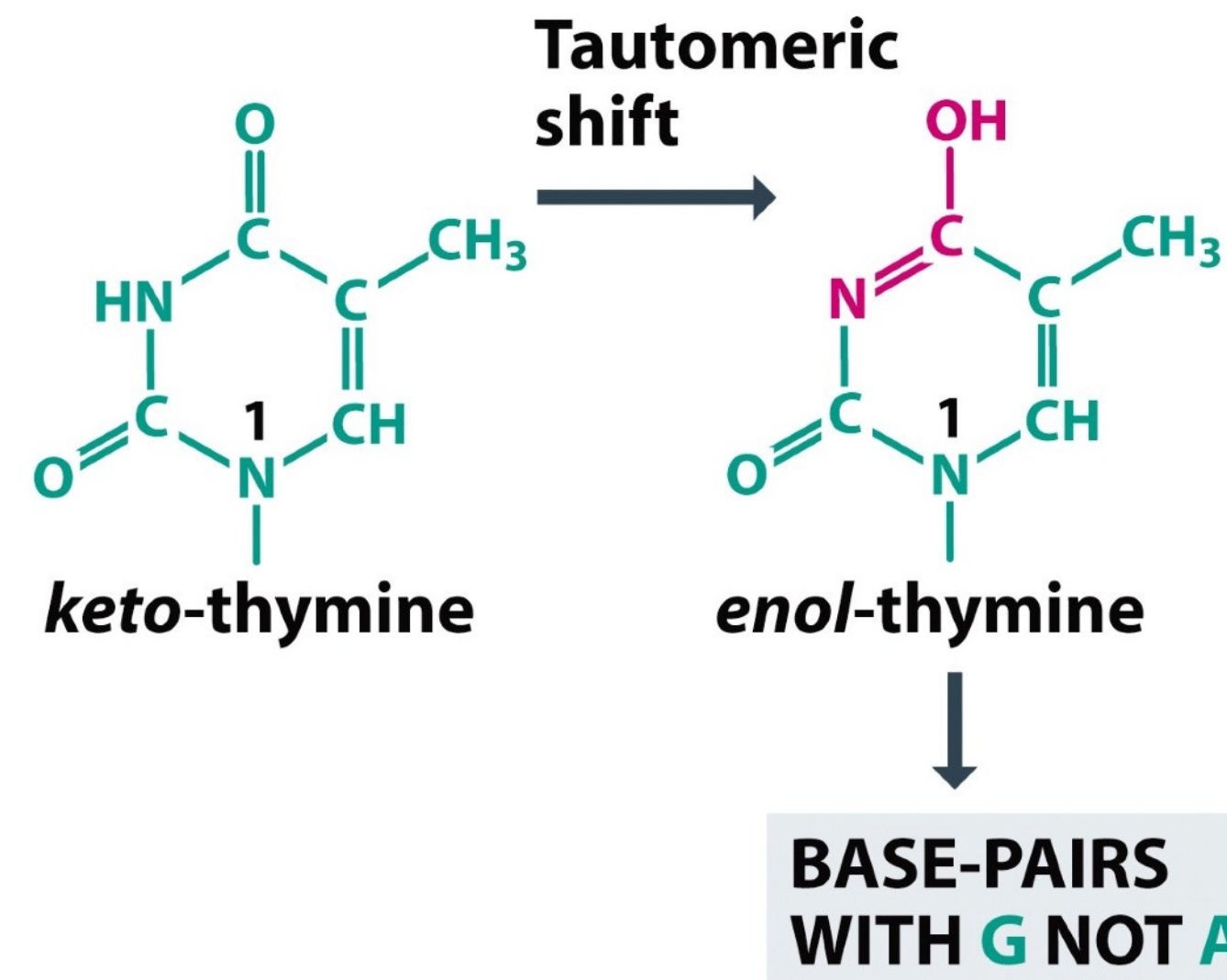


Figure 16-4 part 1 of 3 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

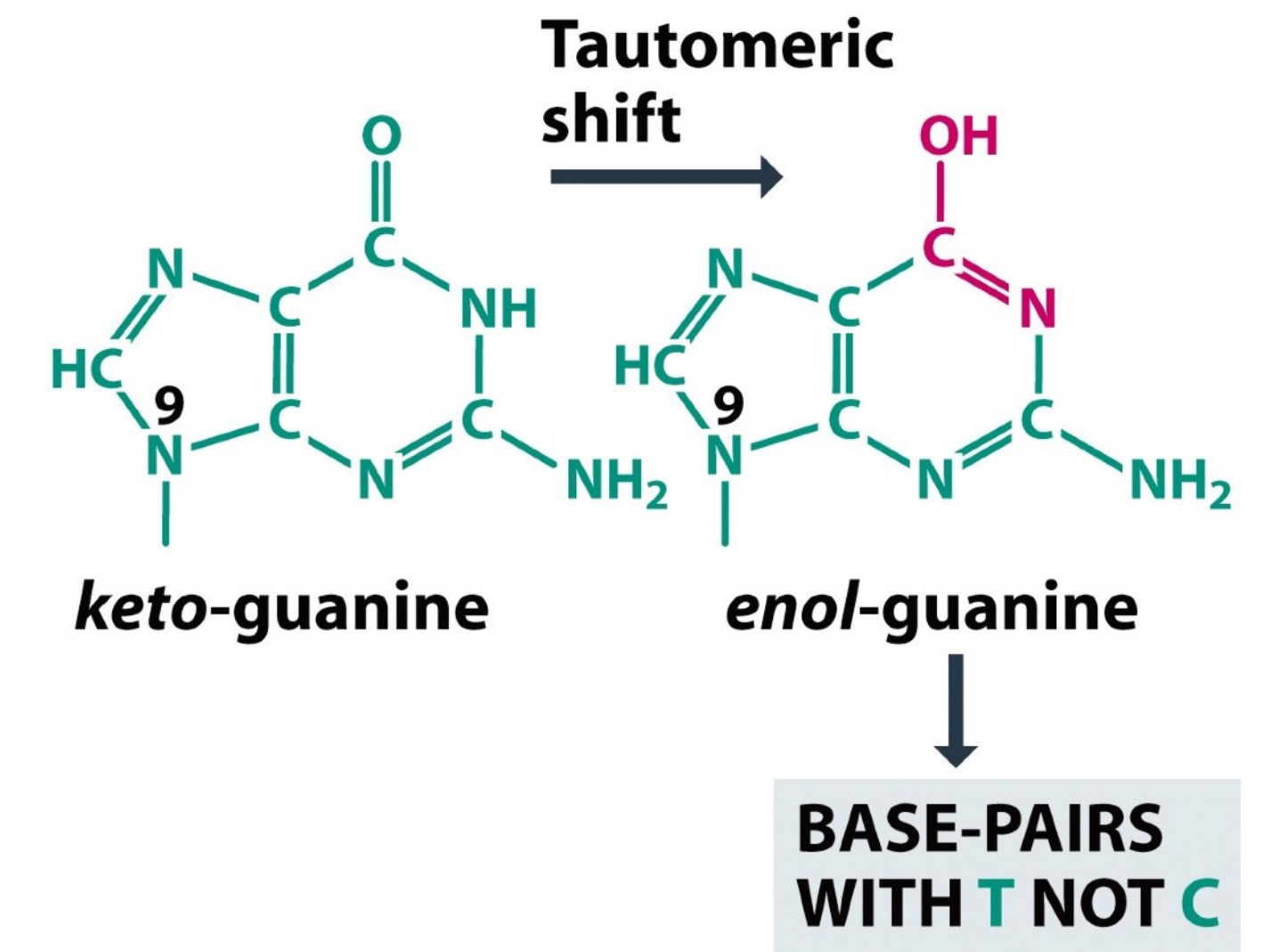


Figure 16-4 part 3 of 3 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

# Poślizg replikacji

- Przesunięcie nici matrycowej i potomnej o jedną (lub więcej) jednostkę (zachowane parowanie)
- Częsty w sekwencjach powtórzonych, powoduje insercje i delecje
- Zmienne sekwencje mikrosatelitarne
- Wykorzystywane jako markery w badaniach populacyjnych, kryminalistycznych itp.
- Niestabilność mikrosatelitów jest jednym z fenotypów komórek nowotworowych

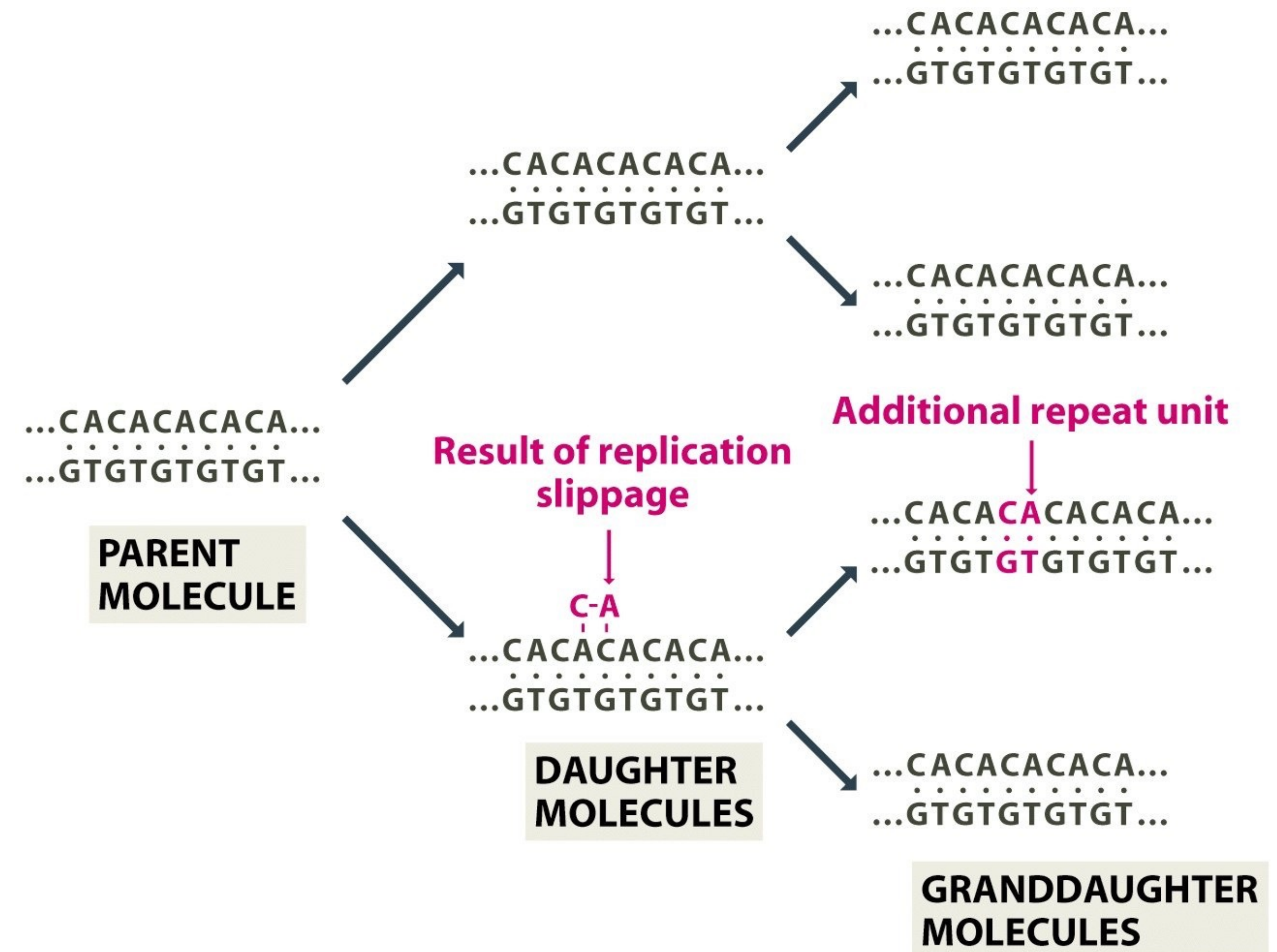


Figure 16-5 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

# Ekspansje trójkowe

---

- Wydłużanie serii powtórzeń trójnukleotydowych
- Mechanizm złożony: możliwe zaburzenia syntezy nici opóźnionej, efekt struktury DNA
- Przyczyna szeregu chorób genetycznych
- Niekiedy efekt antycypacji:
  - liczba powtórzeń rośnie z pokolenia na pokolenie, aż osiągnie wartość krytyczną
  - fenotyp w każdym kolejnym pokoleniu coraz cięższy

# Przykłady chorób związanych z ekspansją powtórzeń

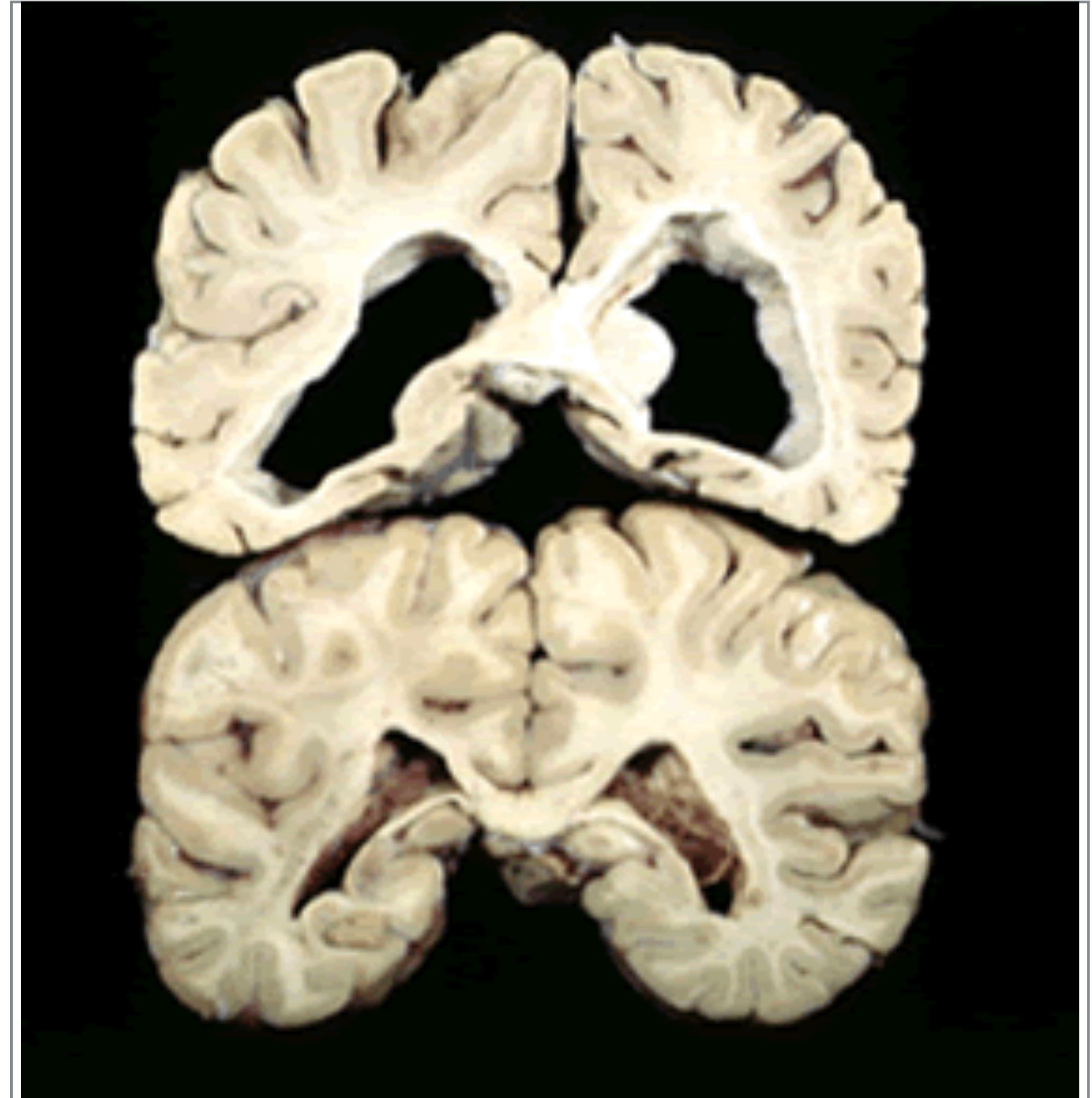
---

- Zespół kruchego chromosomu X
  - norma (CAG)<sub>6-35</sub>, chorzy (CAG)<sub>>60</sub>
  - w sekwencji liderowej genu
- Choroba Huntingtona
  - norma (CAG)<sub>6-35</sub>, chorzy (CAG)<sub>36-121</sub>
  - w sekwencji kodującej, trakt poliglutaminowy
  - cecha dominująca, agregacja białka
- Ataksja Friedreicha
  - norma (CTG)<sub>5-37</sub>, chorzy (CTG)<sub>40-200</sub>
  - w intronie, zaburza splicing, obniżony poziom białka

# Choroba Huntingtona

---

- Postępująca degeneracja tkanki mózgu
- Pierwsze objawy zwykle w wieku 35-45 lat
- Zaburzenia behawioralne, zaburzenia ruchu (płásawica), postępująca ciężka demencja
- Oczekiwany czas życia - ~20 lat od pojawienia się objawów



**The human brain, showing the impact of HD on brain structure in the basal ganglia region of a person with HD (top) and a normal brain (bottom).**

<http://kobiljak.msu.edu>

# Mutageny

---

- Chemiczne
  - analogi zasad – błędnie wykorzystywane jako substraty
  - reagujące bezpośrednio z DNA – np. czynniki alkilujące, deaminujące, interkalujące, tworzące addukty
  - działające pośrednio – np. zwiększające produkcję reaktywnych form tlenu (nadtlenki, rodniki) w komórce
  - działające na polimerazę – np. jony  $Mn^{2+}$  (zamiast  $Mg^{2+}$ ) jako kofaktory polimerazy  $\gamma$  powodują wzrost częstości błędów
- Fizyczne
  - Np. UV, promieniowanie jonizujące, temperatura
- Biologiczne
  - Wirusy i ruchome elementy genetyczne integrujące się do genomu

# Mutagen chemiczny - przykład

- 5-bromouracyl
- analog tyminy, ale równowaga przesunięta w stronę formy enolowej, tworzącej pary z G

## Base pairing with 5-bromouracil

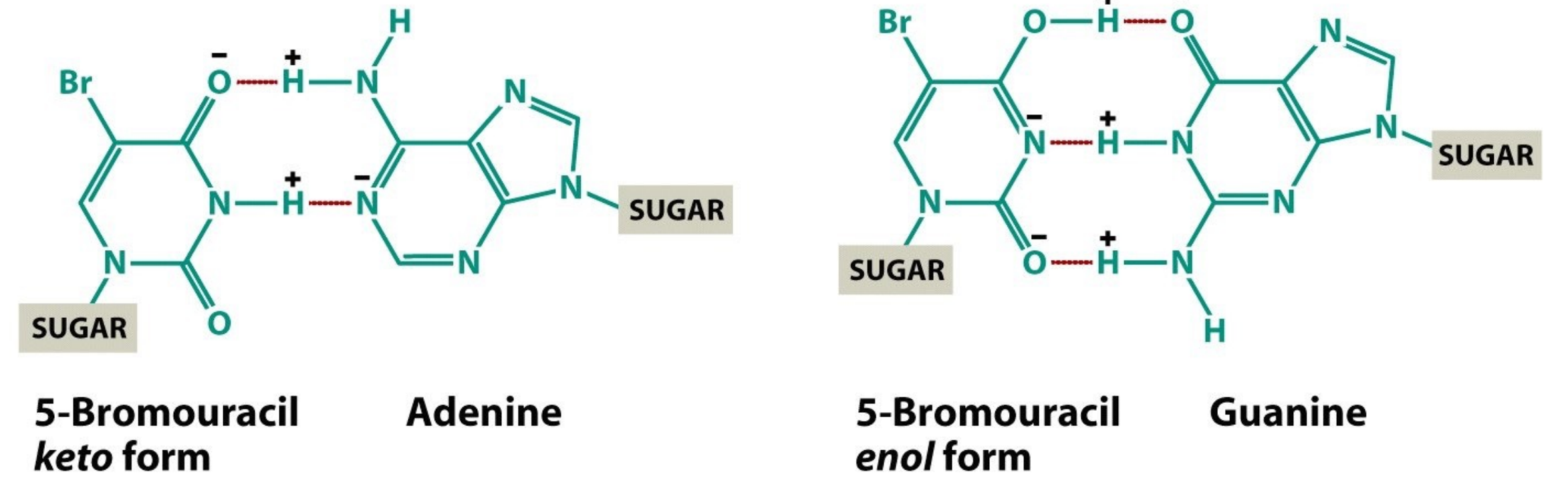


Figure 16-6b Genomes 3 (© Garland Science 2007)

## The mutagenic effect of 5-bromouracil

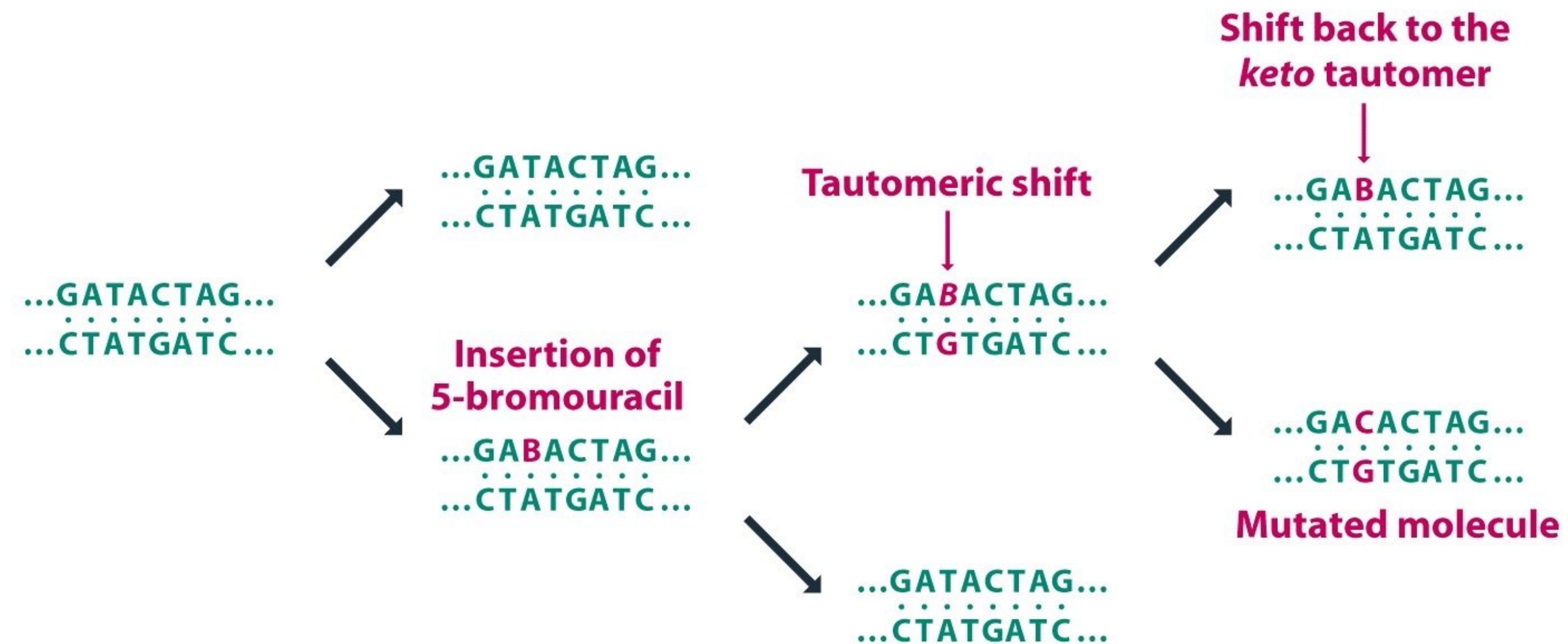


Figure 16-6c Genomes 3 (© Garland Science 2007)



# Mutageny chemiczne uszkadzające DNA

---

- EMS (metanosulfonian etylu)
  - alkiluje zasady azotowe
- Czynniki deaminujące (kwas azotawy, dwusiarczyn sodowy)
  - Deaminacja adeniny daje hipoksantynę:  
paruje z C zamiast T
- Węglowodory policykliczne

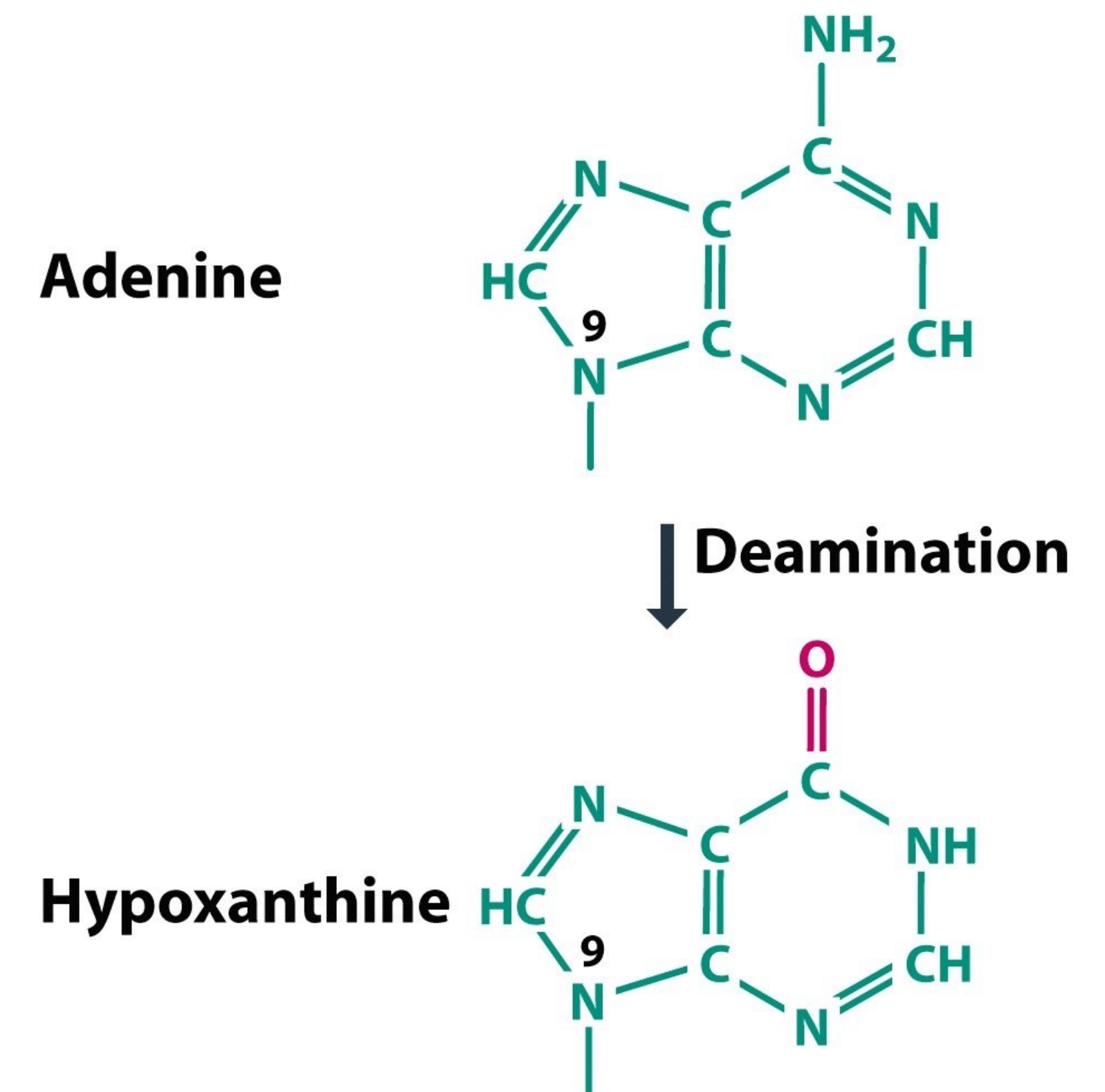


Figure 16-7 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

# Czynniki interkalujące

---

- Płaskie cząsteczki, wciskają się między pary zasad, zmieniają skok helisy – najczęściej insercje
- np. bromek etydyny, akryflawiny
- silniejsze działanie na niewielkie cząsteczki koliste

## Ethidium bromide

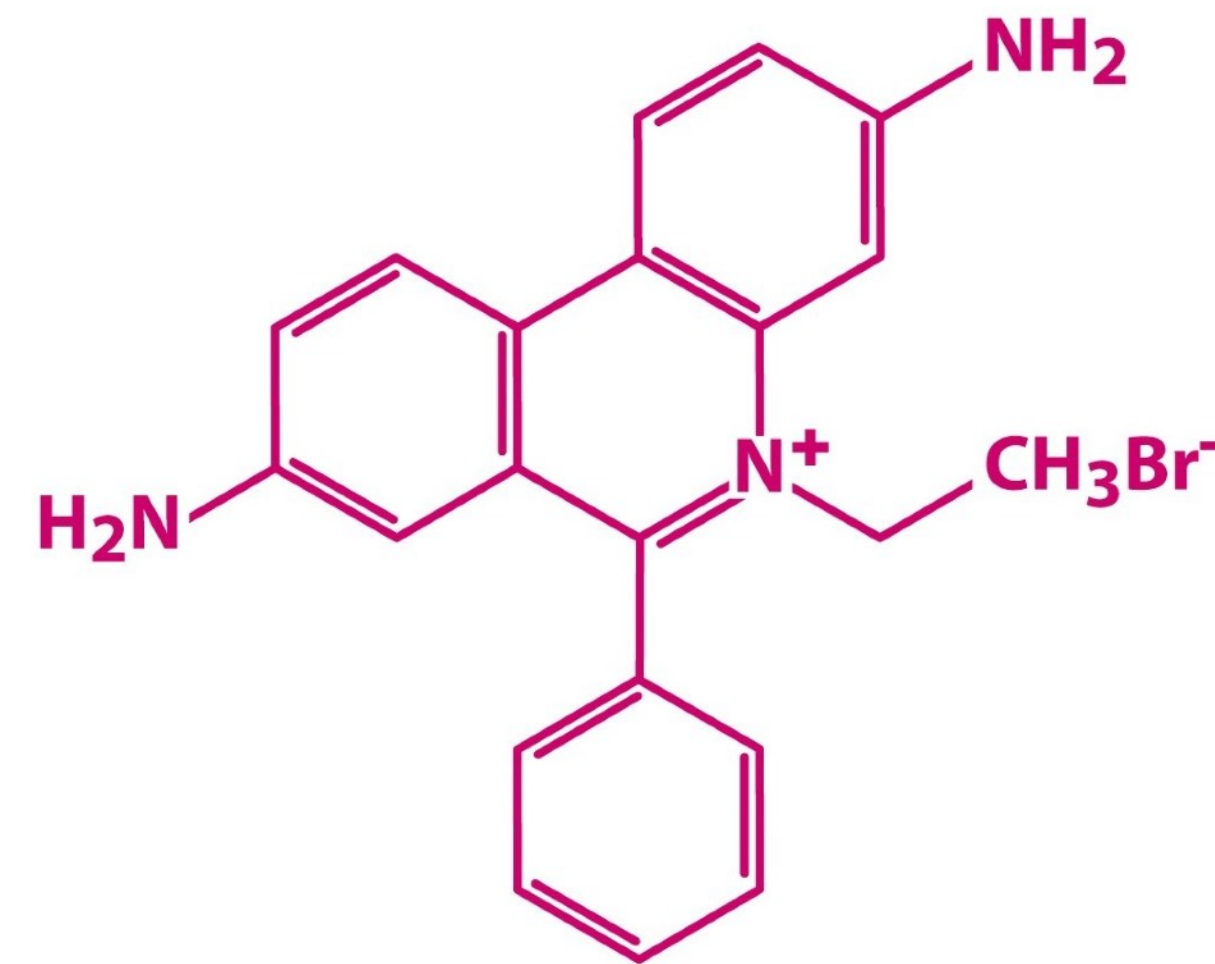


Figure 16-8a Genomes 3 (© Garland Science 2007)

## The mutagenic effect

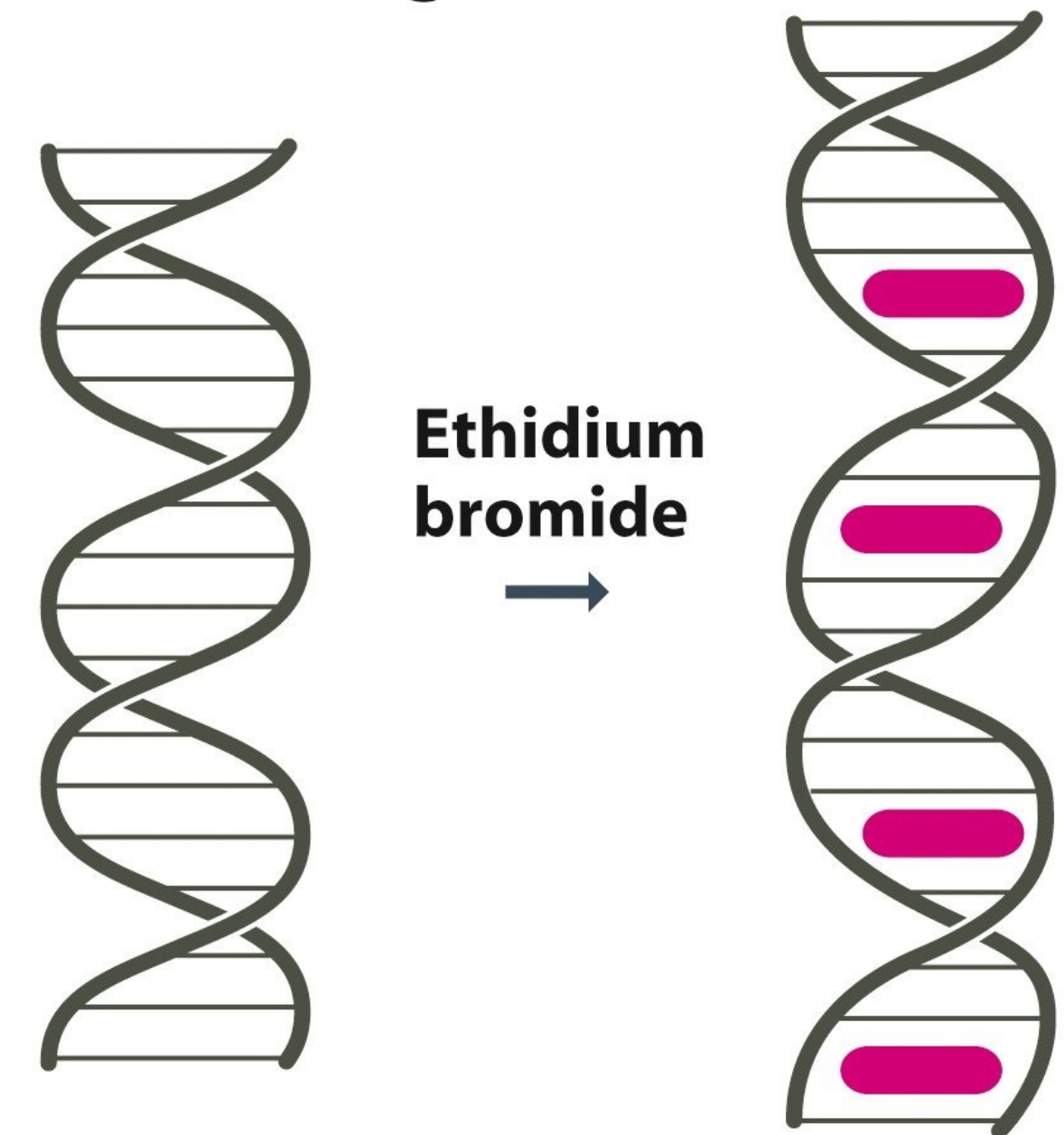


Figure 16-8b Genomes 3 (© Garland Science 2007)

# Działanie temperatury

- Hydroliza wiązania  $\beta$ -N-glikozydowego, powstaje miejsce AP (apurynowe/apirymidynowe) i luka
- Zwykle wydajnie naprawiane, ale w sytuacjach przeciążenia systemów naprawczych może być mutagenne
- W ludzkich komórkach powstaje 10 000 miejsc AP dziennie

## Heat-induced hydrolysis of a $\beta$ -N-glycosidic bond

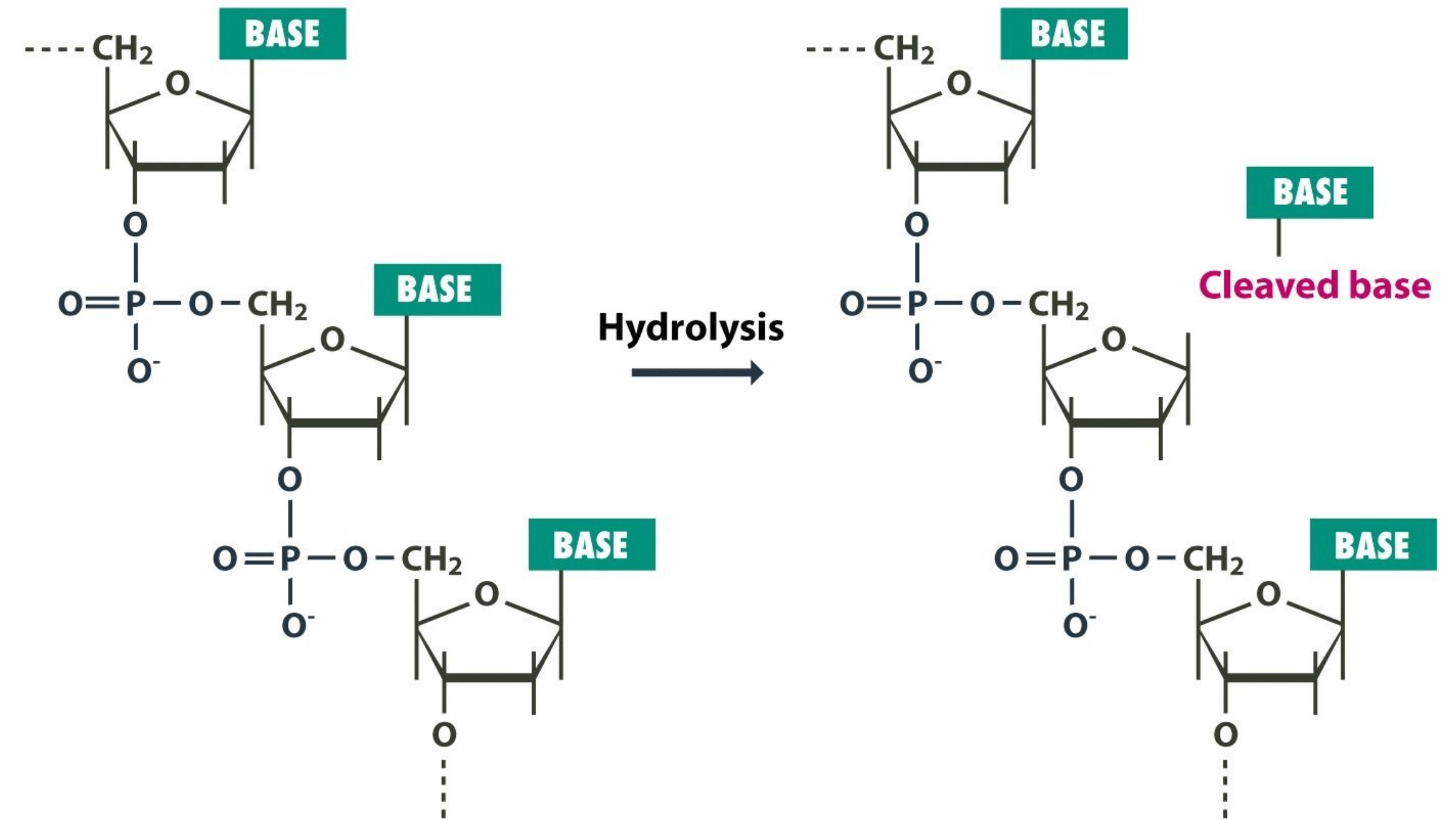


Figure 16-10a Genomes 3 (© Garland Science 2007)

## The effect of hydrolysis on double-stranded DNA

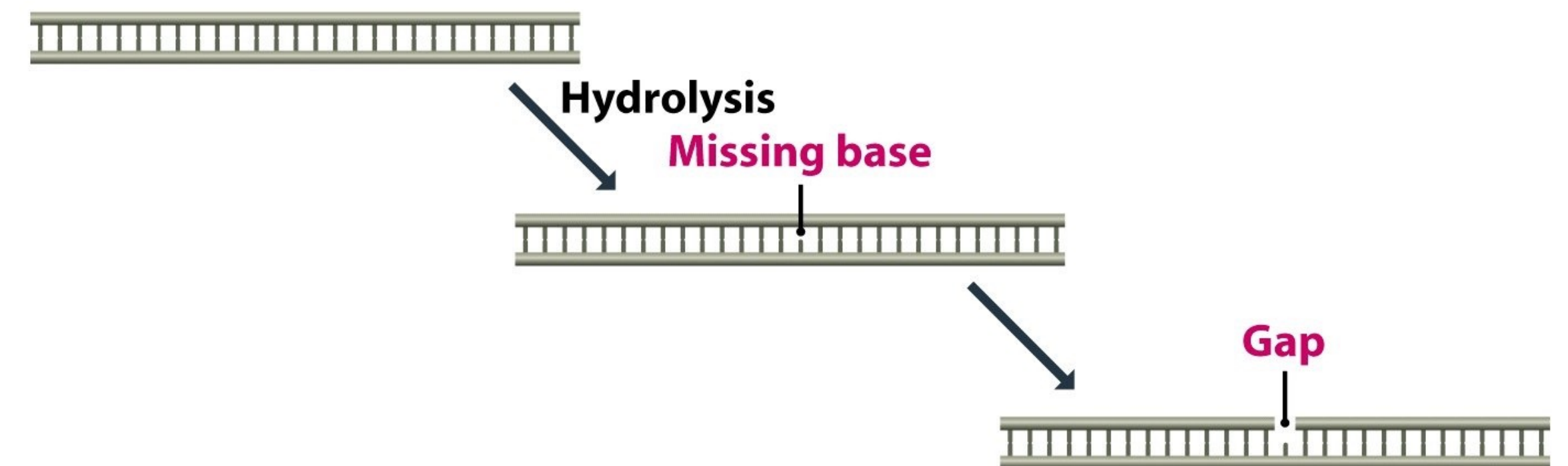


Figure 16-10b Genomes 3 (© Garland Science 2007)

# Działanie UV

- Powstają fotoprodukty – np. dimery cyklobutyłowe sąsiadujących zasad (najczęściej T-T), uszkodzenia 6-4

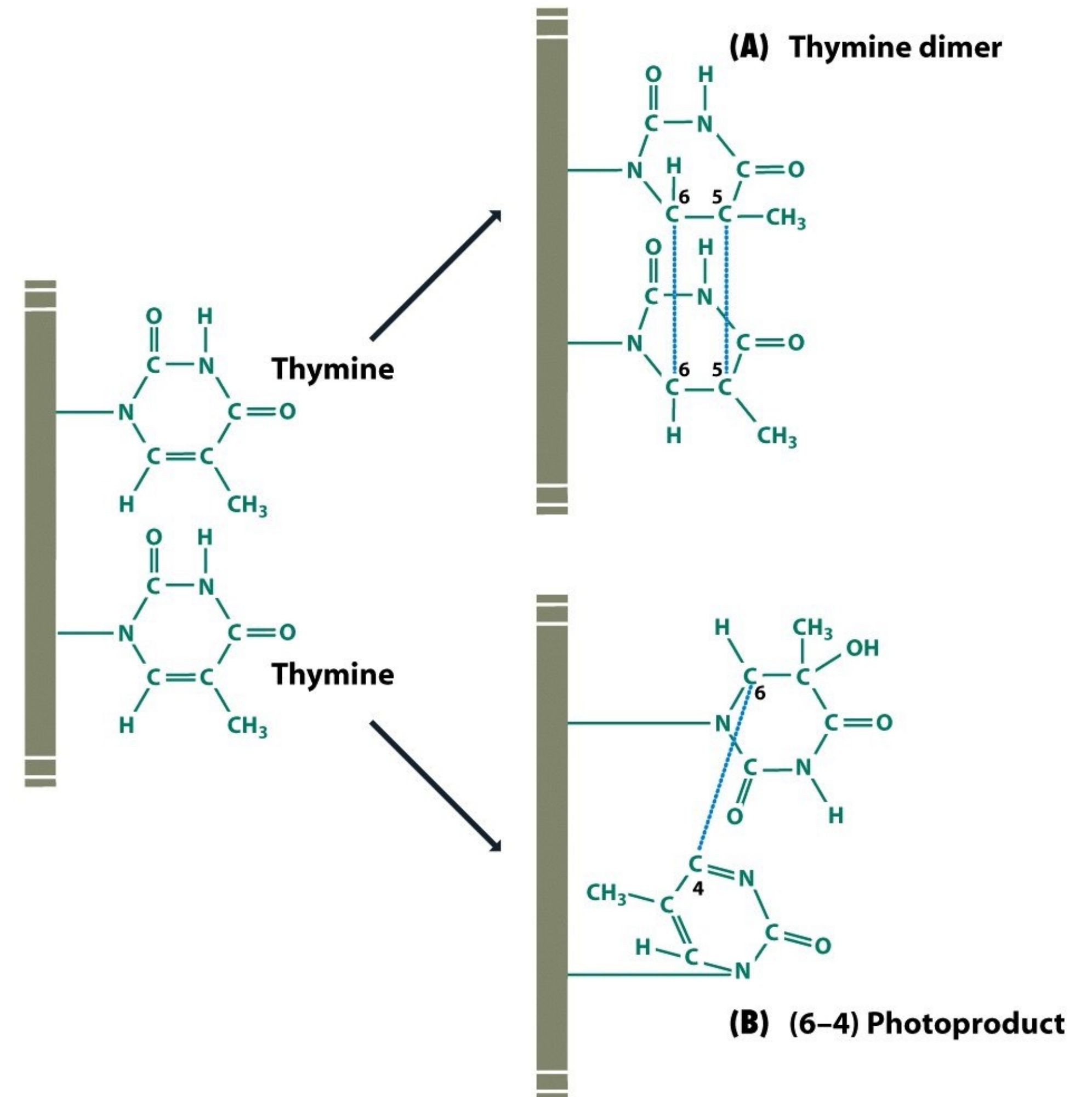


Figure 16-9 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

# Naprawa DNA

---

- U *E. coli* częstość błędów polimerazy 1:10<sup>7</sup> wstawianych nukleotydów
- Ogólna częstość błędów przy replikacji: 1:10<sup>10</sup> – 1:10<sup>11</sup> wstawianych nukleotydów
  - genom ~4,6·10<sup>6</sup> bp, czyli błąd raz na ~2000 – 20 000 podziałów
- Za zmniejszenie częstości błędów replikacji o 3-4 rzędy wielkości odpowiadają systemy naprawy DNA

# Systemy naprawy DNA

---

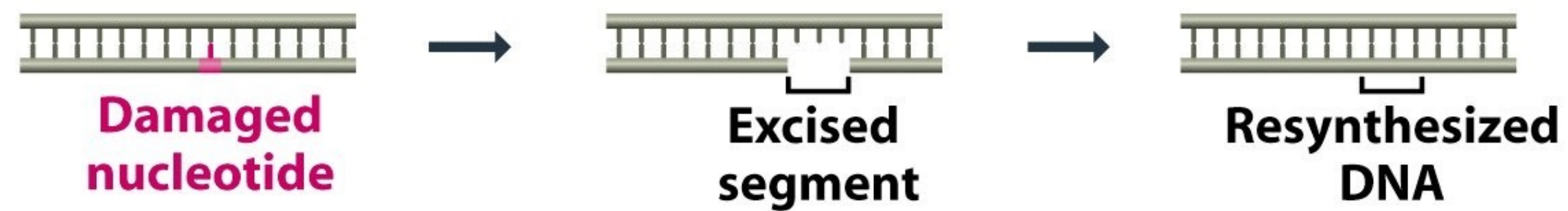
- Naprawa bezpośrednia (DR)
- Naprawa przez wycinanie i resyntezę (ER)
  - Naprawa przez wycinanie zasad (BER)
  - Naprawa przez wycinanie nukleotydów (NER)
  - Naprawa błędnie sparowanych nukleotydów (MMR)
- Naprawa pęknięć dwuniciowych (DSBR)
  - system łączenia końców niehomologicznych (NHEJ)
  - rekombinacja homologiczna (HR)

# Systemy naprawy DNA

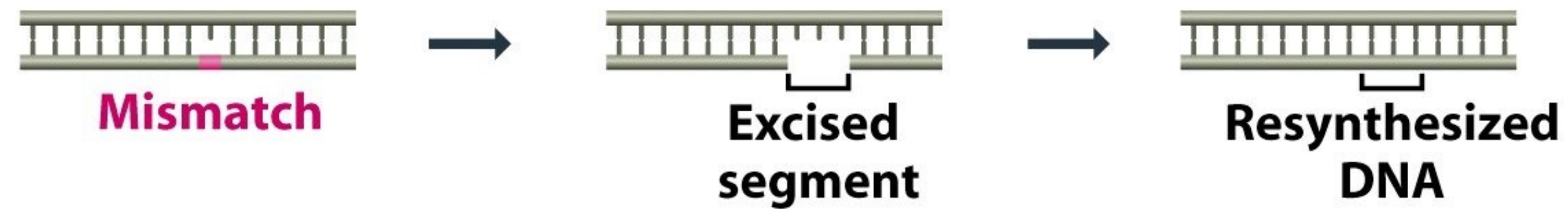
## (A) Direct repair



## (B) Excision repair



## (C) Mismatch repair



## (D) Nonhomologous end-joining



# Naprawa bezpośrednia

---

- Naprawa pęknięć jednoniciowych przez ligazę
- Odwrócenie reakcji alkilacji
  - np. MGMT (metylotransferaza O<sup>6</sup>-metyloguanino DNA) – usuwa grupy alkilowe z atomu 6 guaniny
- Fotoreaktywacja dimerów cyklobutylowych
  - fotoliza DNA
    - Występuje u mikroorganizmów i wielu zwierząt, ale brak u ssaków łożyskowych, w tym u człowieka (jej rolę przejmuje system NER – tzw. naprawa ciemna)
- Wspólna cecha – bez resyntezy DNA (udziału polimeraz)



# Naprawa przez wycinanie zasad (BER)

- Usunięcie uszkodzonej zasady azotowej przez specyficzną glikozydazę DNA
- Powstaje miejsce AP
- Endonukleaza AP oraz fosfodiesteraza usuwają resztkę nukleotydu
- Luka wypełniana jest przez polimerazę

## Removal of a damaged base by DNA glycosylase

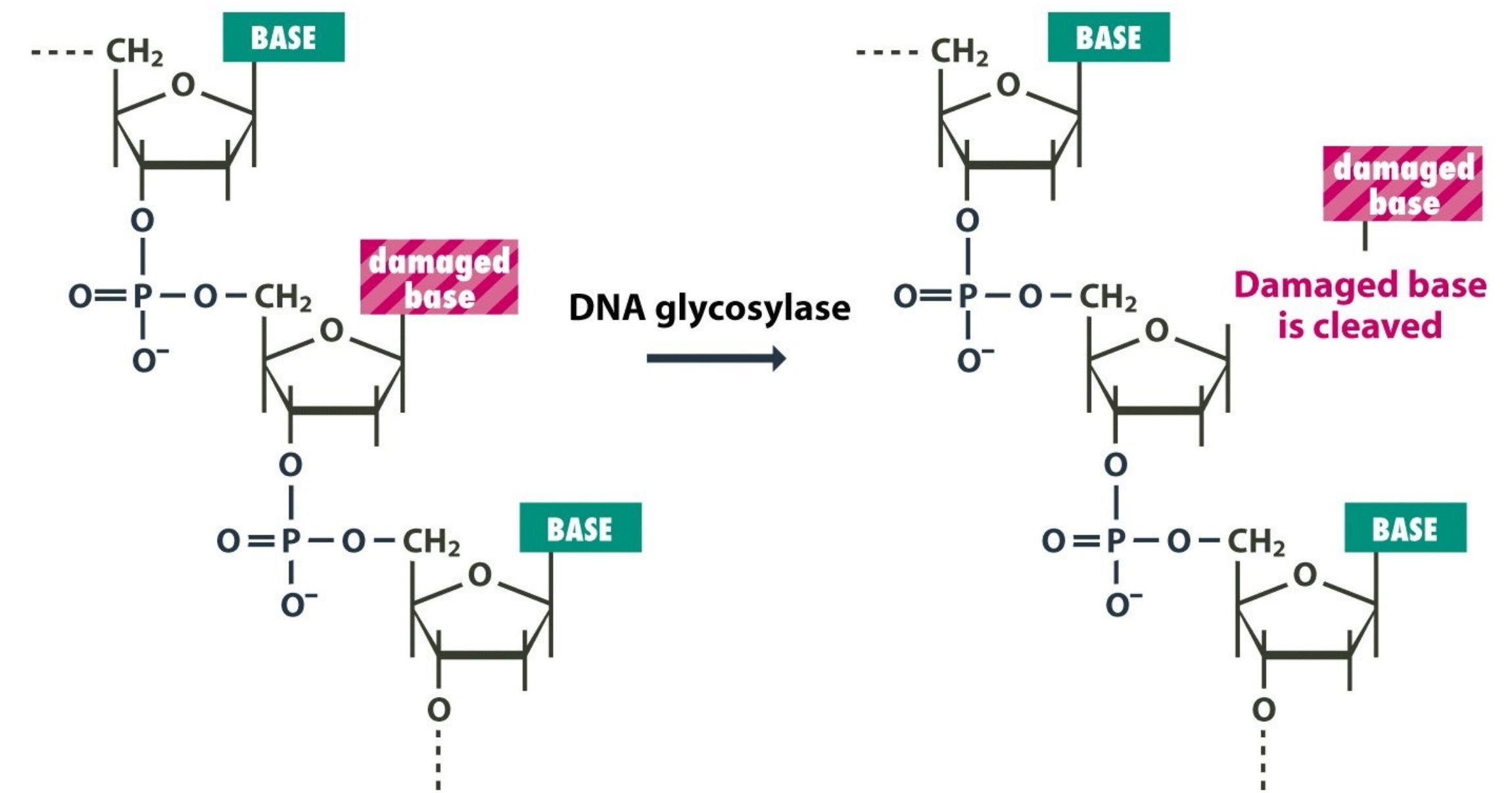


Figure 16-22a Genomes 3 (© Garland Science 2007)

## Outline of the pathway

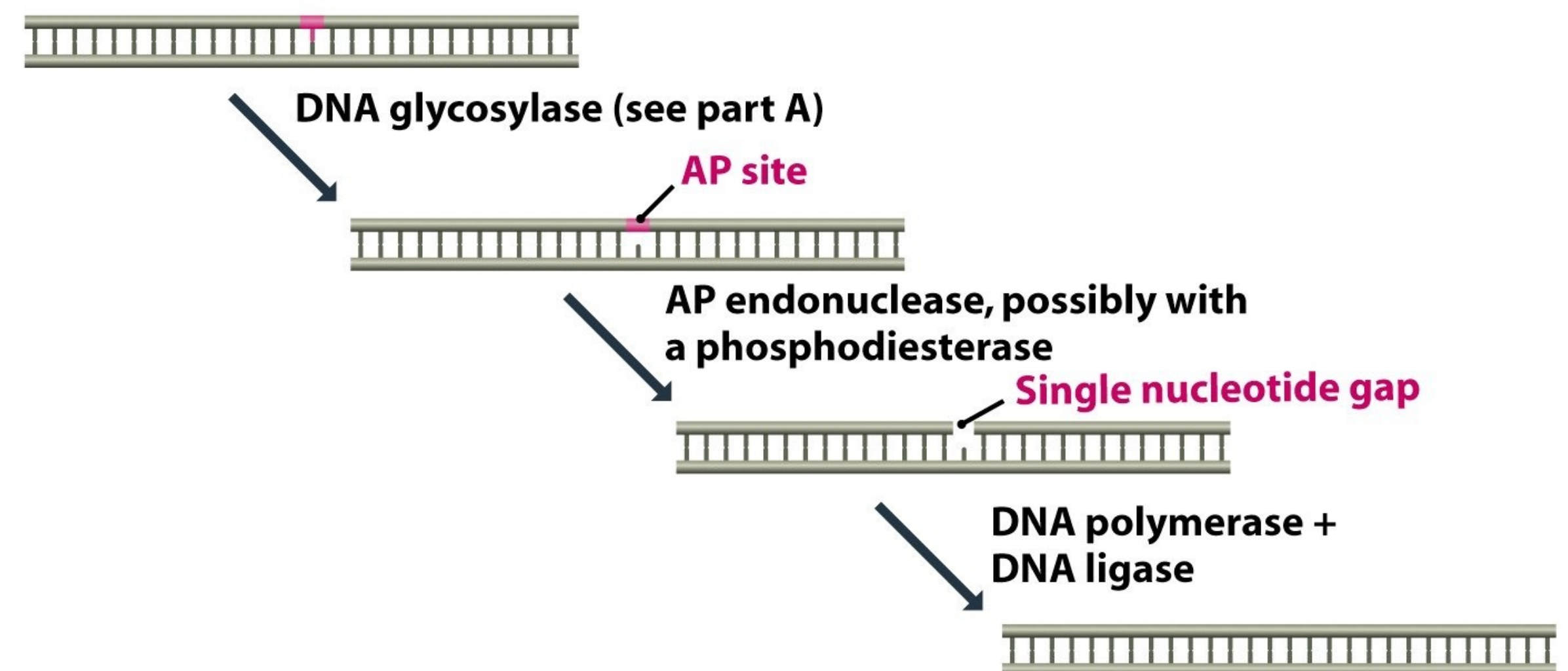


Figure 16-22b Genomes 3 (© Garland Science 2007)

## Glikozydazy – przykłady (ssaki)

---

Glikozydaza DNA	Specyficzność
MBD4	Uracyl
MPG	Etenoadenina, hipoksantyna, 3-metyloadenina
NTH1	Glikol cytozynowy, dihydrouracyl, formamidopirymidyna, glikol tyminowy
OGG1	Formamidopirymidyna, 8-oksoguanina
SMUG1	Uracyl
TDG	Etenocytozyna, uracyl
UNG	Uracyl, 5-hydroksyuracyl

Tabela jest tylko przykładem – nie uczyć się na pamięć!

## Nobel 2015 (chemia)

---

- Tomas Lindahl, za opisanie mechanizmu BER



# Naprawa przez wycinanie nukleotydów

- U bakterii dwa systemy
  - krótkich łańcuchów (wycinane ~12 nt)
  - długich łańcuchów (wycinane ~ 2 kb)
- U Eukaryota
  - wycinane ~25-30 nt

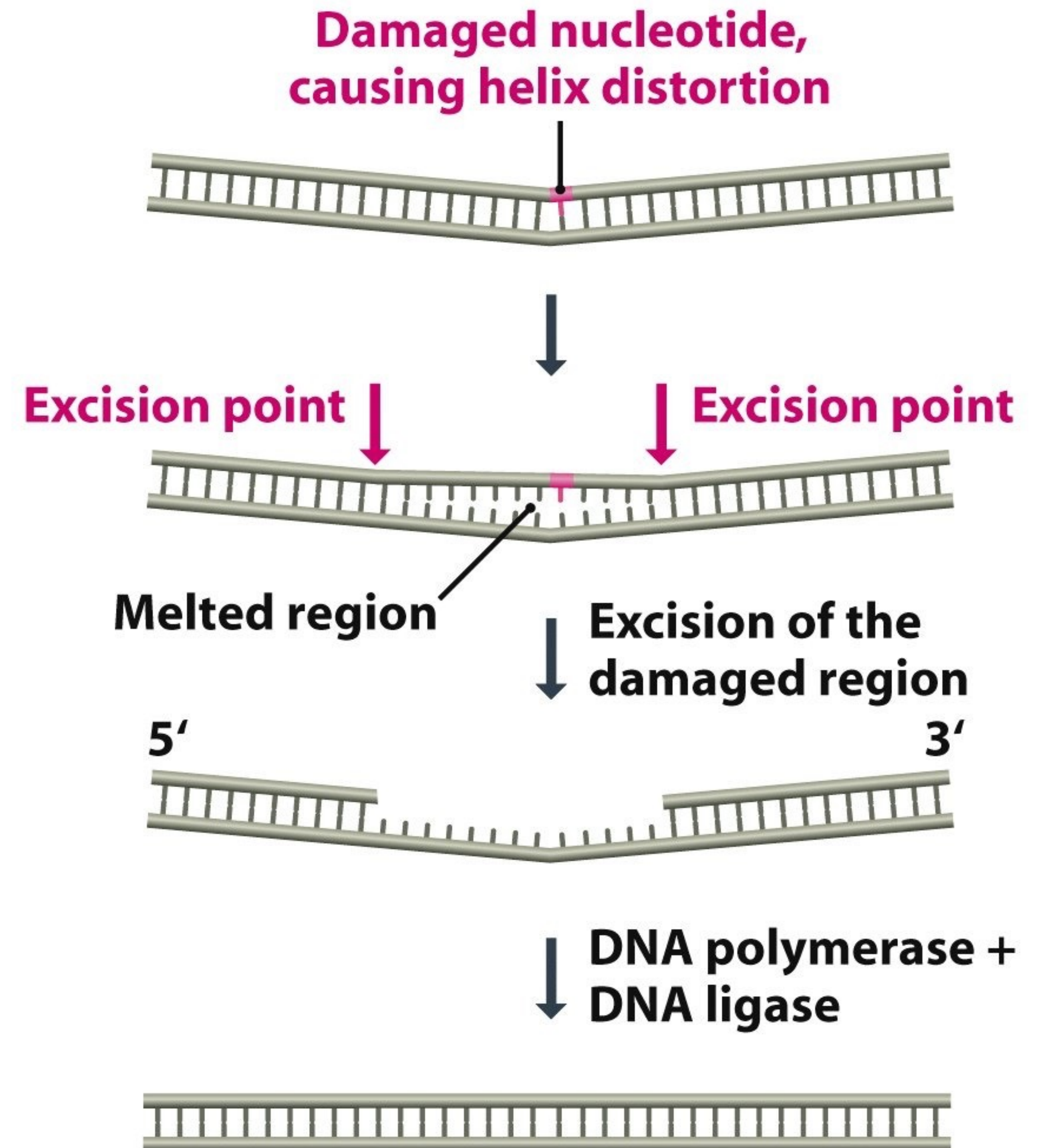


Figure 16-24 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

# Xeroderma pigmentosum

---

- Skóra pergaminowata i barwnikowa
- Choroba genetyczna związana z mutacjami genów kodujących białka systemu NER (7 grup komplementacji)
- U człowieka to NER odpowiada za naprawę fotoproduktów
- Działanie światła słonecznego wywołuje liczne przebarwienia i nowotwory skóry
- Nie ma lekarstwa – pacjenci muszą całkowicie unikać światła słonecznego



## Nobel 2015 (chemia)

---

- Aziz Sancar, za opisanie mehanizmu NER



# Naprawa błędnie sparowanych nukleotydów (MMR)

---

- W odróżnieniu od DR, BER i NER nie dotyczy uszkodzeń w DNA, tylko błędów replikacji – wstawionych niewłaściwych nukleotydów (np. błędy wynikające z tautomerii zasad)
- Rozpoznawane zaburzenie podwójnej helisy, błędny nukleotyd wraz z otoczeniem (nawet do 1 kb) usuwany, po czym polimeraza uzupełnia lukę
- Problem: jak rozpoznać, która nić jest rodzicielska (i ma właściwy nukleotyd), a która potomna (z błędem)

# Naprawa błędnie sparowanych nukleotydów (MMR)

- U bakterii nić rodzicielska jest metylowana
- U Eukaryota metylacja też może mieć znaczenie (u ssaków, u drożdży już nie), ale są inne mechanizmy (sprzężenie z replikacją, białka naznaczające nić rodzicielską)

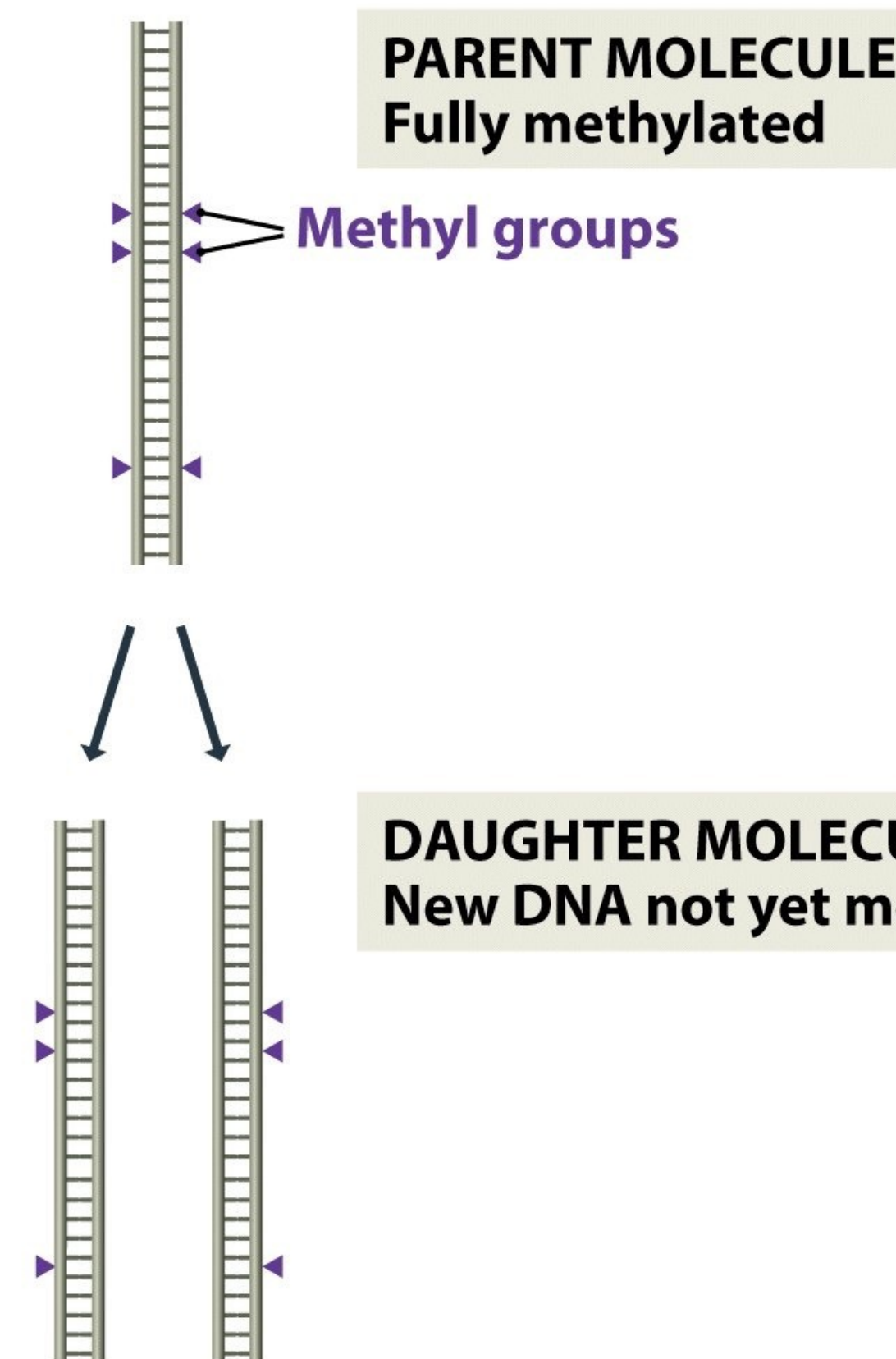


Figure 16-25 part 1 of 2 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

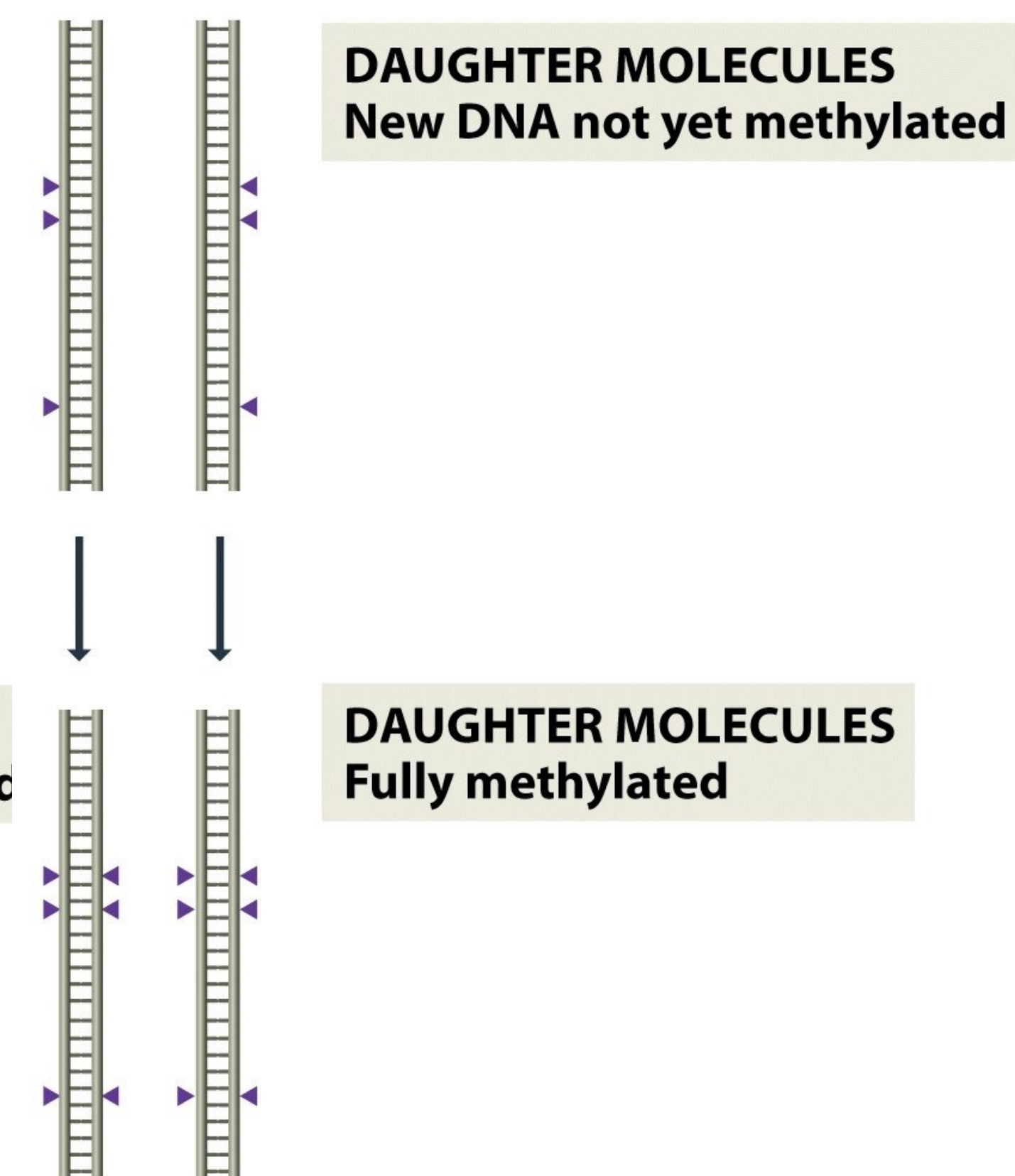


Figure 16-25 part 2 of 2 Genomes 3 (© Garland Science 2007)



# Naprawa błędnie sparowanych nukleotydów (MMR)

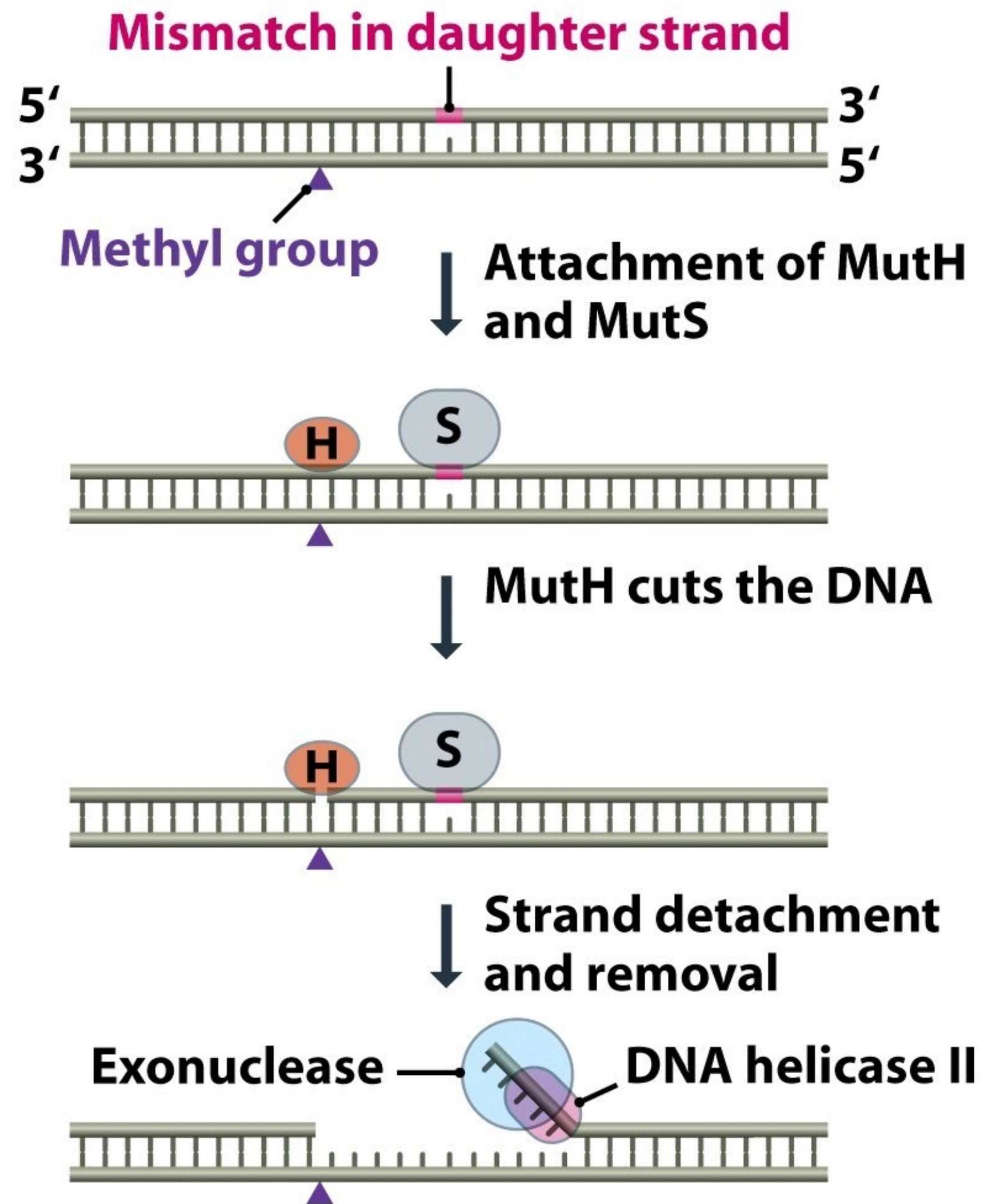


Figure 16-26 part 1 of 2 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

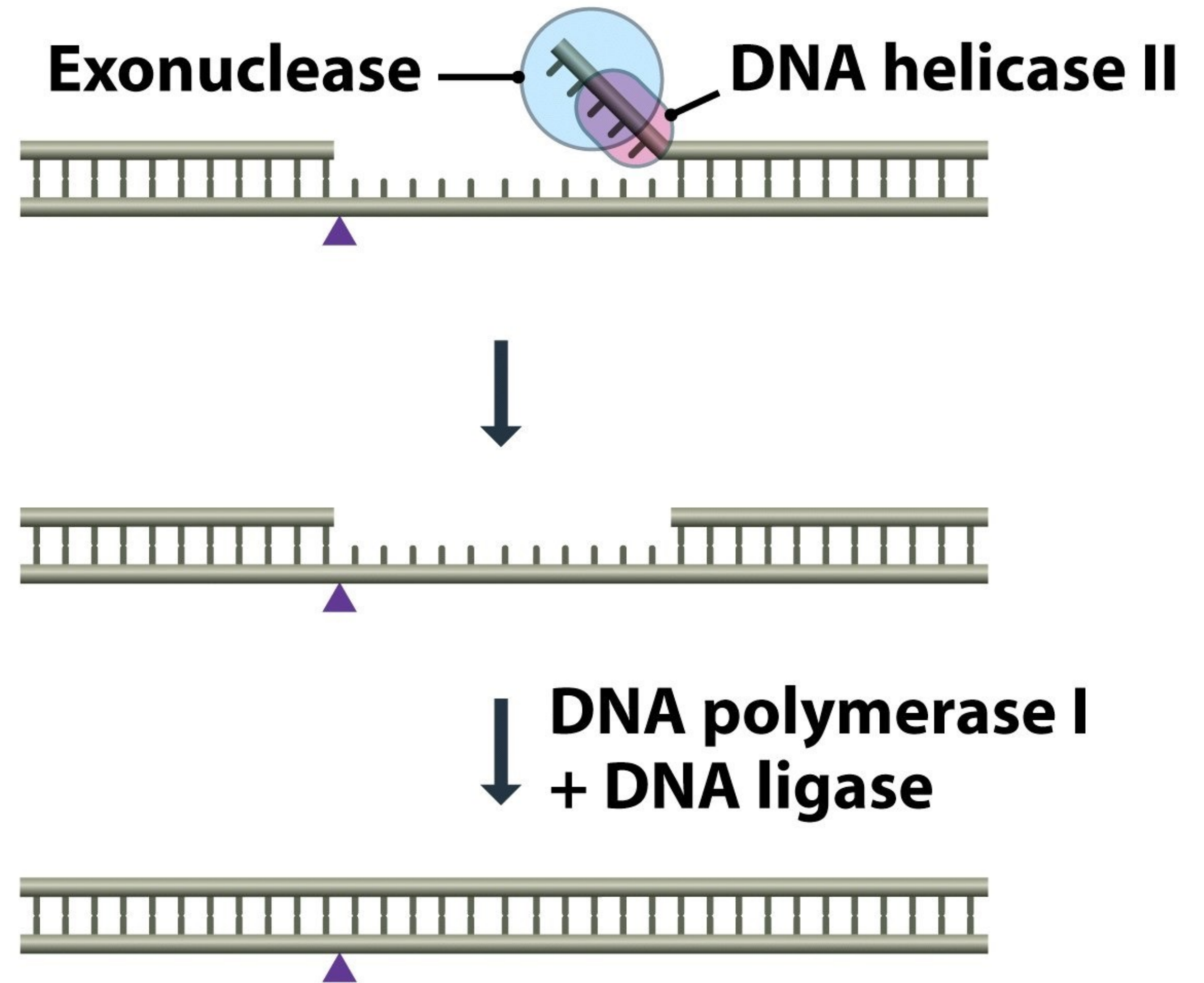
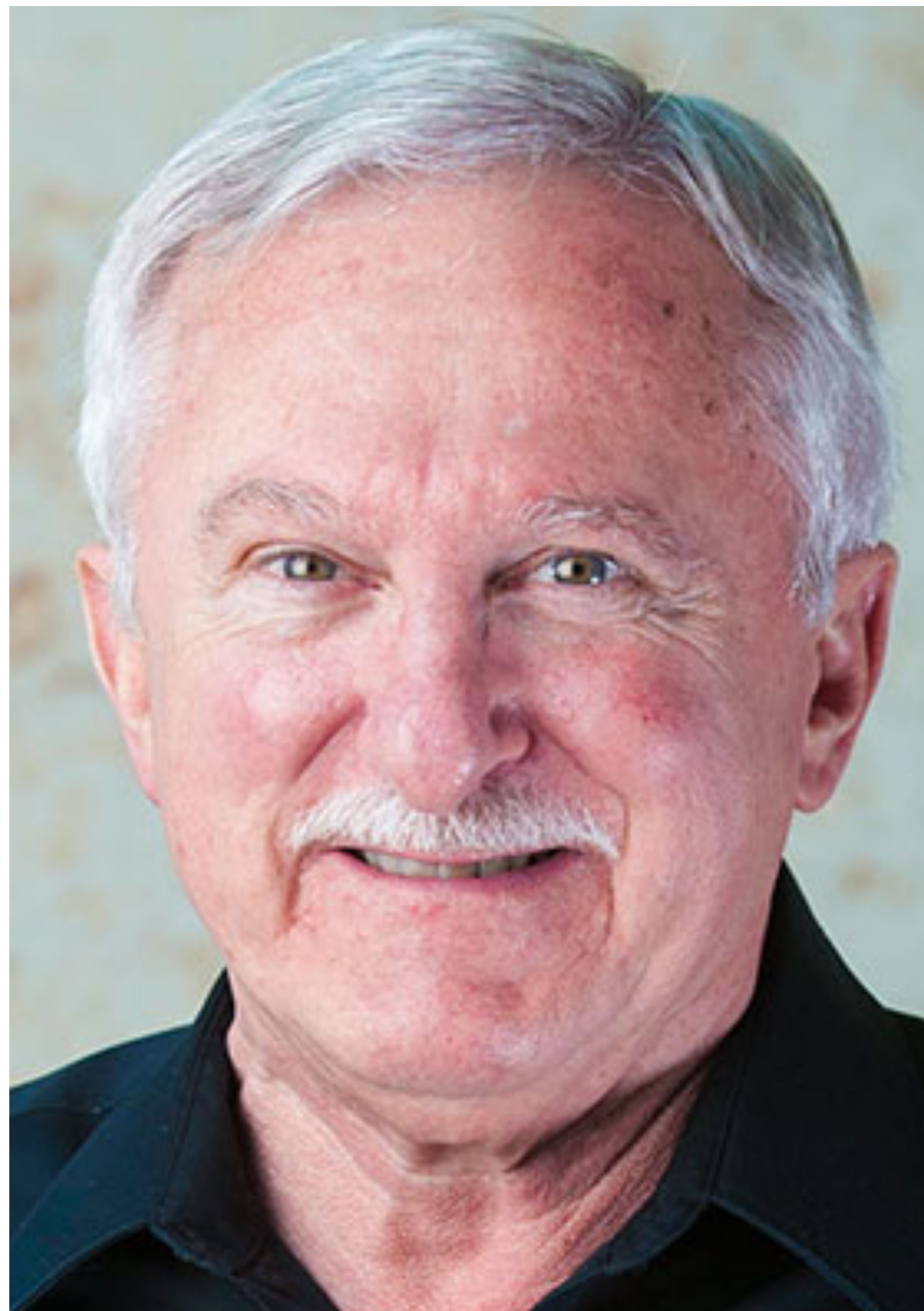


Figure 16-26 part 2 of 2 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

## Nobel 2015 (chemia)

---

- Paul Modrich, za opisanie mechanizmu MMR



# Naprawa pęknięć DNA

---

- Pęknięcia w jednej nici są łatwe do naprawienia: polimeraza + ligaza. Białka PARP chronią jednoniciowe fragmenty przed dalszą degradacją
- Pęknięcia dwuniciowe są trudniejsze do naprawienia
  - Powstają np. w wyniku działania promieniowania jonizującego
  - Blokują replikację, nienaprawione mogą doprowadzić do utraty dużych fragmentów chromosomu podczas podziału

# Naprawa pęknięć dwuniciowych

---

- DSBR (*double-strand break repair*)
- Dwa mechanizmy:
  - Rekombinacja homologiczna. Główny mechanizm naprawy DSB u bakterii i niższych eukariontów
  - Łączenie końców niehomologicznych. Częste u wielokomórkowych eukariontów, ale spotykane też w innych organizmach

# Łączenie końców niehomologicznych

- Non-homologous end joining (NHEJ)
- Występuje u Eukaryota, uproszczony wariant może też u bakterii
- Może wprowadzić niewielkie indele (insercje/delecje)
- Aktywne przez cały cykl komórkowy

## The nonhomologous end-joining repair process

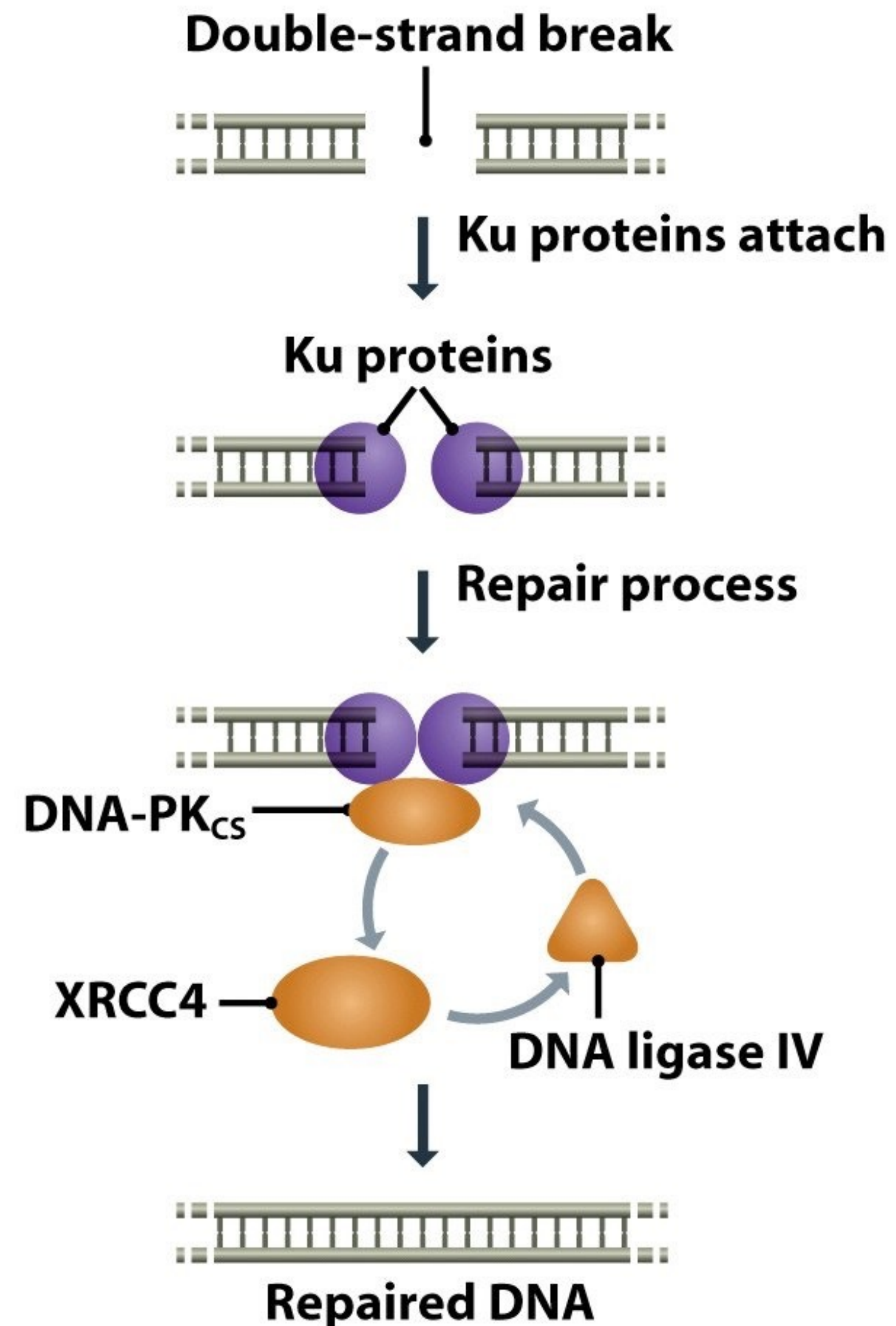


Figure 16-28a Genomes 3 (© Garland Science 2007)