

Spontánní mutace

Četnost: 10^{-5} – 10^{-10}

Příčiny:

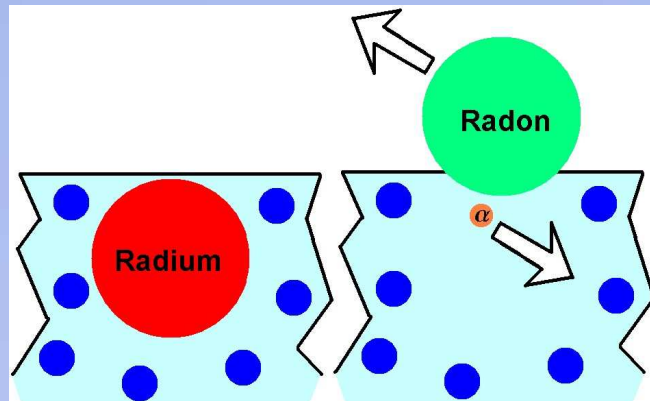
- faktory vnějšího prostředí
- vnitrobuněčné mechanismy



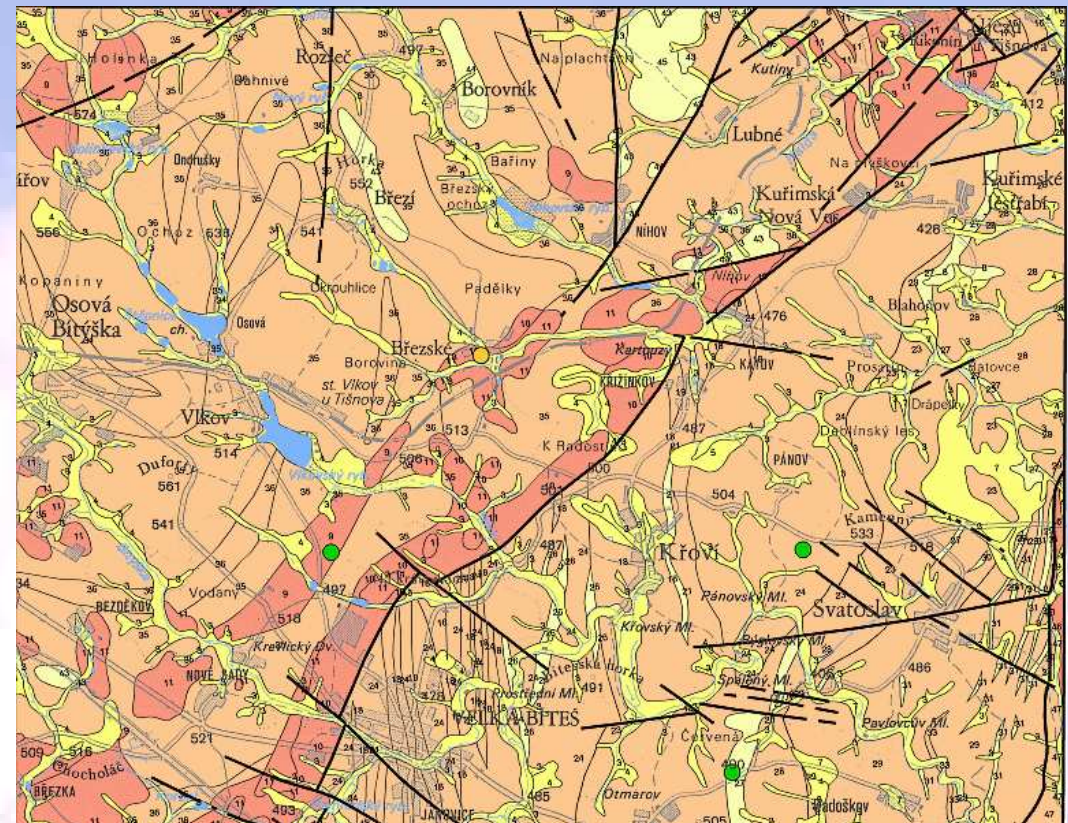
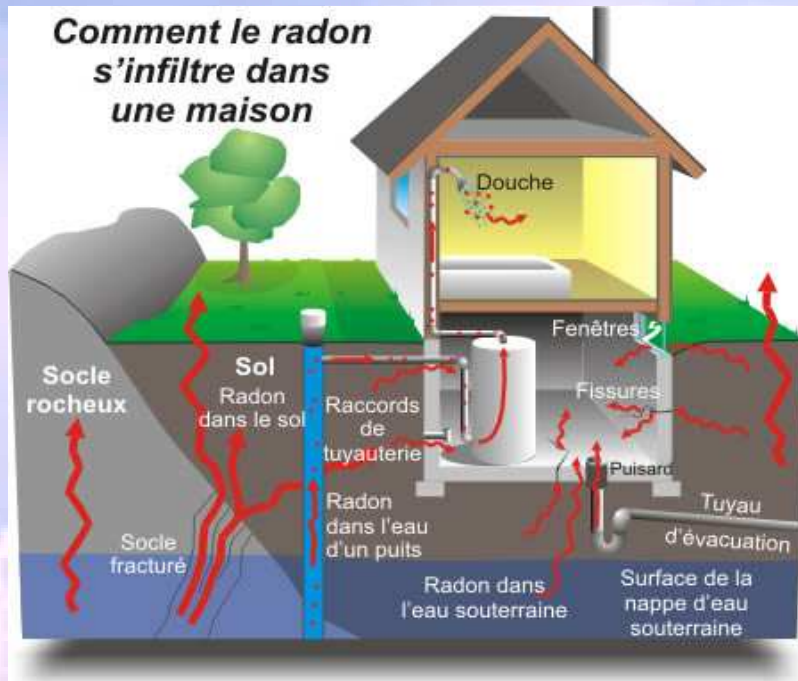
Typy mutací a jejich odhadované frekvence

Typ mutace	Mechanismus	Četnosti
Bodová mutace	<ol style="list-style-type: none"> chyba při replikaci DNA poškození DNA zářením či chemickými mutageny 	$\sim 10^{-10}$ /pár bazí/buň. dělení $\sim 10^{-5}$ /gen/generaci 0,5/buňku
Submikroskopická delece či inserce	<ol style="list-style-type: none"> nerovnoměrný crossing-over vychýlení při replikaci inserce mobilních elementů poškození DNA zářením či chemickými mutageny 	
Mikroskopicky viditelná delece, translokace nebo inverze	<ol style="list-style-type: none"> nerovnoměrný crossing-over poškození DNA zářením či chemickými mutageny 	6×10^{-4}
Ztráta či zisk celého chromozomu	<ol style="list-style-type: none"> chyby při meióze, mitóze 	1 na 100

Přirozené zdroje ionizujícího záření záření hornin



Rozpad: U – Ra – Rn – Po
(vyzáření α částice)



Přirozené zdroje ionizujícího záření

Cosmic Radiation



Cosmic radiation comes from our sun, supernovas, and quasars. Earth's atmosphere is very good at shielding cosmic radiation, but some places on earth receive more radiation than others because the thickness of the atmosphere varies from place to place.



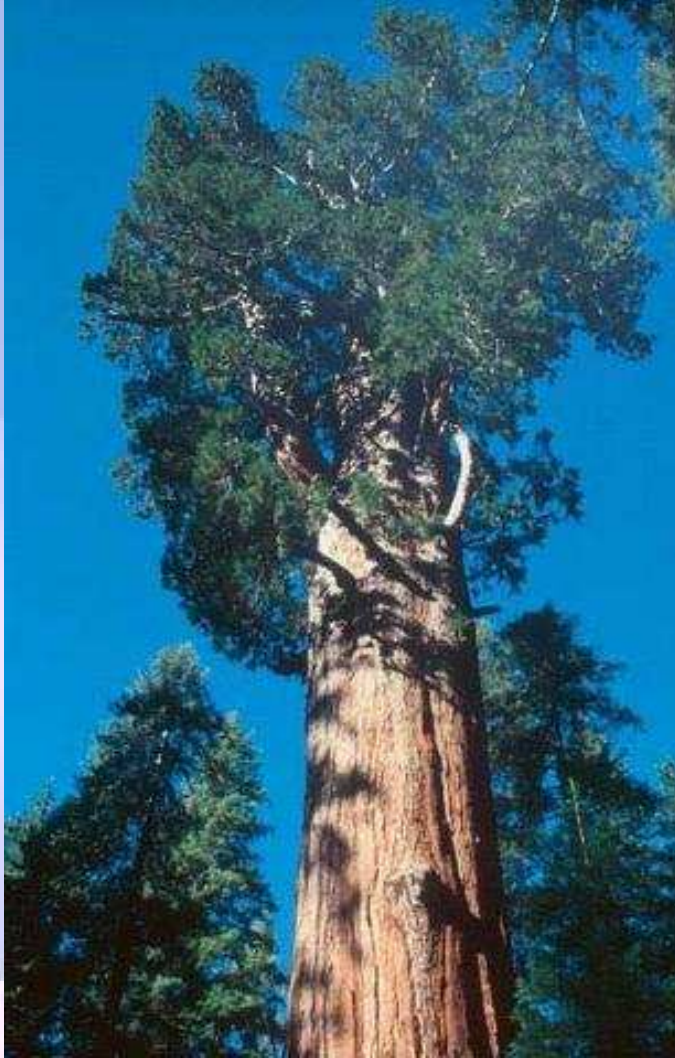
You may also be exposed to cosmic radiation during air travel. Jets that fly above 60,000 feet are required to have a radiation detector in the cockpit to warn the crews of high radiation levels.

To estimate in flight radiation dose, click [here](#).

Table 2
Average Radiation Doses of the Flight
Crews for the Apollo Missions

Apollo Mission	Skin Dose, rads
7	0.16
8	.16
9	.20
10	.48
11	.18
12	.58
13	.24
14	1.14
15	.30
16	.51
17	.55

Spontánní mutace – ionizující záření



- ionizující záření – roční dávka asi 0,0012 – 0,0023 Gy/rok
- člověk – asi 10 % spontánních mutací/život
- sekvoje – celková dávka záření až 2,5 Gy/1000 let

Spontánní mutace – vnitrobuněčné procesy (endogenní mutace)

Příčiny:

- Chyby při replikaci DNA
- Tautomerní přesmyky, kolísavé párování bazí
- Deaminace bazí
- Spontánní poškození DNA (ztráty bazí, metabolismus kyslíku)
- Inkorporace uracilu do DNA během replikace
- Chyby při reparaci DNA
- Chyby při rekombinaci DNA (nerovnoměrný crossingover)
- Inzerce mobilních elementů

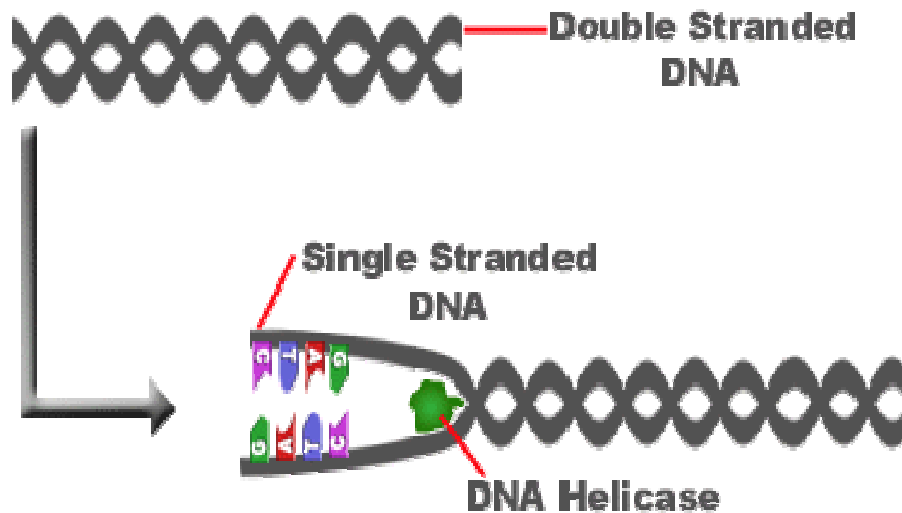
- Chyby při meióze, mitóze

Spontánní mutace jako důsledek chyb při replikaci

- průběhu lidského života dojde průměrně k 10^{17} dělení buněk
- 10^{14} – počet buněk v období dospělosti
- každý cyklus DNA replikace vyžaduje inkorporaci 6×10^9 nových nukleotidů
- chyby při replikaci se vyskytují s frekvencí
- 10^{-9} až 10^{-11} /inkorporovaný nukleotid
- v průměru každý gen (1, 5 kb) může být cílem pro 10^8 až 10^{10} mutací



Spontánní mutace – chyby při replikaci chybné zařazení báze, dislokační mutace



Chyba DNA polymerázy

Četnost chybně zařazené báze:

a) teoreticky: 10^{-1} až 10^{-2}

b) skutečně: 10^{-9} až 10^{-11}

**Oprava chybně zařazených
bází: „proofreading“**

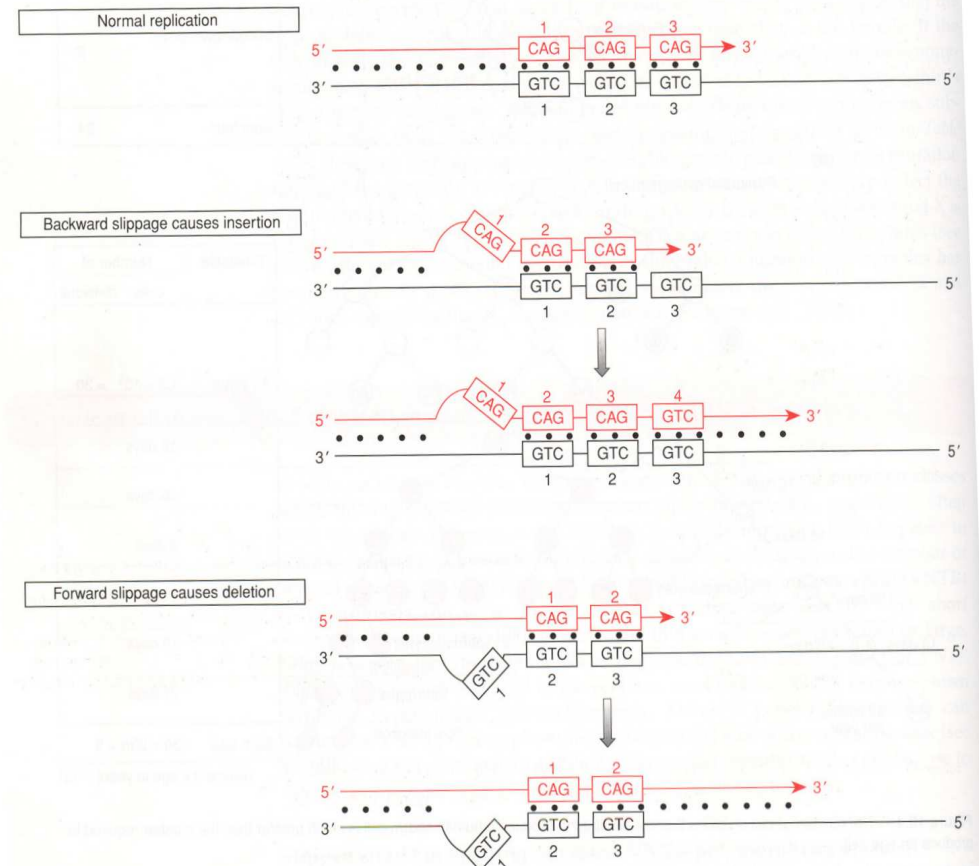


Figure 10.5: Slipped strand mispairing during DNA replication can cause insertions or deletions.

Short tandem repeats are thought to be particularly prone to slipped strand mispairing, i.e. mispairing of the complementary DNA strands of a single DNA double helix. The examples show how slipped strand mispairing can occur during replication, with the lower strand representing a parental DNA strand and the upper strand representing the newly synthesized complementary strand. In such cases, slippage involves a region of nonpairing (shown as a bubble) containing one or more repeats of the newly synthesized strand (backward slippage) or of the parental strand (forward slippage), causing, respectively, an insertion or a deletion on the newly synthesized strand. *Note* that it is conceivable that slipped strand mispairing can also cause insertions/deletions in nonreplicating DNA. In such cases, two regions of nonpairing are required, one containing repeats from one DNA strand and the other containing repeats from the complementary strand (see Levinson and Gutman, 1987).

„Proofreading“

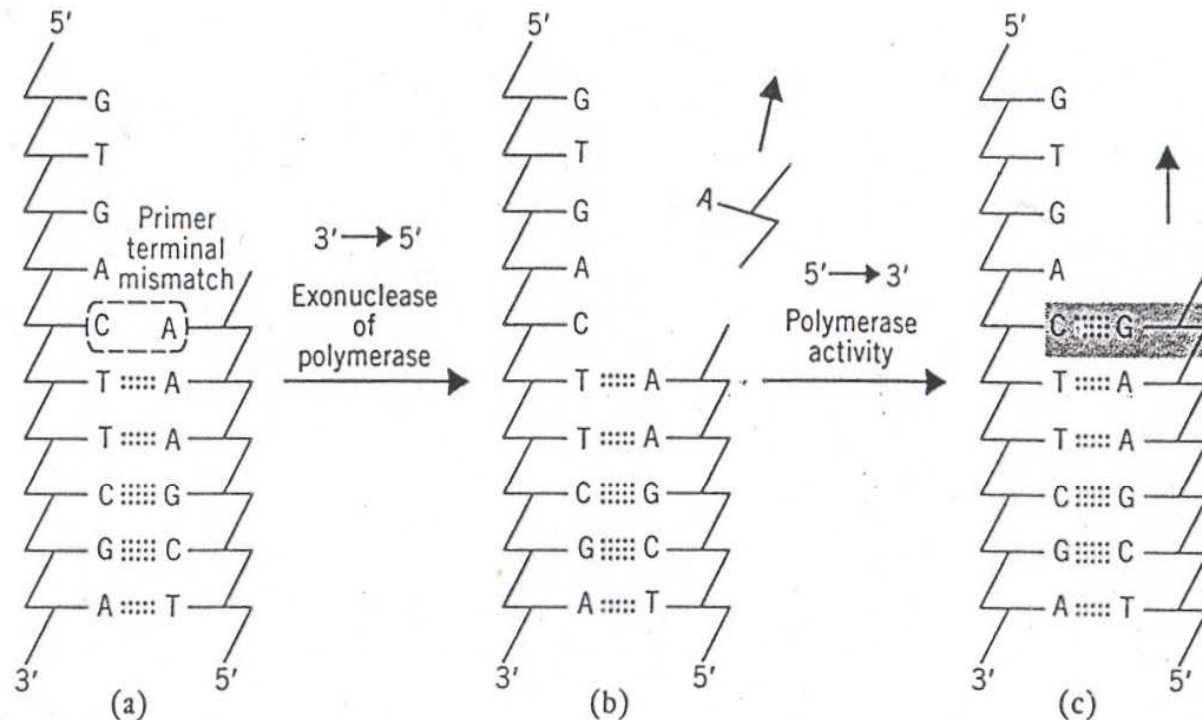


Figure 5.27 “Proofreading” by the 3'→5' exonuclease activity of DNA polymerases during DNA replication. If DNA polymerase is presented with a template and primer containing a 3' primer terminal mismatch (a), it will not catalyze covalent extension (“polymerization”). Instead, the 3'→5'

exonuclease activity, an integral part of many DNA polymerases, will cleave off the terminal mismatched nucleotide (b). Then, presented with a correctly base-paired primer terminus, DNA polymerase will catalyze 5'→3' covalent extension of the primer strand (c).

Mutatorové mutace u bakterií

TABLE 1
GENETIC CONTROL OF SPONTANEOUS MUTAGENESIS IN BACTERIA^a

Mutation or treatment	Defect(s)	Effect on spontaneous mutagenesis	Mutation assay	Reference
<i>Increases (mutator)</i>				
<i>ada ogt</i>	methyl transferases	1-fold (growth) 3-fold (no growth)	<i>his</i> ⁻ → <i>His</i> ⁺	Rebeck and Samson, 1991
<i>dam-4</i>	DNA adenine methylase, mismatch repair	20-fold	<i>lacI</i> → <i>Lac</i> ⁺	Glickman, 1979
<i>dnaE</i> (Ts) <u><i>mutD</i></u> (<i>dnaQ</i>)	DNA polymerase III ε-subunit of Pol III	3–15-fold 12-fold (MM) ^b 4400-fold (RM) ^c 130-fold (MM) 3000-fold (RM)	<i>azaU</i> ^s → <i>azaU</i> ^r <i>Nal</i> ^s → <i>Nal</i> ^r <i>Rif</i> ^s → <i>Rif</i> ^r	Hall and Brammar, 1973 Schaaper, 1988
<u><i>mutH,L,S</i></u>	methyl-directed mismatch repair	260-fold	<i>lacI</i>	Schaaper and Dunn, 1991
<i>mutM</i>	8-oxoguanine DNA glycosylase	14-fold	<i>lacZ</i> → <i>Lac</i> ⁺	Cabrera et al., 1988
<i>mutT</i>	dGTP triphosphatase	~ 160-fold ~ 1090-fold	<i>Nal</i> ^s → <i>Nal</i> ^r <i>Str</i> ^s → <i>Str</i> ^r	Bhatnagar and Bessman, 1988
<i>mutY</i>	adenine glycosylase (Au et al., 1989)	~ 175-fold ~ 23-fold	<i>Lac</i> ⁻ → <i>Lac</i> ⁺ <i>Rif</i> ^s → <i>Rif</i> ^r	Nghiem et al., 1988
<i>ΔoxyR</i>	regulon for oxidative stress defenses	10–55-fold ^d	<i>his</i> ⁻ → <i>His</i> ⁺	Storz et al., 1987
<i>polA1</i> <i>sodA sodB</i> <i>ssb-113</i>	DNA polymerase I superoxide dismutases single-strand binding protein	100-fold 5-fold 10-fold	<i>His</i> ⁺ → <i>his</i> ⁻ <i>Thy</i> ⁺ → <i>Thy</i> ⁻ <i>trp</i> → <i>Trp</i> ⁺ <i>argE</i> → <i>Arg</i> ⁺ <i>trpE9777</i> (fs) → <i>Trp</i> ⁺	Jankovic et al., 1990 Farr et al., 1986 reviewed in Meyer and Laine, 1990
<i>uvrB5</i>	nucleotide excision repair	2-fold 6-fold	<i>lacZ53</i> (UAG) → <i>Lac</i> ⁺	Sargentini and Smith, 1981
<i>ΔuvrD</i> <i>xth nth nfo</i>	helicase II base excision repair, AP sites	100-fold 5-fold	<i>Spc</i> ^s → <i>Spc</i> ^r <i>argE3</i> → <i>Arg</i> ⁺	Washburn and Kushner, 1991 Cunningham et al., 1986
<i>Decreases (antimutator)</i>				
<i>anoxia</i>	oxidative metabolism	~ 2-fold	several assays	R.G. Fowler, 1991, personal communication
<i>auxotrophy</i>	<i>Pur</i> ⁻ <i>Thr</i> ⁻ <i>Ser</i> ⁻	0.3-fold ^d 13-fold 3-fold	<i>his</i> ⁻ → <i>His</i> ⁺ <i>Val</i> ^r	Storz et al., 1987 Quinques and Piechocki, 1985
<i>lexA101</i>	repressor of SOS functions	14-fold 2-fold	<i>lacZ53</i> (UAG) → <i>Lac</i> ⁺	Sargentini and Smith, 1981
<i>umuC36</i>	UV radiation mutagenesis	11-fold ^e	<i>lacZ53</i> (UAG) → <i>Lac</i> ⁺	Sargentini and Smith, 1981
<i>uvrD3</i>	helicase II	6-fold ^e	<i>lacZ53</i> (UAG) → <i>Lac</i> ⁺	Sargentini and Smith, 1981
<i>recA56</i>	recombination, SOS response	2-fold 16-fold ^e 25-fold	<i>lacZ53</i> (UAG) → <i>Lac</i> ⁺ <i>lac</i> ⁻ → <i>Lac</i> ⁺ (long deletion)	Sargentini and Smith, 1981 Albertini et al., 1982

Tautomerní přesmyky

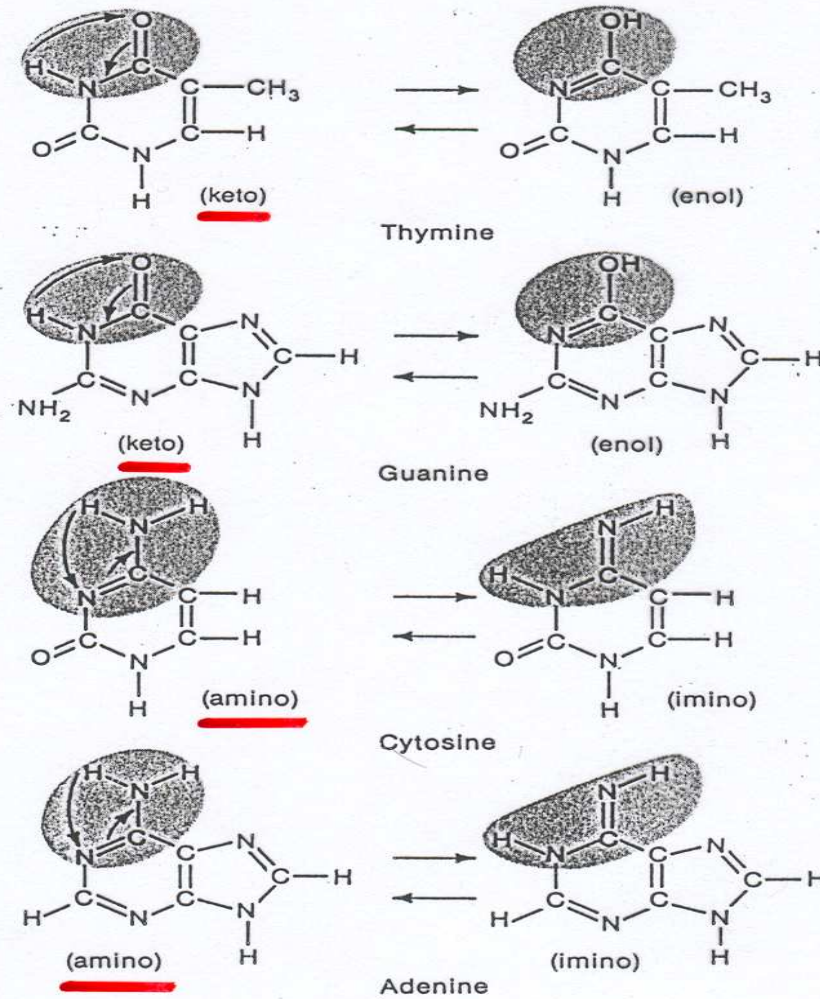
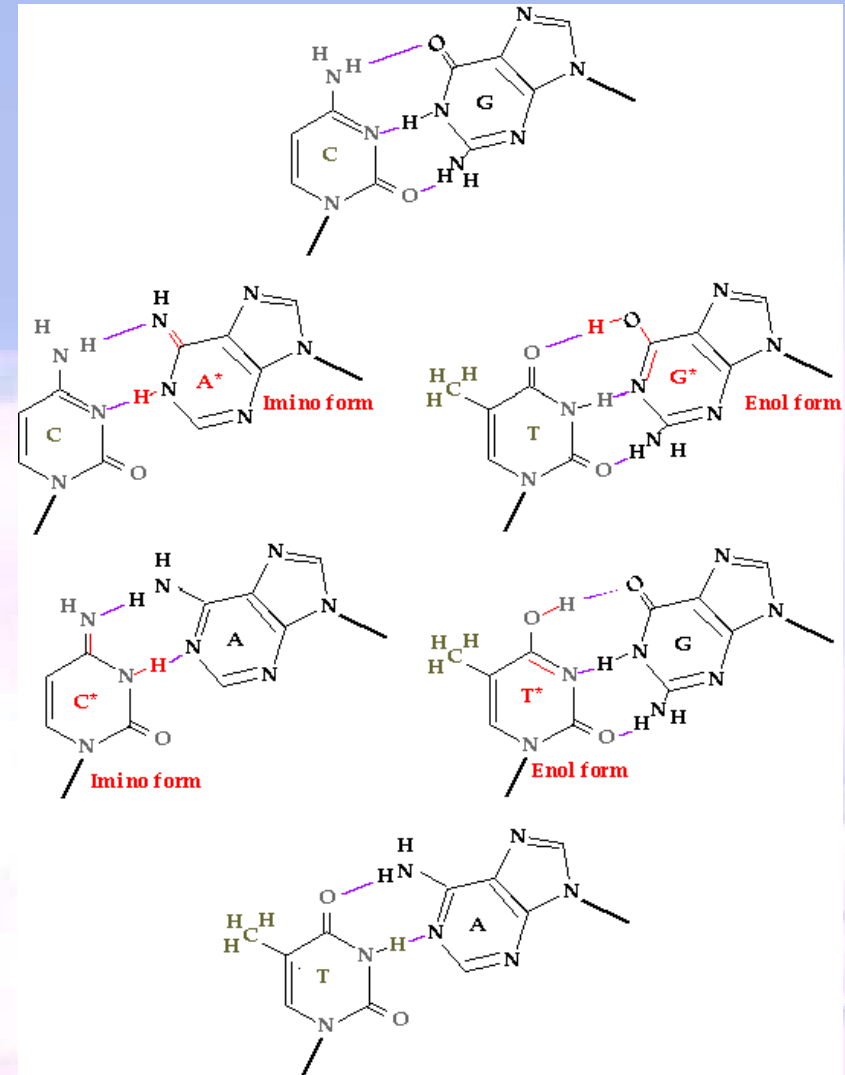
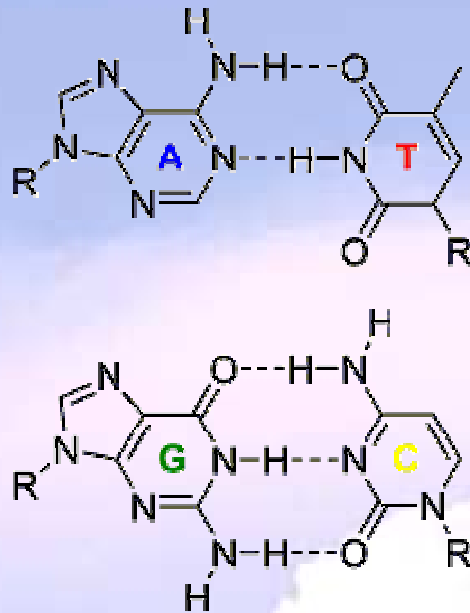


FIGURE 13.7
Rare tautomeric shifts which occur in the chemical structure of the four nitrogenous bases of DNA.

Spontánní mutace – tautomerní přesmyky změna párování bazí

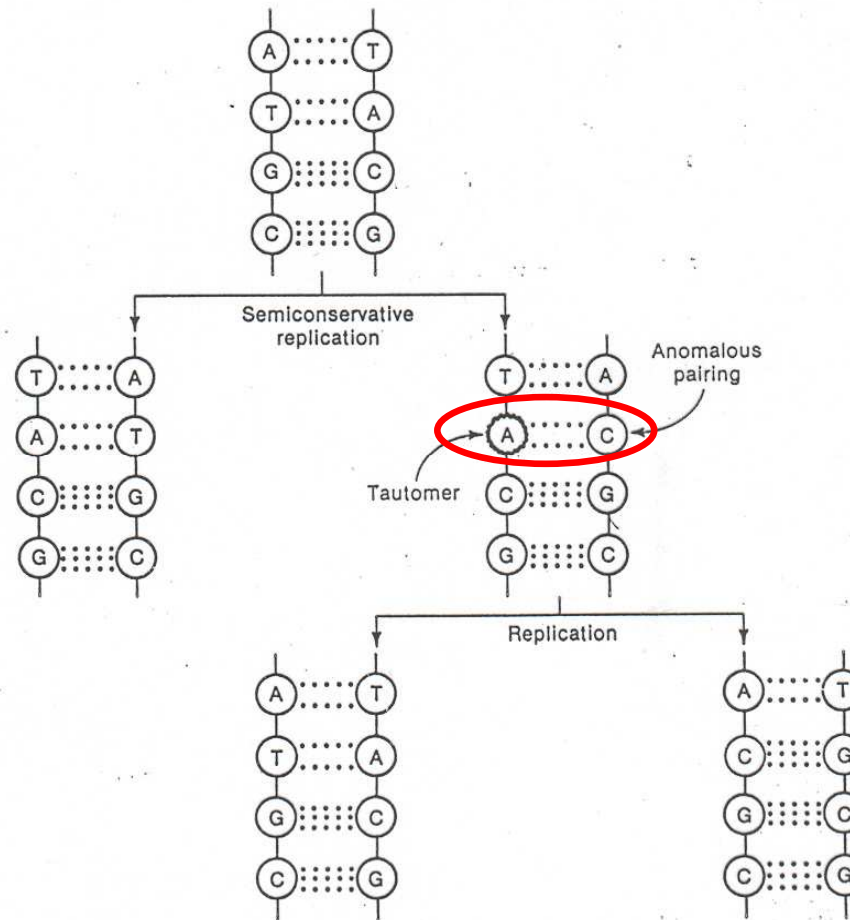


Četnost: 10^{-9} – 10^{-10} / nukleotid a
replikační cyklus

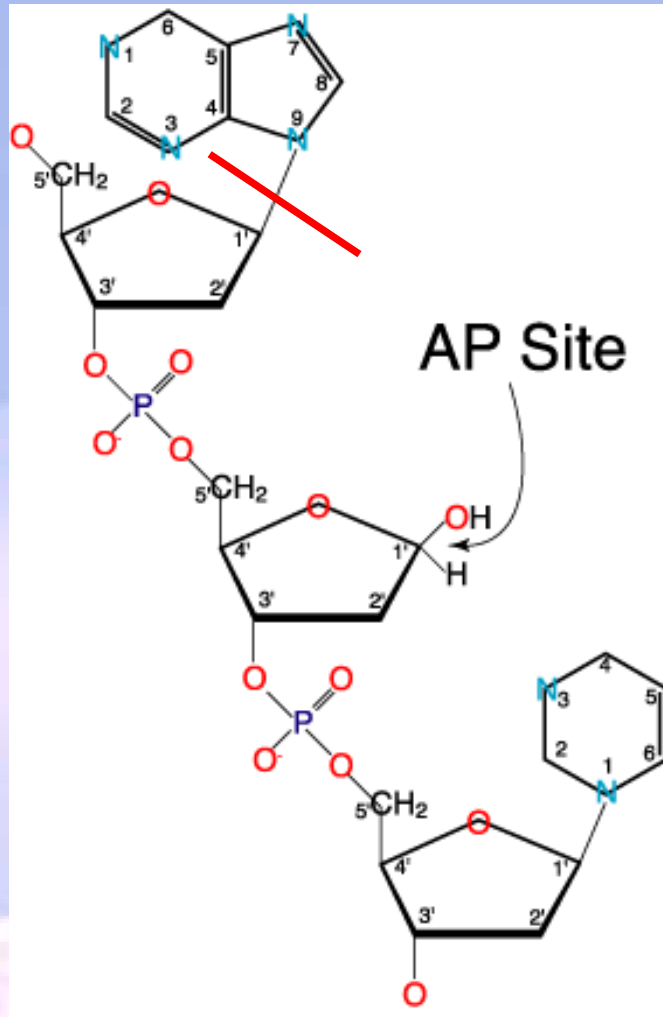
Změna párů bazí v důsledku tautomerního přesmyku

270 PART 3 | GENETIC VARIATION

FIGURE 13.9
Formation of an A-T to a G-C base pair transition as a result of a tautomeric shift in A during replication and subsequent anomalous base pairing.



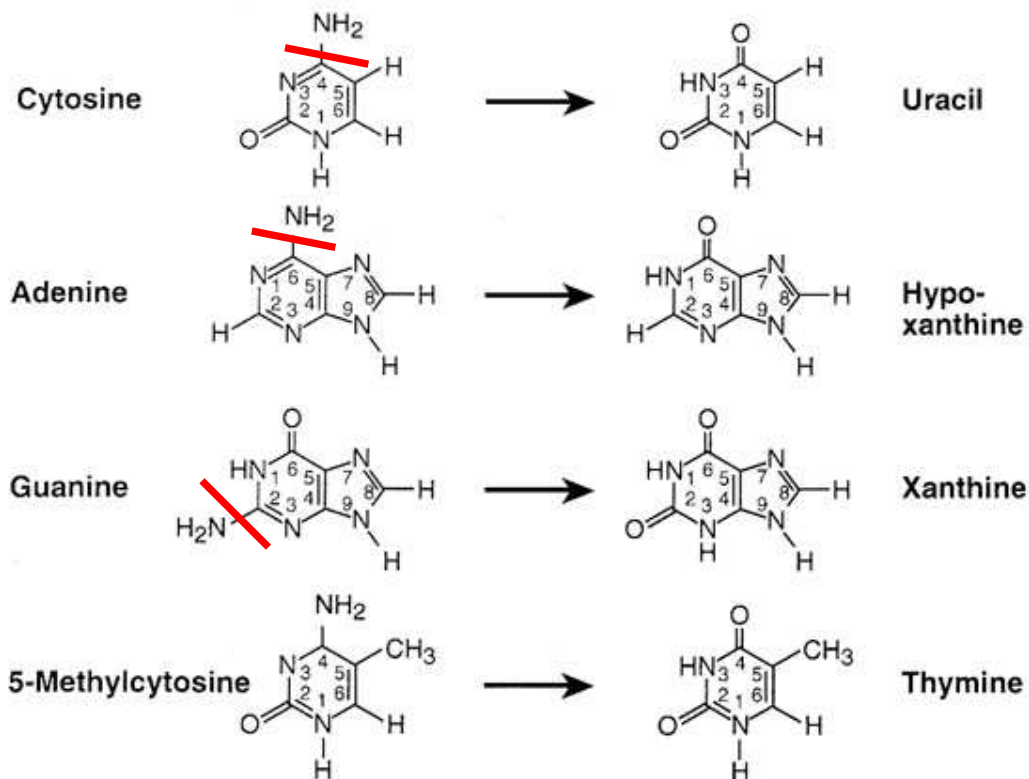
Spontánní mutace - důsledek ztráty bází - vznik AP míst



- ztráty bází – depyrimidinace, depurinace
- spontánně, silné kyseliny, vysoká teplota
- depurinace častější – 1000/hod/na molekulu DNA
- AP místa – preferenčně zaplňována adeninem – záměna bází GC na AT

Spontánní mutace – důsledky deaminace změna párování bází

Mispaired DNA: deamination



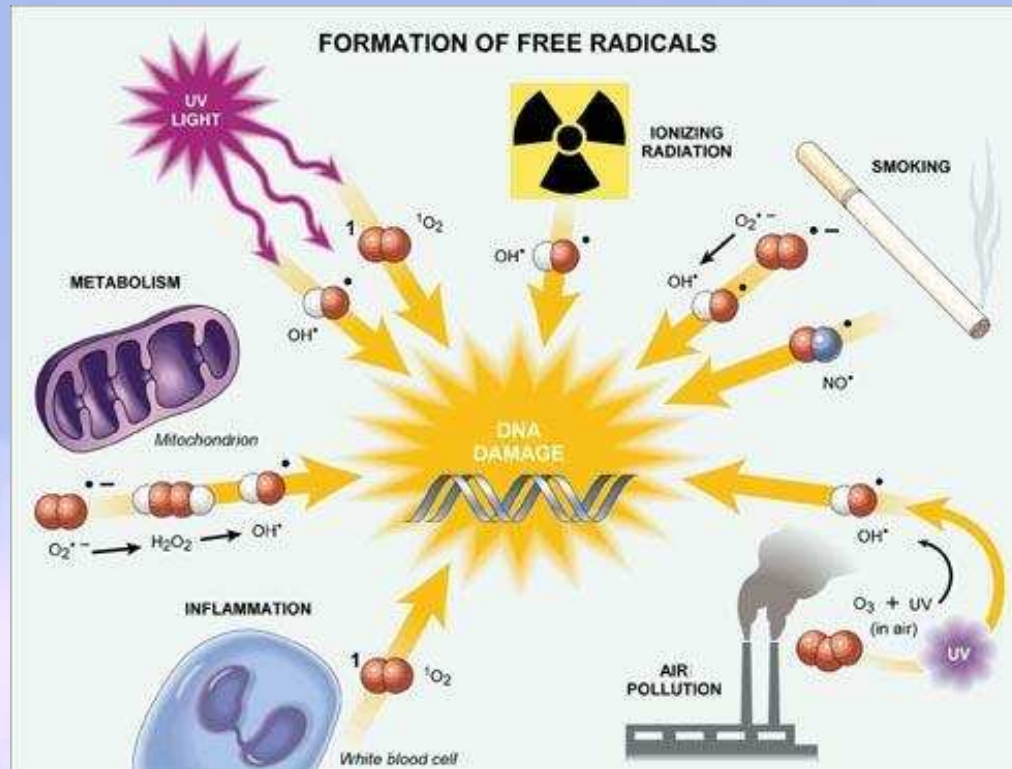
U – A (GC na AT)

HX – C (AT na GC)

X - 0

T - A

Spontánní mutace – působení volných kyslíkových radikálů (OFR)



Modifikace DNA OFR

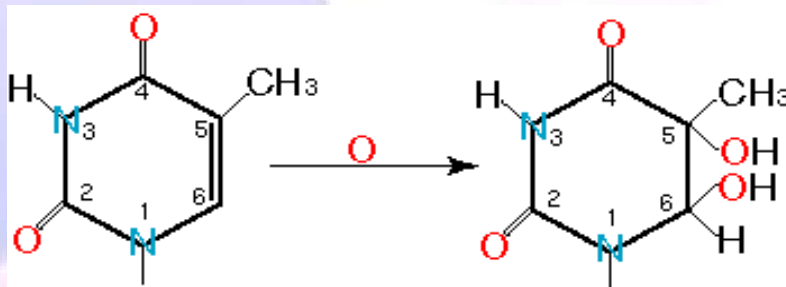
Oxidativní poškození – nejvíce ·OH radikál

Existuje asi 100 různých reakčních produktů s DNA



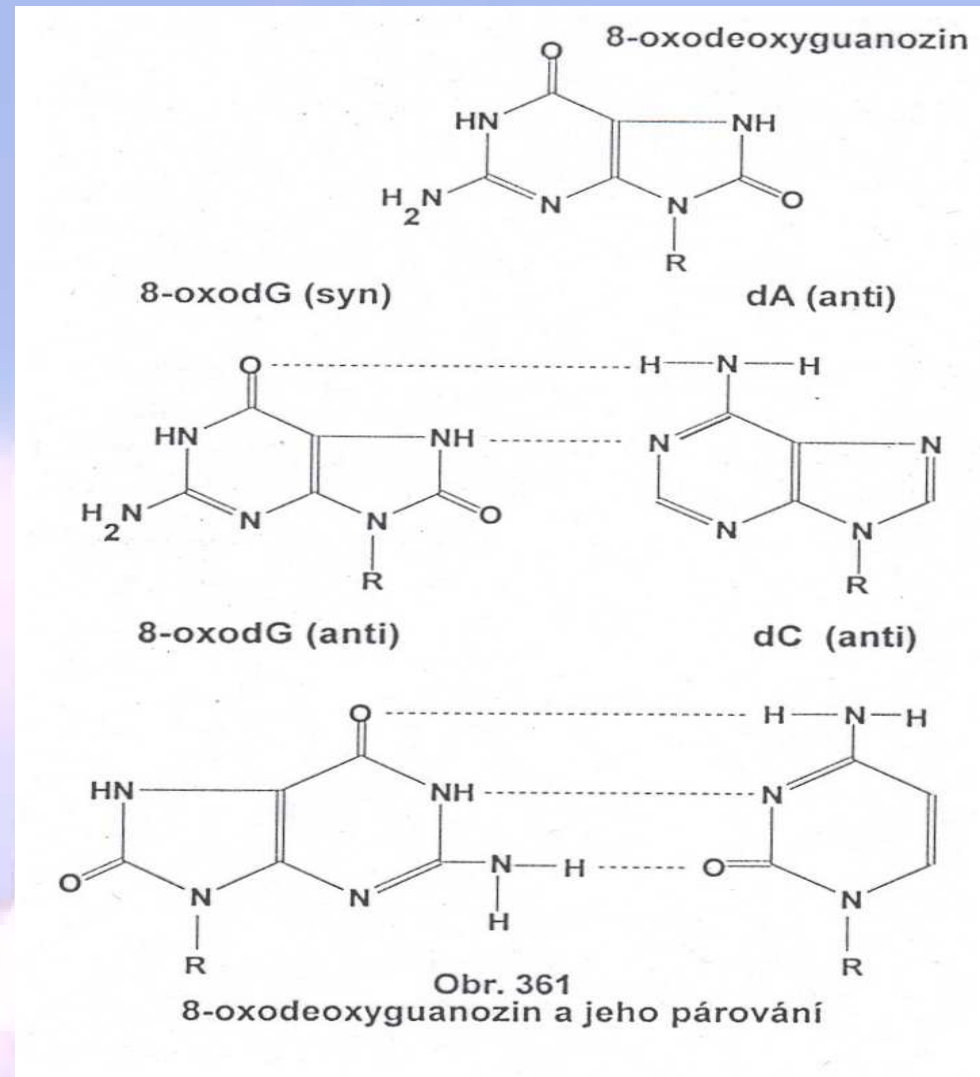
8-oxodeoxyguanozin – změna párování bazí

8-OxodG C, A



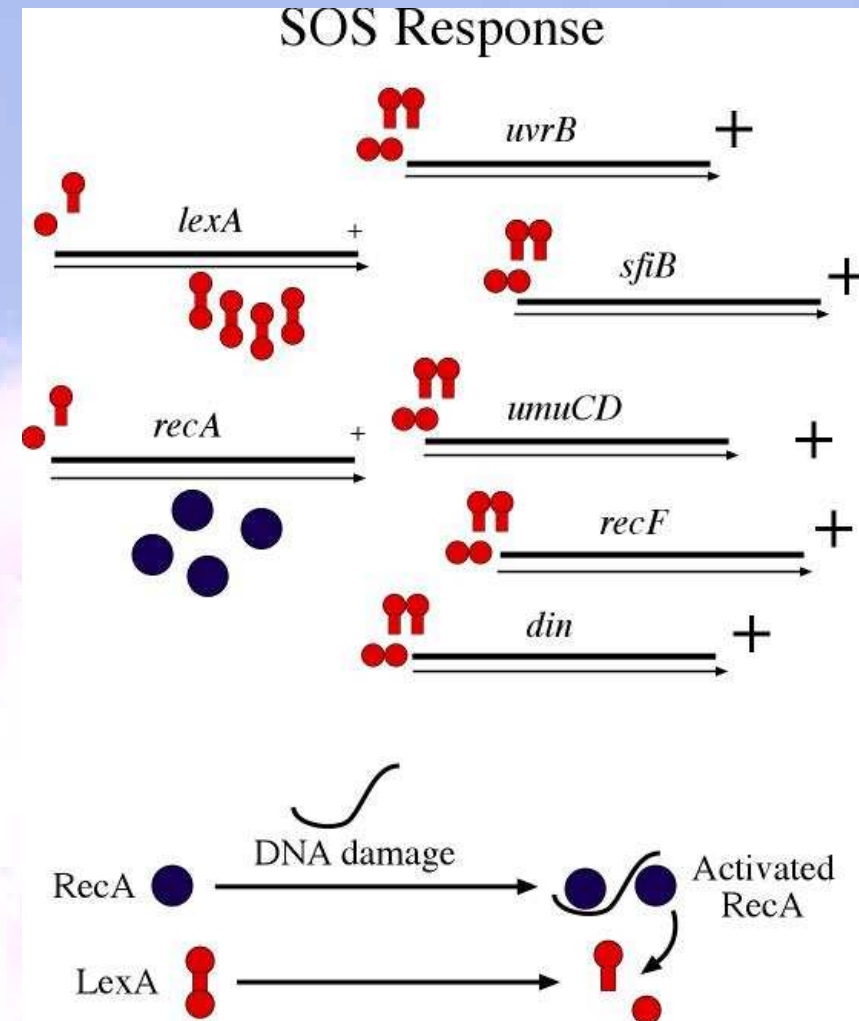
tyminové glykoly

8-oxodeoxyguanozin

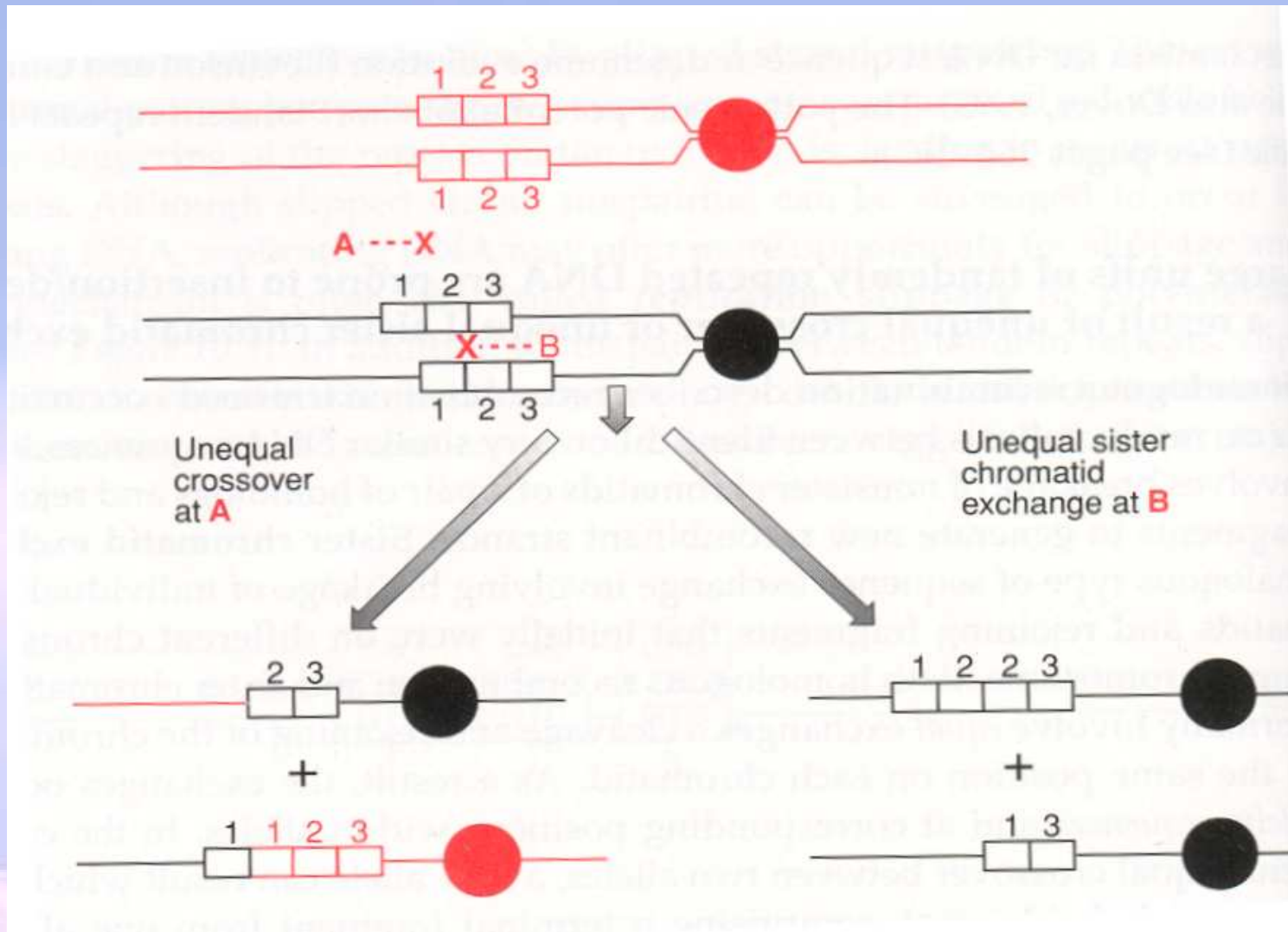


Spontánní mutace – reparační chyby

- Error-free reparace (bezchybná reparace)
- Error-prone reparace (nepřesná reparace)
- SOS reparace



Spontánní mutace – rekombinační chyby



Vznikají mutace nezávisle na vnějším prostředí ???

Otázka, zda nové dědičné vlastnosti organismů vznikají spontánně a nezávisle na působení vnějších podmínek a vhodně pozměnění jedinci jsou pouze selektováni, anebo zda je vznik těchto vlastností působením vnějšího prostředí indukován, patří k nejzávažnějším otázkám biologie

1937 – 1950: syntetická teorie evoluce –
předpoklad náhodného vzniku mutací

Praktické ověření: Luria a Delbruck (1943)
a) fluktuační test

Lederberg a Lederberg (1952)
b) razítkovací metoda



Fluktuační test

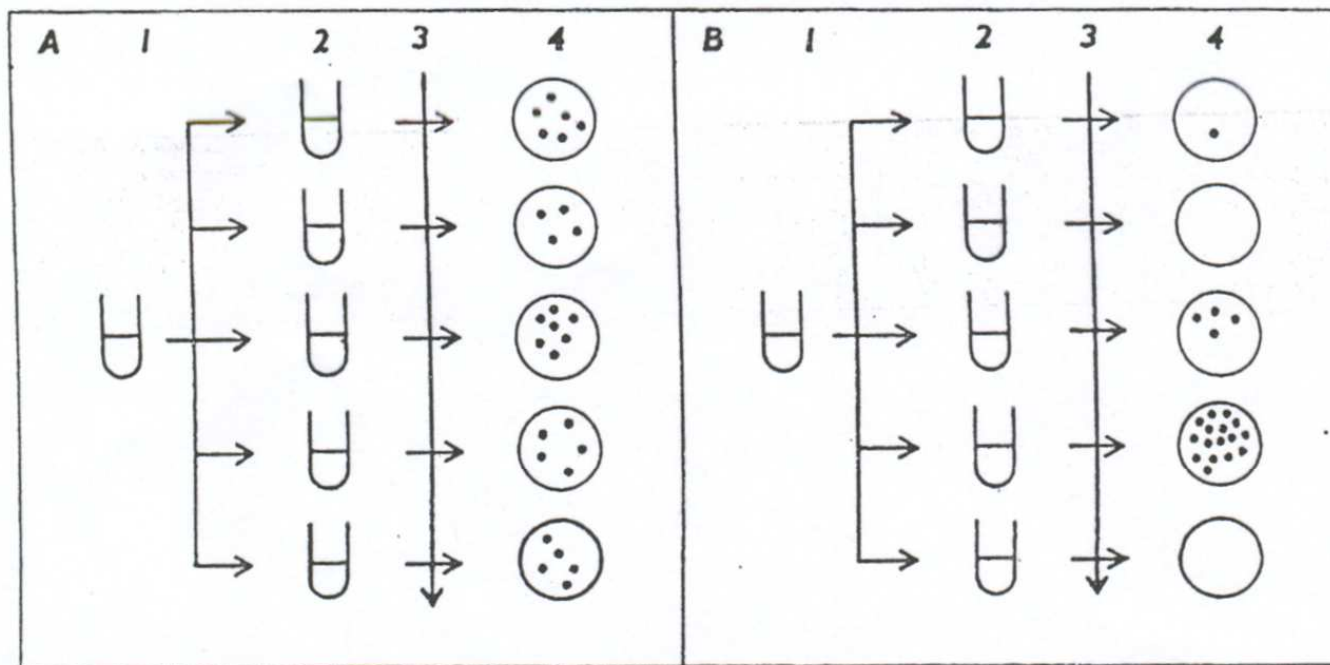
Rezistence bakterií E.coli vůči fágu T1

Mutační hypotéza – každá buňka může s určitou malou pravděpodobností získat během jednoho buněčného cyklu **rezistenci vůči fágu**, a to **nezávisle** na jeho přítomnosti

- Množství rezistentů v kultuře po selekci je závislé nejen na počtu bakterií a pravděpodobnosti vzniku mutace za generační dobu, ale i **na počtu dělení**, která proběhla během kultivace až do aplikace selekčního tlaku
- **Adaptační hypotéza** – každá buňka může s určitou malou konstantní pravděpodobností získat rezistenci **jako odpověď na vystavení účinku fágu**. Počet rezistentů je v tomto případě závislé na počtu bakterií a pravděpodobnosti vzniku mutace v důsledku působení bakteriofága
- **Fluktuační test** – vychází z použití velkého počtu malých vzorků kultury
 - u **MH** – lze očekávat **velké fluktuace** v počtu rezistentů ve vzorcích (záleží na tom, kdy před přidáním fága došlo k mutaci)
 - u **AH** – **malé fluktuace** v počtu rezistentů ve vzorcích – poissonovská distribuce



Fluktuační test



Obr. 1. Schema fluktuačního testu,

A. výsledek předpokládaný adaptační hypotézou,

B. výsledek očekávaný mutační hypotézou,

1. inokulum, 2. odebrané alikvoty, 3. přidání fága, 4. výsev na plotny.

Razítkovací metoda

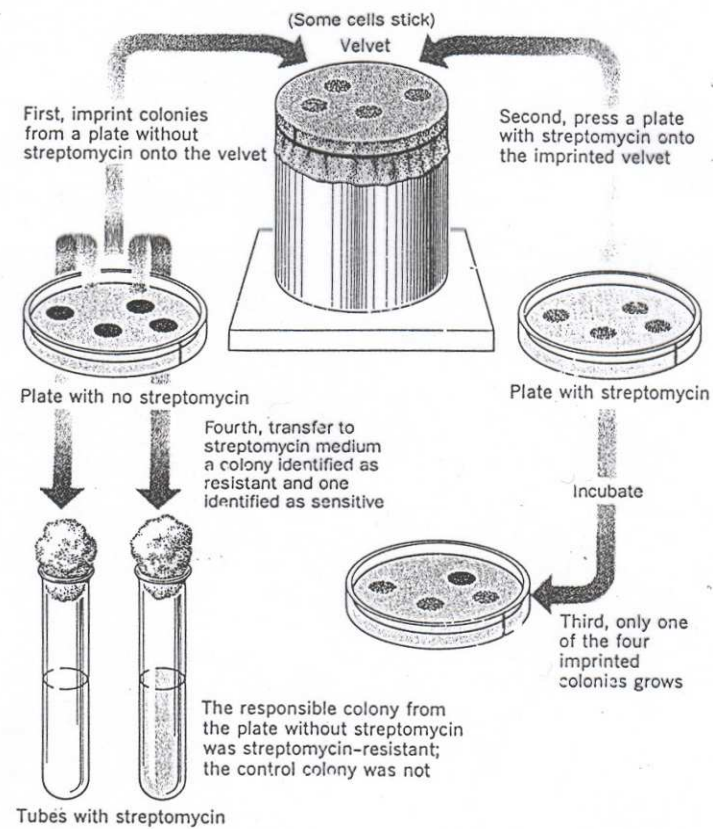


Figure 11.1 Diagram illustrating the use of the replica-plating technique to demonstrate the random or nondirected nature of mutation. For simplicity, only four colonies are shown on each plate, and only two are tested for streptomycin resistance in step 4. Actually, each plate will contain 50–100 colonies, and a large number of plates may be used to find one mutant colony. Also, many colonies are tested in

step 4. The definitive result is that all the colonies from the nonselective plates that give rise to colonies on the selective plates are found to contain streptomycin-resistant mutants, and all the colonies on the nonselective plates that do not grow on the selective plates contain only streptomycin-sensitive cells. (After R. Sager and F. J. Ryan, *Cell Heredity*, Wiley, New York, 1961.)

Higher mutation rates in males are likely to be related to the greater number of germ cell division

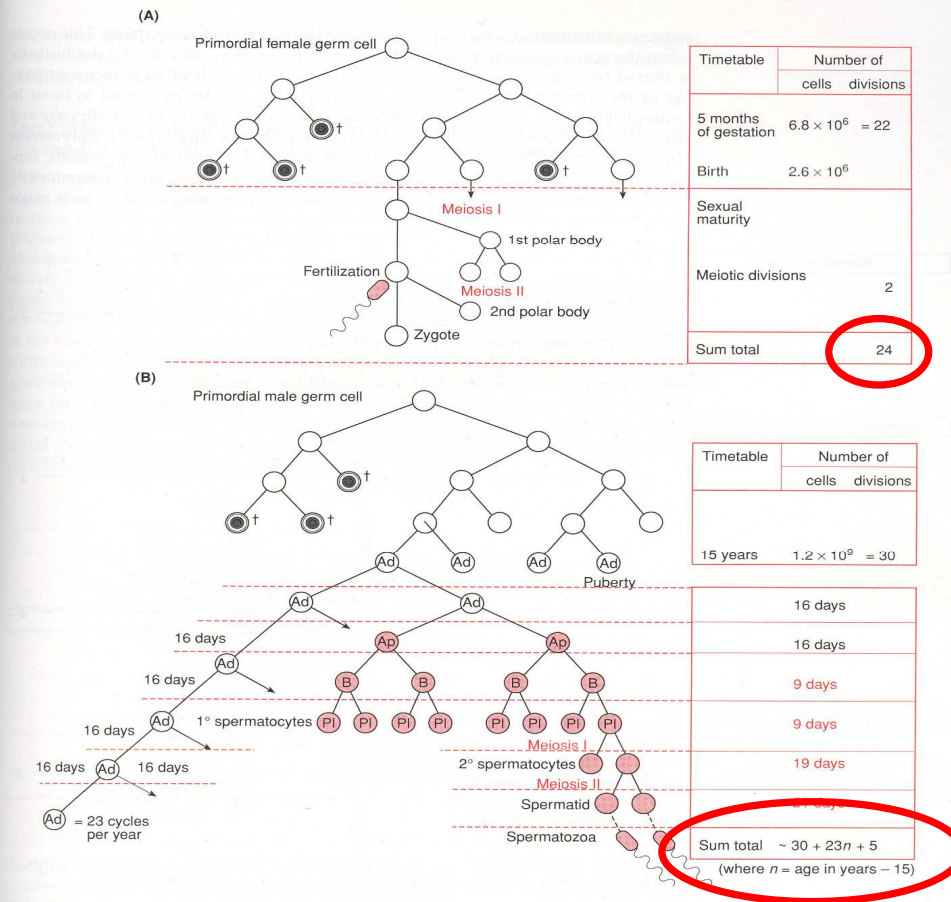


Figure 10.4: The number of cell divisions that are required to produce a human sperm cell is much greater than the number required to produce an egg cell.

(A) Human oogenesis occurs only during fetal life and ceases by the time of birth. The total population of germ cells in the human embryo rises to an estimated maximum of 6.8×10^6 during the fifth month. The expected number of binary divisions required to generate this number would be about 22 ($2^{22} = \sim 4 \times 10^6$). At sexual maturity, two subsequent meiotic divisions are required to produce an egg cell. †Cell atrophy.

(B) Human spermatogenesis continues through adult life. From the early embryonic stage up to the age of puberty, the seminiferous tubules continue to become populated by so-called *Ad spermatogonia* (dark-staining Δ -type spermatogonia) and spermatogenesis is fully established by puberty. The number of *Ad* spermatogonia is estimated to be about 6×10^8 per testis, i.e. a total of about 1.2×10^9 , a value which can be reached by about 30 successive cell divisions. The *Ad* spermatogonia then undergo a series of cell divisions, lasting 16 days. Of the two products of cell division, one prepares for the next division into two *Ad* cells. Because each *Ad* division cycle is 16 days long, following puberty a total of 23 cycles occur each year ($365/16$) – see bottom left. The other product of an *Ad* cell division divides to give two *Ap* (pale-staining Δ -type spermatogonia) cells which are precursors of sperm cells (red cells on bottom right). The *Ap* cells give rise to *B* spermatogonia and then spermatocytes, which finally undergo two meiotic divisions to generate sperm cells. Modified from Vogel and Motulsky (1986) with permission from Springer Verlag.