

INDUKOWANE MUTAGENAMI USZKODZENIA DNA I MECHANIZMY ICH POWSTAWANIA

INDUCED DAMAGES OF DNA BY MUTAGENS AND MECHANISMS OF THEIR FORMATION

Adam MOL, Magdalena STOLAREK

Katedra Genetyki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska,
Uniwersytet Śląski, Katowice

Streszczenie: Genomy wszystkich organizmów są bardzo stabilne. DNA jest powielany podczas fazy S cyklu komórkowego i przekazywany do potomnych komórek. Jest to ważny proces dla prawidłowego funkcjonowania organizmu i zachowania w niezmienionej formie materiału genetycznego. Nieustanne oddziaływanie różnych czynników endogennych i egzogennych na organizm prowadzi do powstawania różnego rodzaju uszkodzeń DNA. Reaktywne metabolity powstające w komórkach oraz nieprawidłowości w replikacji i rekombinacji DNA należą do czynników endogennych powodujących powstawanie spontanicznych zmian w DNA. Natomiast egzogennymi mutagenami mogą być czynniki chemiczne, m.in.: analogi zasad, związki alkilujące i aromatyczne oraz czynniki fizyczne, takie jak: światło UV, czy promieniowanie jonizujące. Do uszkodzeń wywoływanych przez te czynniki należy m.in. modyfikacja zasad azotowych, np. alkilacja i oksydacja, utrata zasady azotowej, tworzenie się dimerów cyklobutyłowych, powstawanie uszkodzeń 6–4 pęknięć nici DNA oraz tworzenie się wiązań wewnątrz i między niemi DNA. Uszkodzenia te mogą wywoływać genotoksyczny lub cytotoksyczny efekt w komórkach organizmu. Powstałe mutacje mają neutralny lub szkodliwy efekt na organizm, jednak mogą mieć one także pozytywny wpływ na rozwój organizmu. W takim przypadku mutant może wykazywać lepsze przystosowanie do niekorzystnych warunków środowiskowych i zwiększoną żywotność w porównaniu z formą wyjściową. W mutageniezie wykorzystuje się różne czynniki chemiczne i fizyczne do zwiększania częstotliwości występowania mutacji zarówno dla celów poznawczych, jak i hodowli roślin.

Słowa kluczowe: uszkodzenia DNA, mutageny chemiczne, mutageny fizyczne, mutacje indukowane, mutageneza.

Summary: The genomes of all living organisms are extremely stable. DNA in the cell is replicated during cell division and passes all the genetic information to the next generation. It is essential for all living organisms to ensure proper functioning and propagation of their genetic information. Due to constant exposure of the genome to various endogenous and exogenous agents, however, the DNA becomes damaged leading to a large variety of DNA lesions. The endogenously generated damage of DNA is known as spontaneous DNA damage, which is produced by reactive metabolites and defects in normal processes of DNA replication or recombination. The exogenous DNA-damaging agents include chemical mutagens, for example base analogs, alkylating agents and aromatic compounds, and physical mutagens: UV light,

ionizing radiation and high temperature. The DNA lesions produced by these damaging agents could result in a base modification, such as alkylation and oxidation, base deletion, cyclobutane dimers, 6–4 photo-products, strand breaks, intra- and interstrand cross-links. Those damages of DNA have genotoxic or cytotoxic impact to the cell. Although most mutations are either neutral or harmful, some mutations have a positive effect on an organism. In this case, the mutation may enable the mutant organism to withstand particular environmental stresses better than wild-type organisms, or to reproduce more quickly. Mutagenesis is used to induce mutations at high frequency that include ionizing radiation and chemical mutagens for basic plant research and plant breeding.

Keywords: DNA damage, chemical mutagens, physical mutagens, induced mutations, mutagenesis.

1. WSTĘP

Informacja genetyczna, zakodowana jest w postaci ściśle określonej sekwencji nukleotydów w DNA. Organizmy mają zdolność do powielania i przekazywania jej następnym pokoleniom w niezmienionej formie. Utrzymanie integralności genomu i prawidłowości replikacji DNA, ma istotne znaczenie dla funkcjonowania i przeżycia organizmu. Nieprawidłowe powielanie DNA może prowadzić do powstania zmian w sekwencji nukleotydów wpływając na zmianę kodowanego białka i w konsekwencji, może mieć szkodliwy, neutralny lub pozytywny wpływ na organizm. Materiał genetyczny jest wystawiony na działanie różnego rodzaju czynniki uszkadzające jego strukturę. Powstające nieprawidłowości w genomie powinny być rozpoznawane i likwidowane przez systemy naprawcze DNA (*DNA repair pathways*) [42]. Zaburzenie w działaniu systemów reperacji DNA, może skutkować zahamowaniem replikacji, transkrypcji DNA oraz powstaniem mutacji. Mutacje to nagle zmiany w materiale genetycznym, mające charakter losowy, które mogą się dziedziczyć i nie są skutkiem procesów rekombinacyjnych [24]. Mutacje mogą powstawać spontanicznie oraz w sposób indukowany, w wyniku działania mutagenów chemicznych lub fizycznych, reagujących z DNA, przyczyniając się do zwiększenia różnorodności genetycznej organizmów. W przyrodzie nie występują bezwzględnie wierne mechanizmy replikacji DNA oraz środowisko całkowicie odizolowane od wszelkich możliwych mutagenów, co powoduje nieustanną ekspozycję materiału genetycznego na uszkodzenia DNA.

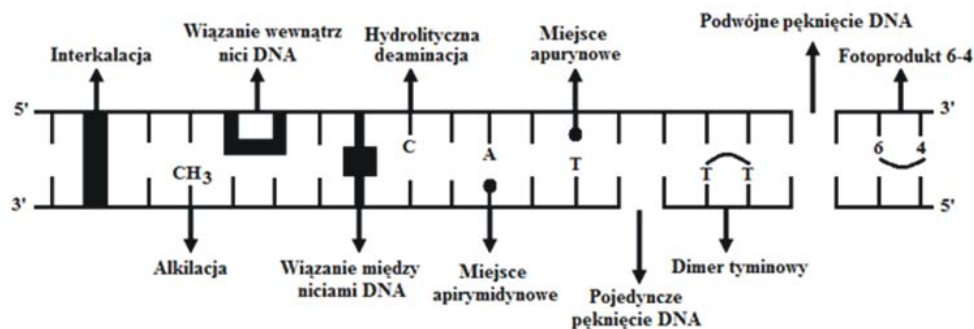
2. USZKODZENIA DNA

Uszkodzenia DNA są indukowane przez wiele czynników, które mogą powodować różne typy zmian w DNA. Często ten sam czynnik, może powodować kilka rodzajów uszkodzeń DNA. Czynniki indukujące uszkodzenia DNA mają zdolność do wywołania trwałego zaburzenia genetycznego i przyczyniają się do zwiększenia częstotliwości występowania zmian w genomie. Każdy organizm jest narażony na uszkodzenia DNA, powstające w wyniku reakcji DNA z endogennymi i egzogennymi czynnikami, powodującymi zmiany w strukturze i właściwościach chemicznych DNA. Uszko-

dzenia DNA mogą powstawać w sposób spontaniczny lub indukowany. Źródłem uszkodzeń spontanicznych mogą być błędy powstałe podczas naturalnych procesów zachodzących w komórkach, to jest replikacji, rekombinacji i naprawy DNA oraz w wyniku działania czynników zewnętrznych występujących w środowisku, np. promieniowania kosmicznego i UV. Jedną z konsekwencji powstawania spontanicznych mutacji jest zmienność kodu genetycznego, przyczyniająca się do ewolucji organizmów. Częstotliwość powstających w ten sposób uszkodzeń DNA jest bardzo niska i można ją zwiększyć przez poddanie organizmu na działanie czynników mutagennych. Mutagen jest to czynnik chemiczny lub fizyczny powodujący zmiany w strukturze genomu, reagujący z nim w sposób bezpośredni lub pośredni. Działanie mutagenne to zdolność czynnika do wywołania trwałego zaburzenia genetycznego – mutacji. Indukowane uszkodzenia DNA są identyczne ze zmianami występującymi spontanicznie. Mogą one powstawać zarówno w przyrodzie, jak i w warunkach laboratoryjnych [10,13,20,24,42].

2.1. Rodzaje uszkodzeń DNA

Uszkodzenia DNA mogą powodować efekt genotoksyczny i cytotoksyczny w komórkach organizmów żywych. Działanie genotoksyczne to zdolność do indukowania zmian w DNA bezpośrednio przez określony związek, albo jego reaktywny metabolit. Działanie genotoksyczne może obejmować zmiany na poziomie pojedynczego genu, chromosomu lub całego genomu. Natomiast apoptoza komórek, spowodowana zaburzeniem lub zahamowaniem procesu replikacji oraz transkrypcji DNA, jest wynikiem efektu cytotoksycznego. Do najczęstszych uszkodzeń DNA spowodowanych przez czynniki mutagenne należą: utrata zasady azotowej, interkalacja czynnika pomiędzy pary zasad, modyfikacja zasad azotowych przez hydrolizę, alkilację oraz oksydację. W wyniku działania czynników mutagennych mogą powstawać wiązania poprzeczne wewnątrz- i między nićmi DNA, fotouszkodzenia, a także jednoniciowe i dwuniciowe przerwania nici DNA (ryc. 1) [18,41,42].



RYCINA 1. Rodzaje uszkodzeń DNA [wg 41, zmodyfikowane]

FIGURE 1. DNA damage induced by different DNA-damaging agents [acc. to 41, changed]

2.1.1. Utrata zasady

Utrata zasady azotowej należy do częstych uszkodzeń DNA na skutek hydrolytycznego zerwania wiązania β -N-glikozydowego pomiędzy deoksyrybozą a zasadą azotową. Miejsca pozbawione zasady azotowej nazywane są miejscami AP (*APyrimidinic/APurinic site*) w zależności od utraconej puryny lub pirymidyny. W komórkach ludzkich dziennie powstaje spontanicznie około 10 000 miejsc AP. Do depurynacji DNA dochodzi dwadzieścia razy częściej niż do depirymidynacji DNA. Miejsca AP powstają najczęściej przez oddziaływanie DNA z wolnymi rodnikami tlenowymi – ROS (*Reactive Oxygen Species*), wytworzonymi m.in. na skutek działania światła UV, związków alkilujących oraz szoku termicznego. W efekcie wystąpienia w łańcuchu DNA miejsc AP mogą powstawać: mutacje punktowe, aberracje chromosomowe, zaburzenia transkrypcji oraz pęknięcia nici DNA [1,4,10].

2.1.2. Interkalacja

Interkalacja jest to wnikanie płaskich cząsteczek, najczęściej o strukturze aromatycznej, między zasady azotowe w łańcuchu DNA, co powoduje zwiększenie odległości między sąsiednimi parami zasad i może powodować nieprawidłowy przebieg procesu replikacji. Interkalacja cząsteczek powoduje wydłużanie struktury, zmniejszenie elastyczności i obniżenie gęstości DNA. Następstwem tych zmian jest rozluźnienie i zniekształcenie struktury DNA. Podczas replikacji DNA może dojść do insercji bądź delecji nukleotydów naprzeciw miejsca zajmowanego przez związek interkalujący. Związki interkalujące mogą także przyczynić się do powstania wiązań poprzecznych między niemi DNA, prowadząc do zaburzenia procesu replikacji i transkrypcji. Głównym miejscem oddziaływania związków interkalujących z DNA, są sekwencje 5'-GC-3', 5'-CG-3'. Czynnikiem interkalującymi są m.in.: wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne i heterocykliczne aminy, bromek etydyny, barwniki akrydynowe, leki przeciwnowotworowe należące do antracyklin oraz lek na bielactwo nabyte – psoralen [5,14,15,27,34,49].

2.1.3. Modyfikacja zasad azotowych

Do tworzenia komplementarnych par między zasadami azotowymi w DNA niezbędna jest ich prawidłowa struktura chemiczna i przestrzenna. Każda modyfikacja grup chemicznych wchodzących w skład zasad azotowych może powodować błędne wiązanie się zasad i w konsekwencji prowadzić do powstania uszkodzeń DNA. Większość endogennych substancji oraz mutagenów oddziałuje na DNA poprzez modyfikację zasad azotowych. Każda zasada ma centrum czy też centra nukleofilowe szczególnie narażone na atak związków elektrofilowych. Centra nukleofilowe stanowią obszary bogate w elektrony w cząsteczkach nukleofilowych, natomiast elektrofile są związkami, w których występuje deficyt elektronowy i które reagują z nukleofilami. Do najczęściej obserwowanych reakcji z zasadami należy alkilacja, oksydacja oraz hydroliza [46,50].

Alkilacja to przeniesienie grupy alkilowej, np. grupy etylowej lub metylowej, z jednego związku chemicznego na drugi. Efekt alkilacji zależy od rodzaju dodanej

grupy alkilowej oraz miejsca, w które zostanie ona wbudowana. Potencjalnie grupy alkilowe mogą się przyłączać do każdego tlenu lub azotu znajdującego się w zasadzie azotowej. W zasadach azotowych występują miejsca bardziej preferowane od innych przez grupy alkilowe. Takim miejscem, jest pozycja N7 w guaninie, wykazująca największy potencjał nukleofilowy. Zasadą azotową wykazującą największą wrażliwość na działanie alkilacji jest guanina, następnie cytozyna, adenina i na końcu tymina. Alkilacja może powodować różne skutki m.in.: powstawanie miejsc AP, tworzenie wiązań poprzecznych między- i wewnątrz niemi DNA, jednoniciowe i dwuniciowe złamania nici DNA, zablokowanie replikacji oraz substytucje, delecje i insercje nukleotydów [10,11,46,48].

Metylacja, proces przyłączenia grupy metylowej, odgrywa także ważną rolę w podstawowym metabolizmie oraz rozwoju zwierząt, jak i roślin. Jest ona związana z epigenetycznymi zmianami w DNA. Są to zmiany prowadzące do wyciszenia aktywności transkrypcyjnej bez zmian w sekwencji DNA. Najczęściej obserwowaną zmianą epigenetyczną jest metylacja promotora genu. Grupa metylowa przyłącza się do cytozyny w miejscu dinukleotydów CpG uniemożliwiając wiązanie czynników transkrypcyjnych. Efektem tego jest brak produktu genu, którego promotor jest zmetylowany. Metylowana cytozyna może następnie podlegać spontanicznej deaminacji, co prowadzi do powstania tranzycji C → T. 5-metylocytozyna (5mC) podlega deaminacji trzy do czterech razy częściej niż cytozyna [7,39].

Hydrolityczna deaminacja polega na odłączeniu grupy aminowej (NH₂) z zasady azotowej w obecności wody, z wydzieleniem amoniaku. Deaminacji może towarzyszyć przekształcenie grupy aminowej do ketonowej w cyklicznych związkach organicznych. Przykładem mutagenu wywołującego deaminację jest kwas azotowy. Kwas ten może powodować usunięcie grupy aminowej w adeninie, cytozynie lub guaninie. Tymina nie ma grupy aminowej, dlatego nie ulega deaminacji. Deaminacja powoduje powstanie hipoksantyny z adeniny, ksantyny z guaniny, uracylu z cytozyny oraz tyminy z 5-metylocytozyny. Przekształcenia zasad azotowych powstałe w wyniku hydrolitycznej deaminacji, przyczyniają się przede wszystkim do tworzenia różnych mutacji punktowych [10,39,44,46,50].

Oksydacja jest reakcją łączenia się tlenu ze związkami chemicznymi. Reakcje oksydacyjne powodowane są najczęściej przez oddziaływanie reaktywnych form tlenu (ROS). ROS przede wszystkim łączą się z atomami węgla C5=C6 połączonymi wiązaniem podwójnym w pierścieniu zasad pirymidynowych. W zasadach pirymidynowych reaktywne formy tlenu mogą także powodować odłączenie się atomu wodoru od grupy metylowej przy atomie węgla C5. Natomiast zasady purynowe wiążą się z ROS najczęściej przy atomach węgla C4, C5 lub C8. Przykładem produktu oksydacji DNA jest 8-hydroksyguanina, powstała po reakcji rodnika wodorotlenkowego (HO[•]) z węglem C8 guaniny, prowadząca często do transwersji GC → TA. Oksydacja powoduje najczęściej modyfikację zasad azotowych oraz pozycji cukrowych, prowadząc do jednoniciowych lub dwuniciowych pęknięć nici DNA [10,36,42].

2.1.4. Wiązania poprzeczne w DNA

Uszkodzenia DNA mogą powodować tworzenie się kowalencyjnych wiązań poprzecznych (*cross-linking*) w DNA, prowadząc do zaburzenia procesów replikacji

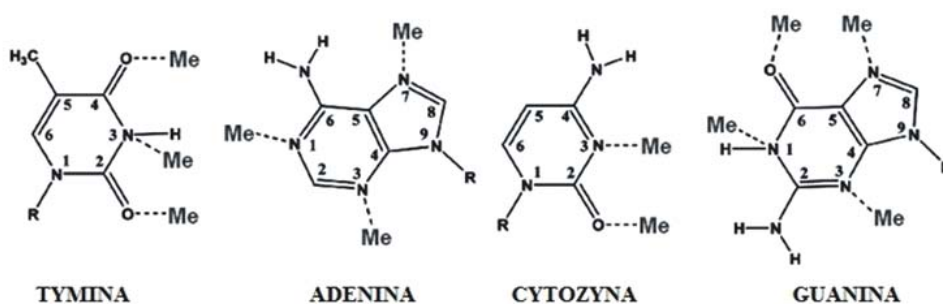
i transkrypcji. Można wyróżnić wiązania poprzeczne wewnątrz nici DNA, pomiędzy niemi DNA oraz między białkami znajdującymi się w komórce i DNA. Procentowa ilość miejsc, w których tworzone są najczęściej wiązania poprzeczne w DNA, rozkłada się następująco: 60–65% dla 5'-GG-3', 25–30% dla 5'-AG-3' oraz 1–3% dla 5'-GNG-3', gdzie N to dowolny nukleotyd [26,31,36,39]. Wiązania poprzeczne najczęściej powstają na skutek oddziaływania DNA ze związkami alkilującymi, aromatycznymi oraz wolnymi rodnikami. Na początku dochodzi do tworzenia się monoadduktów z DNA, czyli kompleksów powstałych z połączenia się w jednym miejscu grupy reaktywnej związku alkilującego i DNA. 90% powstałych monoadduktów przekształca się w wiązania poprzeczne, kiedy związek chemiczny jest połączony z DNA w dwóch różnych miejscach. Jeżeli dwie grupy reaktywne związku alkilującego połączą się z nukleotydami znajdującymi się na jednej nici DNA, to powstanie wiązanie poprzeczne wewnątrz nici DNA. Natomiast wiązanie między niemi DNA powstaje wtedy, gdy dwie grupy reaktywne związku alkilującego połączą się z nukleotydami znajdującymi się na różnych niciach DNA. Ostatni rodzaj wiązania poprzecznego białko-DNA ma miejsce, kiedy jedna grupa reaktywna związku alkilującego łączy się z DNA, a druga z białkiem znajdującym się w jego otoczeniu lub gdy białko bezpośrednio wiąże się z DNA. Atak reaktywnych form tlenu na DNA powoduje także powstanie wiązań poprzecznych typu DNA-białko, np. między tyminą w DNA i cysteiną w białku. Wiązania poprzeczne między białkami a DNA są wykorzystywane jako biomarkery długości ekspozycji komórki na mutagen, ponieważ im dłuższy czas ekspozycji, tym więcej tworzy się wiązań białko-DNA [10,21,26,34,35,36].

2.1.5. Pęknięcia nici DNA

Pęknięcia nici DNA mogą być jednociowe – SSB (*Single Strand Break*) lub dwuniciowe – DSB (*Double Strand Break*). Do pęknięć nici DNA dochodzi podczas normalnego metabolizmu komórek, w trakcie replikacji, transkrypcji i rekombinacji chromatyd. Powstają one także w wyniku oddziaływania promieniowania i mutagenów chemicznych na DNA. Mutageny najczęściej indukują różne typy uszkodzeń DNA, które dopiero w następstwie prowadzą do powstania DSB podczas naprawy lub replikacji. Jednociowe pęknięcia DNA nie stanowią na ogół poważnego zakłócenia w prawidłowym funkcjonowaniu komórki, ponieważ są one wydajnie usuwane przez systemy naprawcze. Obecność jednociowych pęknięć nici DNA, jeżeli wystąpią w znacznej odległości od siebie, nie powodują poważnych zaburzeń w komórce. Znaczne zagrożenie dla funkcjonowania komórki stanowi pojawienie się kilku jednociowych pęknięć w bliskiej odległości od siebie lub naprzeciw siebie, które gdy błędnie naprawione, mogą doprowadzić do dwuniciowych pęknięć DNA. Często nieprawidłowa naprawa DSB skutkuje powstawaniem aberracji chromosomowych, takich jak: delecje, duplikacje czy translokacje, co w konsekwencji może wywołać zablokowanie replikacji i apoptozę komórki [9,12,23,33,43].

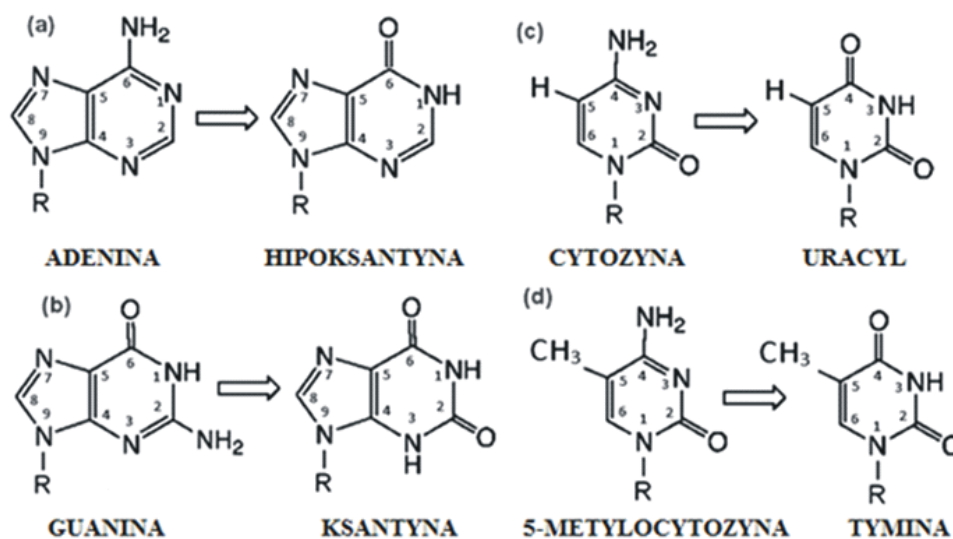
3. MECHANIZMY POWSTAWANIA USZKODZEŃ DNA

Związki uszkadzające DNA mogą oddziaływać ze strukturą DNA w sposób bezpośredni lub pośredni. Mechanizm bezpośredni występuje, kiedy czynniki chemiczne i fizyczne reagują z elementami wchodzącymi w skład DNA, co prowadzi np. do zerwania wiązań między nimi. Zerwanie wiązania β -N-glikozydowego pomiędzy zasadą azotową a cukrem dezoksyrybozą może skutkować utratą zasady azotowej. Natomiast rozerwanie wiązania fosfodiesterowego pomiędzy fosforanem jednego nukleotydu a węglem kolejnego nukleotydu może prowadzić do pęknięć nici DNA. Mechanizm bezpośredni może prowadzić także do modyfikacji zasad azotowych, np. poprzez alkilację czy hydrolityczną deaminację. Grupy alkilowe najczęściej przyłączają się do azotu N7 w guaninie. Również duży potencjał elektrofilowy wykazuje tlen O⁶ guaniny, azot N3 adeniny, a po nich kolejno: azot N3 guaniny, tlen O² cytozyny, azot N7 adeniny, tlen O⁴ tyminy oraz tlen O² tyminy (ryc. 2). Alkilowana guanina w pozycji tlenu O6 często wiąże się z tyminą prowadząc do powstania tranzycji GC→AT. N-alkilacja, czyli przyłączanie grupy metylowej lub etylowej do azotu w zasadzie azotowej, jest szczególnie podatnym miejscem prowadzącym do powstawania różnych mutacji; np. metylacja azotu N3 adeniny może prowadzić do transwersji A→T do T→A oraz zablokowania replikacji [10,11,31,46,48].



RYCINA 2. Miejsca ataku grup alkilowych (Me) w zasadach azotowych [wg 46, zmodyfikowane]
 FIGURE 2. Potential sites of methylation (Me) in DNA [acc. to 46, changed]

Podczas hydrolitycznej deaminacji adeniny, grupa aminowa przy węglu C6 zostaje przekształcona w grupę ketonową tworząc hipoksantynę, która po replikacji najczęściej powoduje powstawanie transwersji AT→CG. Deaminacji guaniny towarzyszy powstanie ksantyny poprzez usunięcie grupy aminowej przy węglu C2. Ksantyna może łączyć się prawidłowo z cytozyną, jednak występowanie pary ksantyna-cytozyna w DNA jest wrażliwym miejscem na zachodzenie spontanicznej hydrolizy, prowadzącej do powstawania miejsc AP. Deaminacja cytozyny prowadzi do powstania uracylu, który jest komplementarny do adeniny, powodując po replikacji zamianę CG TA. 5-Metylocytozyna po deaminacji tworzy tyminę, co może skutkować powstaniem



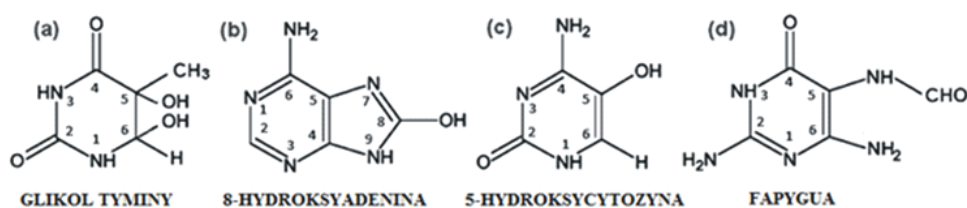
RYCINA 3. Deaminacja zasad azotowych: (a) zamiana adeniny na hipoksantynę, (b) zamiana guaniny na ksantynę, (c) zamiana cytozyny na uracyl i (d) zamiana 5-metylocytozyny na tyminę [wg 44, zmodyfikowane]

FIGURE 3. Nucleobase deamination products: (a) hypoxanthine, (b) xanthine, (c) uracil, (d) thymine [acc. to 44, changed]

mutacji 5meCG TA. Zarówno w cytozynie, jak i 5-metylocytozynie grupa aminowa zostaje przekształcona w grupę ketonową przy węglu C4 (ryc. 3) [39,42,44,45,50].

Mechanizm pośredni występuje, gdy czynniki chemiczne i fizyczne modyfikują strukturę DNA dopiero po wytworzeniu w komórce metabolitów pośrednich, np. wolnych rodników, zdolnych do oddziaływania z DNA. Wolne rodniki to atomy, cząsteczki lub jony zdolne do samodzielnego istnienia i mające niesparowane elektrony na powłoce walencyjnej nadające im własności paramagnetyczne [36,41]. Do wolnych rodników należą głównie reaktywne formy tlenu: anionorodnik ponadtlenkowy, rodnik wodorotlenkowy i wodoronadtlenkowy oraz nadtlenek wodoru. Źródłem powstawania reaktywnych form tlenu jest wiele czynników wewnątrz-, jak i zewnątrzkomórkowych. Wewnątrzkomórkowymi reakcjami wolnorodnikowymi są m.in.: łańcuch oddechowy w mitochondriach, reakcje Fentona i Habera-Weissa oraz peroksydacja lipidów. Zewnątrzkomórkowym procesem, indukującym powstawanie reaktywnych form tlenu, jest działanie promieniowania jonizującego i nadfioletowego [10,28,42]. Czynniki te powodują tworzenie się reaktywnych form tlenu w wyniku jonizacji wody. Zjonizowana cząsteczka wody może następnie połączyć się z uwolnionym elektronem tworząc wzbudzoną cząsteczkę wody. W skutek rozpadu takiej cząsteczki powstają produkty reagujące ze związkami chemicznymi wchodzącymi w skład komórek organizmu [40,43]. Wolne rodniki mają silne właściwości utleniające, dzięki czemu mogą reagować ze wszystkimi składnikami komórek, doprowadzając do ich uszkodzeń. Spowodowane jest to niespecyficnością reakcji reaktywnych form tlenu z cząsteczkami budującymi komórki, takimi jak: białka, lipidy,

węglowodany oraz kwasy nukleinowe [28,41,42]. Najbardziej szkodliwe dla komórek są oddziaływania ROS z DNA. Reakcje wolnorodnikowe z DNA prowadzą do uszkodzeń zasad azotowych na skutek ich oksydacji. Najczęściej z DNA oddziałuje rodnik wodorotlenkowy. W wyniku oddziaływania tego rodnika na wiązanie C5=C6 tyminy tworzy się glikol tyminy, który może powodować zablokowanie transkrypcji, replikacji oraz mutacje punktowe, np. C→T. Połączenie się rodnika wodorotlenkowego z węglem C8 adeniny, tworzy 8-hydroksyadeninę, natomiast z węglem C5 cytozyny tworzy 5-hydroksycytozynę. Reaktywne formy tlenu mogą także powodować rozerwanie pierścienia imidazolowego w purynie, np. w guaninie, tworząc 2,6-

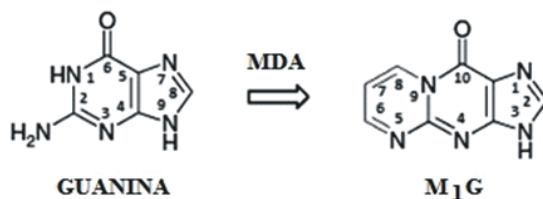


RYCINA 4. Wybrane przykłady niektórych związków powstałych w reakcji wolnorodnikowej z zasadami azotowymi [wg 8 zmodyfikowane]

FIGURE 4. DNA base products of interaction with reactive oxygen and free radical species [acc. to 8, changed]

diamino-4-hydroksy-5-formamidopyrimidynę (FapyGua), która powoduje zahamowanie replikacji i apoptozę komórki (ryc. 4) [8,10,36].

Reaktywne formy tlenu mogą także pośrednio modyfikować zasady azotowe w DNA poprzez oddziaływanie z końcowymi produktami peroksydacji lipidów, np. z dialdehydem malonowym (MDA), akroleiną czy aldehydem krotonowym. MDA reaguje z grupami aminowymi znajdującymi się w pierścieniu guaniny, adeniny czy cytozyny i może tworzyć kompleksy, charakteryzujące się dodatkowym pierścieniem przy azocie grupy aminowej. Najczęściej MDA reaguje z pierścieniem guaniny, w wyniku czego powstaje pirymidopurynon. MDA powoduje głównie mutacje występujące w parach 5'-GC-3' powodując powstawanie dużych insercji i delecji (ryc. 5). Natomiast akroleina i aldehyd krotonowy mogą tworzyć sześcioczłonowe propanokompleksy i pięcioczłonowe etanokompleksy z DNA, które prowadzą



RYCINA 5. Oddziaływanie dialdehydu malonowego (MDA) z guaniną tworzy pirymidopurynon (M1G) [wg 28, zmodyfikowane]

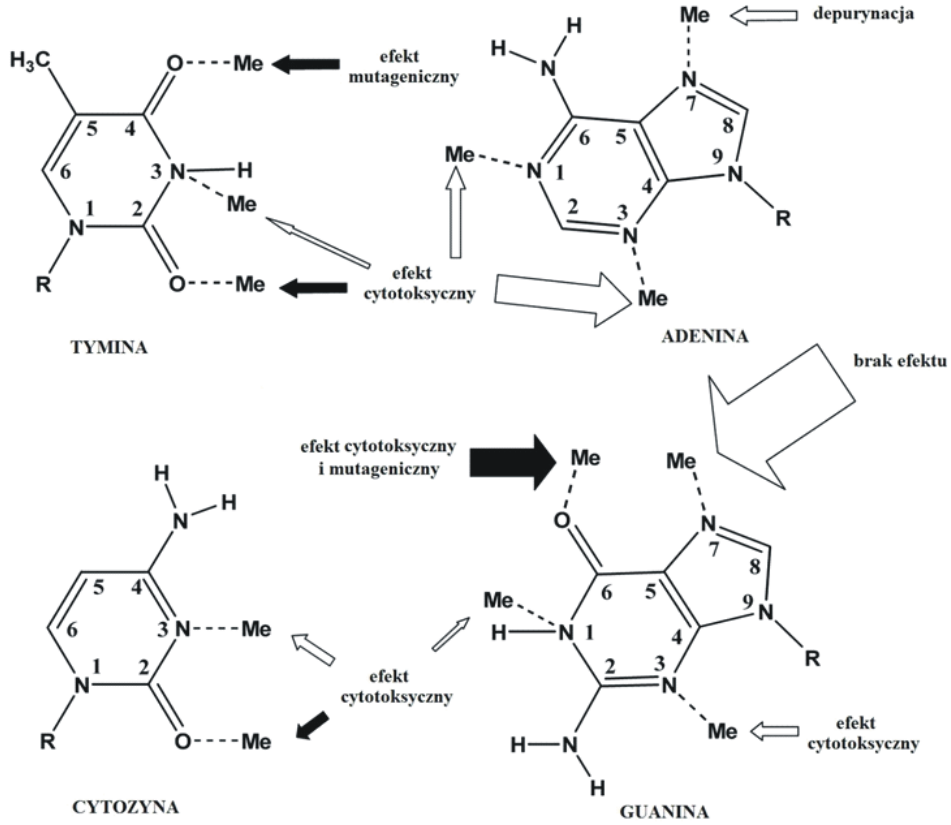
FIGURE 5. Malondialdehyde (MDA) reacts with guanine in DNA, forming pyrimidopurine (M1G) [acc. to 28, changed]

najczęściej do powstania mutacji punktowych typu transwersji G→T, tranzycji G→A oraz do zahamowania replikacji DNA [10,28,30,36].

4. MECHANIZMY DZIAŁANIA WYBRANYCH MUTAGENÓW

Częstotliwość występowania mutacji w przyrodzie jest bardzo mała. Czynniki chemiczne i fizyczne mogą zwiększać częstotliwość wystąpienia mutacji. Techniki mutacyjne, wykorzystywane są do indukowania mutacji w materiale genetycznym roślin i zwierząt. Liczne instytuty i stacje hodowli roślin na świecie stosują techniki mutacyjne dla uzyskiwania nowych form przydatnych w hodowli roślin uprawnych. Wyniki tych prac rejestruje Sekcja Hodowli i Genetyki Roślin Połączonej Jednostki FAO/IAEA (*Plant Breeding and Genetics Section, Joint Food and Agriculture Organization/International Atomic Energy Agency Division*). Według danych FAO/IAEA, do tej pory na świecie, zarejestrowano 3059 odmian mutacyjnych, przede wszystkim w Azji (1142), Europie (847) i Ameryce Północnej (160) [2,25,32].

W mutagenezie konwencjonalnej roślin wykorzystuje się mutageny chemiczne oraz fizyczne. Najliczniejszą grupę związków chemicznych wykorzystywanych w mutagenezie stanowią związki alkilujące, dzielone na związki mono-, bi- i polifunkcyjne ze względu na liczbę grup alkilowych w nich występujących. Związki takie jak N-metylo-N-nitrozomocznik (MNU), N-etylo-N-nitrozomocznik (ENU), ester etylowy kwasu metanosulfonowego (EMS), ester metylowy kwasu metanosulfonowego (MMS) oraz siarczek dimetylu (DMS) należą do związków monofunkcyjnych, natomiast iperyt azotowy pierwszy raz zastosowany w Indyjskim Instytucie Badań Rolniczych jest związkiem bifunkcyjnym. Związki alkilujące powodują powstanie mutacji punktowych, ale mogą również powodować efekt klastogenny, tzn. wywołują zmiany w strukturze chromosomów [19,29,46]. Związki alkilujące prowadzą przede wszystkim do bezpośredniej alkilacji zasad azotowych. Najczęściej alkilowana jest pozycja azotu N7 guaniny, nieprowadząca bezpośrednio do mutacji. Zalkilowana w tej pozycji guanina wykazuje zwiększoną wrażliwość na hydrolityczną deaminację, a w konsekwencji do występowania miejsc AP. Często alkilowanym miejscem jest także tlen O⁶ guaniny. Alkilowana O⁶ guanina, łączy się z tyminą, zamiast z cytozyną, prowadząc do tranzycji GC→AT. W zależności od użytego mutagenu powstają różne uszkodzenia DNA. MNU indukuje głównie powstawanie tranzycji GC→AT, podczas gdy ENU prowadzi zarówno do tranzycji GC→AT, jak i AT→GC, oraz transwersji GC→CG lub AT→CG. EMS indukuje tranzycję CG→TA, natomiast MMS powoduje uszkodzenie widełek replikacyjnych i powstawanie pęknięć DNA (ryc. 6) [11,17,24,37,46,47]. Reaktywność związków alkilujących może być definiowana w zależności od mechanizmu reakcji albo od szybkości reakcji, która jest zależna od siły nukleofilowej atomów receptorowych. Do wyrażenia reaktywności czynników alkilujących stosowana jest stała substratu Swain-Scotta (*s*), oznaczająca wrażliwość związku alkilującego na siłę (*n*) nukleofilu, z którym reaguje. Typ reakcji może być unimolekularny (S_N1) bądź bimolekularny



RYCINA 6. Potencjalne miejsca metylacji w DNA oraz ich wpływ na komórkę. Niewypełnionymi strzałkami przedstawione są miejsca metylowane przez MMS, MNNG i MNU, strzałkami wypełnionymi zaznaczone są miejsca metylowane tylko przez MNNG i MNU. Wielkość strzałek reprezentuje względną częstotliwość występowania miejsca metylacji [wg 46, zmodyfikowane]
 FIGURE 6. Potential sites of methylation in DNA and their impact on cell function. The open arrows represent sites that are methylated by MMS, MNNG and MNU. The filled arrows point to sites that are methylated by MNNG and MNU. The size of the arrows roughly represent the relative proportion of methylation [acc. to 46, changed]

(S_N2). Zdolność MMS czy EMS do alkilacji różnych miejsc w DNA zależna jest od wartości *s*. Liczba podstawień reszty alkilowej w pozycji azotu N7 w guaninach jest tym wyższa, im wyższa jest wartość *s*, natomiast alkilacja pozycji tlenu O6 jest tym częstsza, im niższa jest wartość *s*. Również efekt biologiczny działania związków alkilujących jest zależny od wartości *s*. U jęczmienia, MMS – związek o wyższym współczynniku *s*, jest bardziej cytotoksyczny i mniej mutageny w porównaniu z PMS (ester propylowy kwasu metanosulfonowego), który charakteryzuje niższa wartość *s*. U jęczmienia badano także występowanie aberracji chromosomowych po działaniu różnego rodzaju związków alkilujących na komórki dzielące się zarówno mitotycznie, jak i mejotycznie. Związki o niskim współczynniku *s*, takie jak: EMS, PMS wykazywały małą zdolność do indukcji aberracji chromosomowych w

porównaniu z związkami o wysokiej wartości s , takimi jak: MMS i MES (ester metylowy kwasu etanosulfonowego). Efektywność indukcji mutacji związków alkilujących maleje wraz ze wzrostem wartości s , zatem najbardziej mutageny efekt z badanych związków wykazywał EMS, następnie PMS, MES i MMS [29,46].

Innym związkiem wykorzystywanym w mutagenezie konwencjonalnej, jest azydek sodu (NaN_3). Ma on w swojej budowie reaktywny jon azydkowy, który w roztworze wodnym występuje w postaci toksycznego azotowodoru. Azydek sodu zaliczany jest do silnych mutagenów, jednak nie oddziałuje on mutagennie na wszystkie organizmy; np. powoduje powstawanie mutacji w genomach: *Hordeum vulgare*, *Oryza sativa*, *Zea mays*, *Pisum sativum* i *Escherichia coli*, ale już nie u *Arabidopsis thaliana*, *Drosophila melanogaster*, czy u większości odmian *Triticum aestivum*. Azydek sodu wykazuje reaktywność w kwasowym pH. Mutageny jest dopiero organiczny metabolit pośredni azydku sodu powstały w organizmie żywym podczas syntezy cysteiny. Związkiem tym jest najprawdopodobniej azydoalanina, powstała w wyniku reakcji katalizowanej przez enzym sulfohydrolazę O-acetyloserynową. Szlak biosyntezy cysteiny występuje u bakterii i roślin. Zwierzęta nie mają szlaku biosyntezy cysteiny, co wiąże się z brakiem skutecznej mutagenezy azydkiem. Azydoalanina może wchodzić w interakcje z DNA, powodując powstawanie mutacji punktowych w genomie. Jony azydkowe lub HN_3 łączą się także z oksydazą cytochromową, prowadząc do inhibicji procesu oddychania wewnątrzkomórkowego i do zahamowania biosyntezy ATP (*Adenosine TriPhosphate*), nośnika energii wykorzystywanego w podstawowym metabolizmie komórki. Azydek sodu powoduje przede wszystkim tranzycję $\text{AT} \rightarrow \text{GC}$ [3,16,24].

Jednym z podstawowych czynników fizycznych wykorzystywanych do indukcji zmian w DNA jest promieniowanie jonizujące oraz niejonizujące. Do promieniowanie jonizującego zalicza się m.in.: promieniowanie gamma, promieniowanie X oraz neutrony. Podstawowymi radioizotopami emitującymi promieniowanie gamma, jest kobalt-60 (^{60}Co) i cez-137 (^{137}Cs). Promieniowanie jonizujące może bezpośrednio oddziaływać na strukturę DNA przez zderzenie cząstek z nicią DNA lub pośrednio przez oddziaływanie produktów radiolizy wody z DNA. Promieniowanie jonizujące powoduje poza mutacjami punktowymi przede wszystkim jednoniciowe i dwuniciowe pęknięcia nici DNA, różne aberracje chromosomowe, a także powstawanie wiązań poprzecznych w DNA. Natomiast neutrony często prowadzą do powstania mutacji typu delekcji, co zostało wykorzystywane w metodzie modyfikacji strategii TILLING (*Deleteagene*) do otrzymywania tego typu mutacji u roślin [20,22,24,40].

Promieniowaniem niejonizującym jest np. promieniowanie nadfioletowe (UV), indukujące przede wszystkim tworzenie się fotouszkodzeń. Najczęstszymi fotouszkodzeniami są dimery cyklobutyłowe i „fotoprodukty 6–4”, tworzone między zasadami azotowymi w DNA. Dimery cyklobutyłowe stanowią 75%, natomiast fotoprodukty 6–4 25% uszkodzeń DNA powodowanych przez UV. Dimery cyklobutyłowe powstają poprzez kowalencyjne połączenie ze sobą atomów węgla C5 i C6 między leżącymi obok siebie pirymidynami, rzadko purynami. Dimery tworzą się najczęściej między dwiema tyminami w pozycji *cis* lub *trans*. Natomiast fotoprodukt 6–4 powstaje, kiedy zostaje wytworzone wiązanie kowalencyjne między atomami

węgla C6 i C4 sąsiadujących ze sobą pirymidyn. Takie wiązanie najczęściej występuje między 5'-TC-3', 5'-CC-3' i 5'-TT-3'. W wyniku powstałych fotouszkodzeń, zasady azotowe są bliżej siebie, co może prowadzić do zaburzeń w procesach replikacji i transkrypcji, a w konsekwencji do delekcji [6,41,42].

5. PODSUMOWANIE

Pod wpływem czynników zewnętrznych i wewnętrznych materiał genetyczny organizmów żywych podlega uszkodzeniom, które mogą prowadzić do mutacji.

Do najczęstszych uszkodzeń DNA należy modyfikacja zasad azotowych oraz pęknięcia nici DNA. Mutacje w komórkach somatycznych najczęściej mają obojętny lub negatywny wpływ na organizm, powodując np. obniżenie płodności, a nawet prowadząc do śmierci organizmu. Niektóre mutacje mogą mieć korzystny efekt dla potomstwa organizmu, jak i powstałej z niego populacji. Genetycy i hodowcy w drodze mutagenезy otrzymali wiele cennych odmian roślin uprawnych o pożądanych cechach. Do cech tych należą przede wszystkim półkarłowatość, wczesność, odporność na choroby i zwiększona tolerancja na niekorzystne warunki środowiska. Do tworzenia nowych odmian roślin wykorzystuje się czynniki fizyczne i chemiczne. Czynniki te wywołują różne efekty w traktowanym organizmie, dlatego ważny jest wybór odpowiedniego mutagenu i jego dawki. Rozwój technik biologii molekularnej oraz sekwencjonowanie coraz większej liczby genomów roślinnych i zwierzęcych pozwala na dokładniejszą analizę zachodzących zmian w DNA pod wpływem użytego mutagenu. Techniki mutacyjne są coraz częściej wykorzystywane również w genomice funkcjonalnej do badania i poznania funkcji genów.

LITERATURA

- [1] ABDULLIN TI, NIKITINA II, BONDAR OV. Detection of DNA depurination with the use of an electrode modified with carbon nanotubes. *J Anal Chem* 2008; **63**: 690–692.
- [2] AHLHOOWALIA BS, MALUSZYNSKI M, NICHTERLEIN K. Global impact of mutation-derived varieties. *Euphytica* 2004; **135**: 187–204.
- [3] AL-QURAINY F, KHAN S. Mutagenic effects of sodium azide and its application in crop improvement. *World Appl Sci J* 2009; **6**: 1589–1601.
- [4] AMOSOVA O, COULTER R, FRESCO JR. Self-catalyzed site-specific depurination of guanine residues within gene sequences. *Proc Natl Acad Sci* 2006; **103**: 4392–4397.
- [5] BARANOVSKY SF, BOLOTIN PA, EVSTIGNEEV MP, CHERNYSHEV DN. Interaction of ethidium bromide and caffeine with DNA in aqueous solution. *J Appl Spect* 2009; **76**: 132–139.
- [6] BRITT AB. Repair of DNA damage induced by solar UV. *Photosynthesis Research* 2004; **81**: 105–112.
- [7] CHAN SWL, HENDERSON IR, JACOBSEN SE. Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Publishing Group* 2005; **6**: 351–360.
- [8] COOKE MS, EVANS MD, DIZDAROGLU M, LUNEC J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation and disease. *FASEB J* 2003; **17**: 1195–1214.
- [9] CORNFORTH MN. Perspectives on the formation of radiation-induced exchange aberrations. *DNA Repair* 2006; **10**.1016: 1182–1191.

- [10] DeBONT R, Van LAERBEKE N. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis* 2004; **19**: 169–185.
- [11] DRABLOS F, FEYZI E, AAS PA, VAAGBO CB, KAVLI B, BRATLIE MS, PENA-DIAZ J, OTTERLEI M, SLUPPHAUG G, KROKAN HE. Alkylation damage in DNA and RNA – repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair* 2004; **3**: 1389–1407.
- [12] FOLKARD M, PRISE KM. Investigating mechanisms of radiation-induced DNA damage using low-energy photons. *Acta Physica Polonica A* 2006; **109**: 265–271.
- [13] FRY RC, DeMOTT MS, COSGROVE JP, BEGLEY TJ, SAMSON LD, DEDON PC. The DNA-damage signature in *Saccharomyces cerevisiae* is associated with single-strand breaks in DNA. *BMC Genomics* 2006; **7**: 313.1–313.12.
- [14] GARBETT NC, HAMMOND NB, GRAVES DE. Influence of the amino substituents in the interaction of ethidium bromide with DNA. *Biophys J* 2004; **87**: 3974–3981.
- [15] GHERGHI IC, GIROUSI ST, VOULGAROPOULOS AN, TZIMOU-TSITOURIDOU R. Study of interactions between DNA-ethidium bromide (EB) and DNA-acridine orange (AO), in solution, using hanging mercury drop electrode (HMDE). *Talanta* 2003; **61**: 103–112.
- [16] GRUSZKA D, SZAREJKO I, MALUSZYNSKI M. Sodium azide as a mutagen. W: SHU Q [red.] Plant Mutation Breeding and Biotechnology. *CABI*. In press.
- [17] GUENET JL. Chemical mutagenesis of the mouse genome: an overview. *Genetica* 2004; **122**: 9–24.
- [18] JOVTCHEV G, STERGIOS M, SCHUBERT I. A comparison of N-methyl-N-nitrosourea-induced chromatid aberrations and micronuclei in barley meristems using FISH techniques. *Mutat Res* 2002; **517**: 47–51.
- [19] KAINA B. Mechanisms and consequences of methylating agent-induced SCEs and chromosomal aberrations: a long road traveled and skill a far way to go. *Cytogenetic and Genome Research* 2004; **2004**: 77–86.
- [20] KRASAECHAI A, YU LD, SIRISAWAD T, PHORNSAWATCHAI T, BUNDITHYA W, TAYA U, ANUNTALABHOCHAI S, VILAITHONG T. Low-energy ion beam modification of horticultural plants for induction of mutation. *Surface & Coatings Technology* 2009; **203**: 2525–2530.
- [21] LEHOCZKY P, McHUGH PJ, CHOVANEC M. DNA interstrand cross-link repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* 2007; **31**: 109–133.
- [22] LI X, LASSNER M, ZHANG Y. Deleteagene: a fast neutron deletion mutagenesis-based gene knockout system for plants. *Comp Funct Genom* 2002; **3**: 158–160.
- [23] LONGHESE MP, BONETTI D, GUERINI I, MANFRINI N, CLERICI M. DNA double-strand breaks in meiosis: checking their formation, processing and repair. *DNA Repair* 2009; **8**: 1127–1138.
- [24] MALUSZYNSKI M, SZAREJKO I, MALUSZYNSKA J. Mutation techniques. W: Thomas B, Murphy DJ, Murray BG [red.] Encyclopedia of Applied Plant Sciences. San Diego, Elsevier Academic Press 2003: 186–201.
- [25] MALUSZYNSKI M, SZAREJKO I, BHATIA CR, NICHTERLEIN K, LAGODA PJL. Methodologies for generating variability. Part 4: Mutation techniques. W: Ceccarelli S, Guimaraes EP, Weltzien E [red.] Plant Breeding and Farmer Participation. Rome, FAO 2009: 159–194.
- [26] MINKO IG, KOZEKOV ID, HARRIS TM, RIZZO CJ, LLOYD RS, STONE MP. Chemistry and biology of DNA containing 1,N²-deoxyguanosine adducts of the α,β -unsaturated aldehydes acrolein, crotonaldehyde, and 4-hydroxynonenal. *Chem Res Toxicol* 2009; **22**: 759–778.
- [27] MINOTTI G, MENNA P, SALVATORELLI E, CAIRO G, GIANNI L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharm Rev* 2004; **56**: 185–229.
- [28] MOLLER IM, JENSEN PE, HANSSON A. Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu Rev Plant Biol* 2007; **58**: 459–481.
- [29] NATARAJAN A. T. Chemical mutagenesis: from plants to human. *Current Science* 2005; **89**: 312–317.
- [30] NIEDERNHOFER LJ, DANIELS JS, ROUZER CA, GREENE RE, MARNETT LJ. Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. *J Biol Chem* 2003; **278**: 31426–31433.
- [31] NOLL DM, MCGREGOR MASON T, MILLER PS. Formation and repair of interstrand cross-links in DNA. *Chem Rev* 2006; **106**: 277–301.
- [32] PARRY MAJ, MADGWICK PJ, BAYON C, TEARALL K, HERNANDEZ-LOPEZ A, BAUDO M, RAKSZEGI M, HAMADA W, AL-YASSIN A, OUABBOU H, LABHILILI M, PHILLIPS AL. Mutation discovery for crop improvement. *J Exp Bot* 2009; **189**: 1–9.
- [33] PFEIFFER P, GOEDECKE W, KUHFITTIG-KULLE S, OBE G. Pathways of DNA double-strand break repair and their impact on the prevention and formation of chromosomal aberrations. *Cytogenet Genome Res* 2004; **104**: 7–13.

- [34] RABIK CA, DOLAN ME. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev* 2007; **33**: 9–23.
- [35] RASCHLE M, KNIPSCHER P, ENOJU M, ANGELOVT, SUN J, GRIFFITH JD, ELLENBERGER TE, SCHARER OD, WALTER JC. Mechanism of replication-coupled DNA interstrand crosslink repair. *Cell* 2008; **134**: 969–980.
- [36] ROLDAN-ARJONA T, ARIZA RR. Repair and tolerance of oxidative DNA damage in plants. *Mutat Res* 2009; **681**: 169–179.
- [37] SEDGWICK B, BATES PA, PAIK J, JACOBS SC, LINDAHL T. Repair of alkylated DNA: recent advances. *DNA Repair* 2007; **6**: 429–442.
- [38] SHARMAS, GONG P, TEMPLE B, BHATTACHARYYA D, DOKHOLYAN NV, CHANEY SG. Molecular dynamic simulations of cisplatin- and oxaliplatin-d (GG) intrastrand cross-links reveal differences in their conformational dynamics. *J Mol Biol* 2007; **373**: 1123–1140.
- [39] SUN S, LI L, LI Z. Radical-mediated cytosine and 5-methylcytosine hydrolytic deamination reactions. *Int J Quant Chem* 2005; **106**: 1878–1884.
- [40] TAKAHASHI A, OHNISHI T. Molecular mechanisms involved in adaptive responses to radiation, UV light, and heat. *J Radiat Res* 2009; **50**: 385–393.
- [41] TUTEJA N, SINGH MB, MISRA MK, BHALLA PL, TUTEJA R. Molecular mechanisms of DNA damage and repair: progress in plants. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2001; **36**: 337–397.
- [42] TUTEJA N, AHMAD P, PANDA BB, TUTEJA R. Genotoxic stress in plants: shedding light on DNA damage, repair and DNA repair helicases. *Mutat Research* 2009; **681**: 134–149.
- [43] UEHARA S, NIKJOO H. Monte Carlo simulation of water radiolysis for low-energy charged particles. *J Radiat Res* 2006; **47**: 69–81.
- [44] VONGCHAMPA V, DONG M, GINGIPALLI L, DEDON P. Stability of 2'-deoxyxanthosine in DNA. *Nucleic Acids Res* 2003; **31**: 1045–1051.
- [45] WILLERSLEV E, COOPER A. Ancient DNA. *Proc R Soc B* 2005; **272**: 3–16.
- [46] WYATT MD, PITTMAN DL. Methylating agents and DNA repair responses: methylated bases and sources of strand breaks. *Chem Res Toxicol* 2006; **19**: 1580–1594.
- [47] XIN Z, WANG ML, BARKLEY NA, BUROW G, FRANKS C, PEDERSON G, BURKE J. Applying genotyping (TILLING) and phenotyping analyses to elucidate gene function in a chemically induced sorghum mutant population. *BMC Plant Biol* 2008; **8**: 1–14.
- [48] YANG CG, GARCIA K, HE C. Damage detection and base flipping in direct DNA alkylation repair. *ChemBioChem* 2009; **10**: 417–423.
- [49] YANG H-Y, IGARASHIB K, TANGB N, LINC J-M, WANGA W, KAMEDAB T, TORIBABA, HAYAKAWAB K. Indirect- and direct-acting mutagenicity of diesel, coal and wood burning-derived particulates and contribution of polycyclic aromatic hydrocarbons and nitropolycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat Res* 2010; **695**: 29–34.
- [50] ZHANG A, YANG B, LI Z. Theoretical study on the hydrolytic deamination reaction mechanism of adenine-(H₂O)_n (n=1–4). *J Mol Structure: THEOCHEM* 2007; **819**: 95–101.

Redaktor prowadzący – Janusz Kubrakiewicz

Otrzymano: 12.05.2011,

Przyjęto: 20.06.2011

mgr Magdalena Stolarek

Katedra Genetyki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska,

Uniwersytet Śląski, Katowice

E-mail: mstolarek@us.edu.pl