

# Rodzaje mutacji i wariantów genetycznych

Wykład 3

Michał Szczesniak, 2025

# Mutacje punktowe

- **Mutacje punktowe** (*single nucleotide variants*, SNV) to zmiany pojedynczego nukleotydu w genomie, m.in. tranzycje i transwersje.
- **Tranzycja** to zastąpienie puryny inną puryną ( $A \leftrightarrow G$ ) lub pirymidyny inną pirymidyną ( $C \leftrightarrow T$ ).
- **Transwersja** to zamiana puryny na pirymidynę lub pirymidyny na purynę (np.  $A \leftrightarrow T$ ,  $G \leftrightarrow C$ ,  $A \leftrightarrow C$ ,  $G \leftrightarrow T$ ).

# Mutacje punktowe

- tranzycje są statystycznie częstsze od transwersji mimo tego, że teoretycznie możliwych transwersji jest dwa razy więcej → hotspoty mutacyjne
- transwersje w pewnych sytuacjach środowiskowych mogą jednak dominować – przykładem są nowotwory płuc u palaczy, gdzie wskutek działania kancerogenów dymu tytoniowego częstość transwersji G→T (C→A na nici komplementarnej) jest wyjątkowo wysoka.
- tranzycje częściej skutkują mutacjami synonimicznymi niż transwersje → kodony kodujące ten sam aminokwas często różnią się właśnie tranzycją w trzeciej pozycji (np. GCU -> GUU, oba kodony dla alaniny różnią się tranzycją C→T).
- transwersje częściej zmieniają znaczenie kodonu

# Insercje i delecje (InDel)

- Małe insercje/delecje (kilkunukleotydowe) nazywamy mikroinsercjami/mikrodelecjami, a większe – makrodelecjami/makroinsercjami.
- Umowną granicą rozróżniającą warianty strukturalne od mniejszych InDel jest długość ~50 par zasad - do 50 pb często mówimy o InDel, powyżej o rearanżacjach strukturalnych.
- Powstawanie: poślizg polimerazy (*replication slippage*); naprawa pęknięć DNA (*microhomology-mediated end joining*)

# Insercje i delecje (InDel)

- **Mukowiscydoza (CF)** – klasycznym przykładem mutacji **in-frame InDel** jest najczęstsza mutacja genu *CFTR* powodująca tę chorobę: delecja trzech nukleotydów, która skutkuje utratą fenyloalaniny w pozycji 508 białka CFTR ( $\Delta F508$ ) → nieprawidłowe fałdowanie białka kanału chlorkowego i jego degradację, prowadząc do objawów mukowiscydozy (gęsty śluz w płucach, zaburzenia funkcji trzustki itp.). Istnieją także inne mutacje InDel w *CFTR* – np. delecje powodujące frameshift
- **Talasemie** – zaburzenia syntezy hemoglobiny, np.  $\beta$ -talasemia, często są wynikiem małych delecji lub insercji w genie  $\beta$ -globiny (*HBB*), które wywołują przesunięcie ramki odczytu i przedwczesny stop-kodon.
- **Choroby metaboliczne** – wiele dziedzicznych chorób enzymatycznych spowodowanych jest frameshiftem wskutek InDel → jedna z częstszych mutacji powodujących fenyloketonurię to delecja 1 pary zasad w genie *PAH* (hydroksylazy fenyloalaninowej), co zaburza ramkę odczytu i unieczynnia enzym.



# Warianty strukturalne

- Duże delecje: utrata fragmentu DNA obejmującego od kilkuset par zasad aż po miliony pb.
- Delecje mogą usuwać fragment genu, cały gen, a nawet wiele genów jednocześnie. Skutkiem może być brak jednego lub kilku białek (haploinsuficjencja) lub przerwanie ciągłości genu.
- Przykład: zespół DiGeorge'a (22q11.2 deletion syndrome) - spowodowany delecją ~3 milionów par zasad w chromosomie 22, obejmującą kilkadziesiąt genów. Powoduje to wrodzone wady serca, podniebienia, zaburzenia odporności i inne objawy.
- Inny przykład to delecja fragmentu chromosomu 7 w regionie *ELN* powodująca **zespół Williamsa-Beurena** (charakterystyczny fenotyp twarzy, wrodzona wada serca, nadmierna otwartość w zachowaniu).

# Warianty strukturalne

- **Duplikacje:** podwojenie (czasem wielokrotne zwiększenie liczby kopii) fragmentu genomu. Zwiększenie dawki genów może prowadzić do nadmiaru wytwarzanego białka lub zaburzenia równowagi stechiometrycznej kompleksów białkowych.
- Przykład: duplikacja segmentu 17p12 zawierającego gen **PMP22** prowadzi do neuropatii HMSN typu I (choroba Charcot-Marie-Tooth 1A) wskutek nadmiernej ekspresji białek mieliny. Odwrotna mutacja - delecja tego segmentu – powoduje zespół HNPP (dziedziczna neuropatia z nadwrażliwością na ucisk).
- Duplikacje (amplifikacje) genów są też istotne w onkologii - np. **amplifikacja genu HER2** (ERBB2) w raku piersi występuje u ~20% pacjentek i skutkuje nadmierną produkcją receptora HER2, co napędza wzrost nowotworu.

# Warianty strukturalne

- **Inwersje:** często są zbalansowane - nie powodują utraty ani zysku sekwencji, więc mogą nie dawać skutków fenotypowych, o ile nie przerwą istotnego genu.
- przerwanie genu lub zaburzenie lokalnych interakcji regulatorowych (np. enhancer przestaje oddziaływać na gen) może mieć poważne konsekwencje.
- Przykład: **hemofilia A** może wynikać z inwersji w genie **F8** (kodującym czynnik VIII krzepnięcia) - u ok. 40% ciężkich przypadków hemofilii A dochodzi do inwersji intronu 22 genu *F8*, co przerywa jego ciągłość i uniemożliwia produkcję funkcjonalnego czynnika VIII.

# Warianty strukturalne

- **Translokacje:** przeniesienie fragmentu chromosomu w nowe miejsce – albo na inny chromosom (translokacja wzajemna lub robertsonowska), albo w inne miejsce tego samego chromosomu.
- Translokacje mogą być **zrównoważone** (gdy nie towarzyszy im utrata materiału genetycznego) lub **niezrównoważone** (gdy dochodzi do dodatkowych delecji/duplikacji przy łączeniu). Choć nosiciele translokacji zrównoważonych często są zdrowi, ich gamety mogą otrzymać niezrównoważony zestaw chromosomów, co skutkuje poronieniami lub wadami u potomstwa.
- Największe znaczenie kliniczne mają translokacje powodujące powstanie **genów fuzyjnych** – zwłaszcza w nowotworach. Przykład: translokacja t(9;22) łącząca fragment chromosomu 9 (gen ABL1) z fragmentem chromosomu 22 (gen BCR). Powstaje gen fuzyjny BCR-ABL1 kodujący onkogeną kinazę tyrozynową – tzw. chromosom Filadelfia – będący przyczyną przewlekłej białaczki szpikowej (CML).
- Innym przykładem translokacji tworzącej gen fuzyjny jest t(15;17) w ostrej białaczce promielocytowej (gen PML-RARA).

# CNV

- Szacuje się, że łącznie **4,8–9,5%** ludzkiego genomu stanowią regiony zmienne pod względem liczby kopii
- gen **AMY1** kodujący amylazę ślinową występuje w zmiennej liczbie kopii → adaptacja ewolucyjna
- Znaczenie biologiczne CNV wynika głównie z efektu dawki genu (*gene dosage*). Zarówno nadmiar, jak i niedobór kopii genu mogą zaburzać homeostazę. Wspomniane wcześniej choroby CMT1A i HNPP to przykład, gdzie nadmiar lub brak jednej kopii genu *PMP22* skutkuje neuropatią. Inny przykład to zespół Smith-Magenis (delecja 17p11.2) i zespół Potockiej-Lupskiego (duplikacja 17p11.2) – delecja i duplikacja dokładnie tego samego regionu chromosomu 17 dają dwa różne zespoły genetyczne o przeciwnym fenotypie (m.in. w jednym upośledzenie mowy, w drugim nadmierna gadatliwość).
- W onkologii zmiany typu CNV występują bardzo często jako kopie dodatkowe lub utrata genów. Amplifikacje protoonkogenów (jak MYC, ERBB2/HER2, MDM2 i inne) przyczyniają się do transformacji nowotworowej przez nadmierną ekspresję onkogenów. Z kolei delecje obejmujące geny supresorowe (np. delecja 13q14 zawierająca RB1 w siatkówczaku, czy 9p21 zawierająca CDKN2A w różnych nowotworach) prowadzą do utraty mechanizmów kontrolnych cyklu komórkowego.

# Hotspoty mutacyjne

- Istnieją **hotspoty mutacyjne**, czyli miejsca o podwyższonej częstości występowania mutacji.
- Często są to sekwencje szczególnie podatne na określony mechanizm mutagenezy.
- Klasycznym przykładem hotspotu są dinukleotydy **CpG** – cytozyna w takim kontekście bywa metylowana do 5-metylo-cytozyny, która łatwo spontanicznie deaminuje do tyminy. Skutkiem jest tranzycja C→T (lub G→A na nici przeciwnej) w tym miejscu. Takie mutacje C>T w hotspotach CpG stanowią istotny odsetek wszystkich mutacji punktowych u ludzi.
- wyspy CpG są stosunkowo rzadkie w genomie m.in. właśnie dlatego, że mutacje w CpG często je eliminują

# Hotspoty mutacyjne

- Innym przykładem hotspotu są tzw. **miejsca gorące** w genach onkogenów: np. gen **TP53** (często zmutowany w nowotworach) ma kilka kodonów, w których mutacje punktowe występują znacznie częściej niż w innych (np. kodony 248 i 273 w TP53 są hotspotami mutacji missense w wielu typach nowotworów). Wynika to zarówno z podatności biologicznej (np. te miejsca to regiony kontaktu białka z DNA, kluczowe dla funkcji, więc mutacje dają przewagę nowotworowi), jak i z czynników mutagennych (np. karcynogeny mogą preferencyjnie uszkadzać określone sekwencje).
- W genie **HRAS** znane są hotspoty mutacji (kodony 12, 13, 61), które aktywują onkogen - mutacje dokładnie w tych miejscach często wykrywa się w nowotworach, podczas gdy inne pozycje HRAS rzadziej ulegają mutacjom zmieniającym funkcję.
- Badania somatycznych mutacji w czerniaku skupiają się na kodonie V600 genu **BRAF** (hotspot ~50% czerniaków) czy w raku okrężnicy na kodon G12/G13 genu **KRAS**.
- Hotspoty mutacyjne są wykorzystywane jako cele ukierunkowanych testów diagnostycznych – zamiast sekwencjonować cały gen, czasem wystarczy zbadać kilka hotspotów, gdzie z największym prawdopodobieństwem znajdziemy mutację patogenną.

# SNP

- **SNP** (Single Nucleotide Polymorphism) to termin używany na określenie **częstego wariantu** pojedynczego nukleotydu w populacji. Zgodnie z klasyczną definicją, aby zmiana była uznana za SNP, rzadszy allel powinien występować co najmniej u 1% populacji (w przeciwnym razie mówimy raczej o rzadkim wariancie lub mutacji).
- SNP są zatem polimorfizmami - stanowią normalną zmienność genetyczną. Większość SNP jest neutralna fenotypowo lub ma bardzo subtelny wpływ. Dzięki temu mogą utrzymywać się na wysokich częstościach w populacji.
- Przykład: polimorfizmy w genie kodującym enzym CYP2D6 wpływają na szybkość metabolizmu leków – różne allele (SNP) determinują fenotyp tzw. szybkiego lub wolnego metabolizera, ale żaden z nich nie jest „chorobowy” sam w sobie; dopiero w kontekście podania leku ujawnia się znaczenie konkretnego wariantu.
- W diagnostyce genetycznej skupiamy się zatem głównie na wykrywaniu rzadkich wariantów u pacjenta. Z kolei **SNP** są niezwykle cenne w badaniach populacyjnych i asocjacyjnych (**GWAS**), gdzie ich różne częstości u chorych vs. zdrowych mogą wskazać na genetyczne czynniki ryzyka chorób.

# Mutacje dziedziczne

- Mutacje **dziedziczne (germinalne)** to mutacje obecne w komórkach rozrodczych (gametach) i tym samym przekazywane potomstwu.
- Pochodzą one albo od któregoś z rodziców (jeśli rodzic jest nosicielem mutacji w swoim materiale genetycznym), albo powstają de novo w linii zarodkowej (mutacje de novo obecne u dziecka, których nie ma ani w genomie ojca, ani matki).
- Mutacja dziedziczna obecna jest we wszystkich komórkach organizmu potomka od momentu rozwijania się zarodka. Takie mutacje odpowiadają za klasyczne choroby dziedziczne, które często mają charakter mendlowski (dominujące, recesywne itd. w rodowodach rodzin).
- Przykłady: mutacje w genie **CFTR** powodujące mukowiscydozę, mutacje w genie **F8** skutkujące hemofilią A, czy mutacje genu **BRCA1/BRCA2** zwiększające ryzyko raka piersi i jajnika.
- W przypadku BRCA1/2 nosicielstwo germinalnej mutacji predysponuje do nowotworów  
→ mutacja dziedziczna może skutkować chorobą dopiero w późniejszym etapie życia (gdy znajdą dodatkowe zmiany, np. utrata drugiej kopii genu w komórkach somatycznych).

# Mutacje dziedziczne

- **anemia sierpowata** – mutacja punktowa (SNV, transwersja A→T w genie HBB) dziedziczona autosomalnie recesywnie.
- **Mukowiscydoza (CF)** – najczęstsza mutacja  $\Delta F508$  to InDel in-frame (utrata trzech nukleotydów) w genie CFTR, dziedziczona autosomalnie recesywnie. Ale znamy >2000 różnych mutacji CFTR powodujących CF, w tym missense (np. G551D), nonsense, splicing, duże delecje - czyli pełen wachlarz możliwych mutacji w jednym genie → rozwój leków modulujących CFTR (terapię personalizowaną dla CF) uwzględnia konkretny **rodzaj mutacji**: np. iwakaftor (Kalydeco) działa tylko u chorych z określonymi mutacjami missense (tzw. mutacje klasy III jak G551D) poprawiając otwieranie kanału, ale nie pomoże przy delecji  $\Delta F508$  (klasa II – błąd fałdowania białka).
- **Hipercholesterolemia rodzinna** – najczęściej spowodowana mutacjami genu LDLR (receptora LDL). Mogą to być różne typy mutacji: od SNV zmieniających pojedyncze aminokwasy istotne dla wiązania LDL, przez małe delecje z przesunięciem ramki, po duże delecje obejmujące cały gen *LDLR*. Wszystkie skutkują upośledzeniem usuwania cholesterolu z krwi i wysokim ryzykiem chorób sercowo-naczyniowych. Testy genetyczne, identyfikując mutacje, pozwalają objąć rodzinę wczesną opieką (dziedziczenie dominujące).
- **Zaburzenia rozwoju intelektualnego** – coraz częściej okazuje się, że u dzieci z ciężkimi wadami rozwojowymi, u których wykluczono znane choroby, przyczyną bywają zmiany w genomie, jak mikrodelecje/duplikacje (CNV). Sekwencjonowanie całogenomowe i mikromacierze CGH ujawniają podłoże strukturalne u części takich pacjentów, np. mozaikową trisomię lub delecję fragmentu chromosomu w części komórek.

# Mutacje somatyczne

- **Mutacje somatyczne** to mutacje powstające poza linią zarodkową, w komórkach ciała (somatycznych) podczas życia osobnika.
- Mutacje somatyczne nie są przekazywane potomstwu - dotyczą tylko danego organizmu.
- Nowotwory powstają na skutek akumulacji wielu mutacji somatycznych w pojedynczej komórce, które nadają jej przewagę wzrostową i prowadzą do klonalnego rozrostu. Każdy guz nowotworowy jest więc genomowo unikalny, zawiera liczne mutacje (zarówno tzw. **drivery** napędzające chorobę, jak i **pasażerskie** będące skutkiem niestabilności genomu).
- Przykład: w czerniaku skóry wywołanym promieniowaniem UV komórki nowotworu mogą zawierać dziesiątki tysięcy mutacji somatycznych rozproszonych po genomie, z charakterystycznym sygnaturą (wiele mutacji C→T w miejscach dwunukleotydów TT/TC uszkodzonych przez UV). Z kolei niektóre nowotwory dziecięce mają relatywnie mało mutacji somatycznych.
- Ważne jest też pamiętać, że mutacje somatyczne mogą pojawiać się również w nienowotworowych tkankach wraz z wiekiem (tzw. mozaicyzm somatyczny) i czasem powodować np. segmentalne choroby skóry czy inne mozaikowe fenotypy.

# Mutacje somatyczne

- Przewlekła białaczka szpikowa (CML) → gen fuzyjny BCR-ABL1 → pojedyncze zdarzenie strukturalne (wariant strukturalny, somatyczny) może aktywować onkogen i wywołać chorobę.
- Czerniak i rak płuca – te nowotwory często są napędzane przez mutacje punktowe w onkogenach. W czerniaku ~50% chorych ma mutację BRAF V600E (SNV tranzycji T>A, zamiana waliny na kwas glutaminowy w pozycji 600 kinazy BRAF). To mutacja somatyczna typu missense będąca hotspotem; jej obecność kwalifikuje pacjenta do terapii inhibitorami BRAF (vemurafenib, dabrafenib).

# Doświadczalne metody badania mutacji genomowych

- Sekwencjonowanie Sangera - dziś używane głównie w małej skali (pojedyncze geny, walidacja wyników). Pozwala wykryć SNV i niewielkie InDel z wysoką dokładnością.
- Sekwencjonowanie nowej generacji (NGS) umożliwia:
  - Sekwencjonowanie całego egzomu (WES)
  - Sekwencjonowanie całego genomu (WGS)
  - Panele genowe

# Doświadczalne metody badania mutacji genomowych

- **Sekwencjonowanie długich odczytów** - PacBio czy Oxford Nanopore → szczególnie przydatne w wykrywaniu wariantów strukturalnych. Przykładowo, identyfikacja liczby powtórzeń w chorobie Huntingtona (CAG w genie *HTT*) albo mutacji dynamicznych (długich ekspansji powtórzeń jak w zespole łamliwego chromosomu X).
- **Metody cytogenetyczne i mikromacierze** – tradycyjna cytogenetyka (badanie kariotypu w mikroskopie po barwieniu prążkowym) wciąż jest użyteczna do wykrywania dużych translokacji, aneuploidii (np. trisomie) czy innych zmian rzędu dziesiątek milionów bp. Mikromacierze **aCGH** i **SNP-array** pozwalają natomiast przeskanować cały genom pod kątem CNV z rozdzielczością kilkudziesięciu kb - to standard w diagnostyce aberracji chromosomowych u dzieci z wadami wrodzonymi czy w onkologii do wykrycia nabytych zmian ilościowych DNA.
- **PCR i techniki celowane** - w praktyce laboratoryjnej, jeśli znamy konkretnej mutacje do wykrycia (np. hotspoty), wykorzystuje się często metody PCR (np. ASO-PCR z sondami specyficznymi dla mutacji) lub qPCR do wykrywania amplifikacji/delecji (np. MLPA – analiza liczby kopii, np. egzonów).

# Doświadczalne metody badania mutacji genomowych

- Nowoczesne podejście do badania mutacji obejmuje też wykorzystanie modeli *in vitro* i testów funkcjonalnych do interpretacji wariantów o nieznanym znaczeniu (VUS).
- Przykładowo, technologia **saturacyjnej mutagenezy** pozwala stworzyć wszystkie możliwe mutacje w danym genie i przetestować ich wpływ na funkcję białka.
- Opublikowano takie badania np. dla genu **BRCA1**, gdzie za pomocą edycji CRISPR zbadano efekt setek wariantów na przeżycie komórek, co pomaga w klasyfikacji VUS

► [Am J Hum Genet.](#) 2023 Dec 11;111(1):5–10. doi: [10.1016/j.ajhg.2023.11.005](https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2023.11.005) [↗](#)

## Will variants of uncertain significance still exist in 2030?

[Douglas M Fowler](#)<sup>1,2,3,\*</sup>, [Heidi L Rehm](#)<sup>4,5,\* \*</sup>

► [Author information](#) ► [Article notes](#) ► [Copyright and License information](#)

PMCID: PMC10806733 PMID: [38086381](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38086381/)

In 2020, the National Human Genome Research Institute (NHGRI) made ten “bold predictions,” including that “the clinical relevance of all encountered genomic variants will be readily predictable, rendering the diagnostic designation ‘variant of uncertain significance (VUS)’ obsolete.” On September 16, 2021, we talked about this prediction in the NHGRI Bold Predictions seminar series, and here, we update and expand upon these talks (accessible on the NHGRI website at <https://www.genome.gov/event-calendar/Bold-Predictions-for-Human-Genomics-by-2030> [↗](#)). This prediction appears to be the boldest of all ten as VUSs deposited in ClinVar have increased by ~5-fold from 2020 when the prediction was published to 2023 (ClinVar; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>; date accessed August 1, 2023). However, despite this daunting increase, we are hopeful that many if not most VUSs awaiting classification will in fact be resolved by 2030.