

# Genetske promjene uvjetovane onečišćenjem

---

Valentić, Sonja

Undergraduate thesis / Završni rad

2009

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:912477>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK**

**GENETSKE PROMJENE UVJETOVANE  
ONEČIŠĆENJEM**

**SEMINARSKI RAD**

Sonja Valentić  
Preddiplomski studij molekularne biologije  
(Undergraduate Study of Molecular Biology)  
Mentor: doc. dr. sc. Goran I. V. Klobučar

Zagreb, 2009.

# Sadržaj

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. PRIRODNA VARIJABILNOST .....</b>	<b>2</b>
<b>3. GENETSKE PROMJENE UVJETOVANE ONEČIŠĆENJEM.....</b>	<b>3</b>
3.1. DIREKTNI UČINAK ONEČIŠĆENJA .....	3
3.1.1. <i>Točkaste mutacije.....</i>	4
3.1.2. <i>DNA adukti .....</i>	4
3.1.3. <i>Lomovi u molekuli DNA.....</i>	5
3.1.4. <i>Kromosomske i mitotske aberacije.....</i>	5
3.2. INDIREKTNI UČINAK ONEČIŠĆENJA .....	5
3.2.1. <i>Genetski drift.....</i>	5
3.2.2. <i>Genetske adaptacije.....</i>	6
<b>4. ISTRAŽIVANJE GENETSKIH PROMJENA UVJETOVANIH ONEČIŠĆENJEM.....</b>	<b>7</b>
4.1. POLIMORFNI DNA MARKERI .....	7
4.1.1. <i>Praćenje promijena pomoću polimorfnih DNA markera .....</i>	7
4.2. PROCIJENA ADAPTIVNIH GENA .....	8
4.2.1. <i>Praćenje adaptivnih promjena.....</i>	8
<b>5. ADAPTIVNE PROMJENE I ADAPTIVNI GENI .....</b>	<b>10</b>
5.1. UTVRĐIVANJE GENA KANDIDATA.....	10
5.1.1. <i>A priori kandidati.....</i>	10
5.1.2. <i>Istraživanja ekspresije gena.....</i>	11
5.1.3. <i>Gensko mapiranje .....</i>	11
5.1.4. <i>Traženje selektivne prednosti (selective sweep).....</i>	12
5.1.5. <i>Pretraživanje mutanata.....</i>	12
5.2. KORIŠTENJE ZNANJA O ADAPTIVNIM PROMJENAMA .....	13
<b>6. OGRANIČENJA GENETSKIH ADAPTACIJA .....</b>	<b>14</b>
<b>SAŽETAK .....</b>	<b>15</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>15</b>
<b>LITERATURA .....</b>	<b>16</b>

## 1. UVOD

Priroda i okoliš se mijenjaju velikom brzinom zadnjih desetljeća i sve to utječe na promjene u broju i distribuciji vrsta. Jedan od glavnih čimbenika onečišćenja okoliša je čovjek, koji sa svojim nekontroliranim korištenjem prirodnih resursa, zagađanjem, preusmjerenjem riječnih tokova, introdukcijom alohtonih vrsta i ispuštanjem stakleničkih plinova uzrokuje promjenu klimatskih uvjeta.

U takvim uvjetima opstanak neke vrste ovisi o njenoj ranjivosti, koja je određena nekim genetskim karakteristikama, i o mogućnosti tolerancije nekog nepovoljnog uvjeta. Na štetan antropogeni utjecaj živa bića se prilagođavaju nekim fenotipskim promjenama koje mogu biti izazvane mutacijama ili modifikacijama.

Praćenjem odgovora na klimatske promjene došlo se do zaključka da postoje mnoge brze genetske promjene, koje služe da bi organizam dobio neko svojstvo kojim bi se lakše prilagodio. Predviđa se da nakupljanje takvih mutacija u početnim koracima uzrokuje povećanu genetsku varijabilnost i veću mogućnost opstanka, ali kasnije dolazi do polagane selekcije koji eliminira jedinke koje su podložne mutacijama, što u konačnici rezultira smanjenom veličinom populacije i time smanjenom genetskom varijabilnošću.

U cijelu tu priču ulazi i ekotoksikologija, čiji je cilj da procijeni, predvidi i spriječi znatna genetska i epigenetska oštećenja u populaciji uzrokovana onečišćenjem.

## 2. PRIRODNA VARIJABILNOST

Prirodna genetska varijabilnost proizlazi od prirodnih promjena okoliša i strukture populacije. Utjecaj okoliša se može pronaći u postepenim promjenama genotipa, na primjer zato jer se jedan genotip favorizira u određenim uvjetima. Struktura populacije opisuje odnose među jedinkama, subpopulacijama i cijelim populacijama (Armbruster i Schwaegerle, 1996.).

Postoji nekoliko mehanizama koji mogu utjecati na nastanak genetske varijabilnosti i ti su:

- *Genetska adaptacija ili selekcija* (koje rezultiraju adaptiranim kompleksima gena)
- *Pleotropija* (pojava da jedan gen utječe na nekoliko svojstava) i *vezanost* (što znači da se geni ne rekombiniraju nasumično)
- *Mutacije* (koje su rijetke i uglavnom štetne, ali mogu dovesti do nastanka alela kojeg će prirodna selekcija favorizirati)
- *Genetički drift* (nasumične promjene u frekvenciji gena)
- *Tok gena* (ili migracija gena) predstavlja premještanje pojedinih alela iz jedne u drugu populaciju kao posljedica migracije jedinki)
- *Crossingover* (rezultira u nastanku novih alela ili novih kombinacija alela)
- *Hibridizacija* (nastanak novih sorti)

### 3. GENETSKE PROMJENE UVJETOVANE ONEČIŠĆENJEM

Osim prirodnih genetskih varijabilnosti postoje i promjene u genima, koje su uzrokovane kroničnim utjecajem antropogenih ili nekih drugih egzogenih sila. Antropogena onečišćenja mogu izazvati različite učinke na izloženu populaciju, stvarajući promjene u strukturi populacija i načina funkcioniranja ekosustava (Parker i sur., 1999.).

U zadnjih 30 godina ekotoksikologija se razvila kao disciplina koja daje teoretski uvid i različite mehanizme kojima možemo točno procijeniti promjene koje uzrokuju povećanje ekološkog rizika (Baird i sur., 1996; Chapman, 2002.). Ovisno o stupnju i trajanju onečišćenja, promjene u strukturi populacija i funkcioniranja ekosustava mogu teoretski nastati kao rezultat eliminacije osjetljivih vrsta kroz direktni toksični efekt, zamjenu tih vrsta manje osjetljivima, promjenama u hranidbenom lancu, fiziološkoj prilagodljivosti i selekciji genetski nasljedne tolerancije (Rosenberg i Resh, 1993.; Barbour i sur., 1999.)

Izlaganje onečišćivaču može dovesti do genetskih promjena kroz tri glavna procesa: mutacije, genetski drift i genetska adaptacija. Direktni utjecaj uključuje pogubne mutacije i neke manje štetne mutacije koje imaju tendenciju nakupljanja (Kondrashov, 1995; Lynch i sur., 1995). Indirektni utjecaj uključuju genetski drift i genetske adaptacije.

Za uspješno praćenje genetskih promjena, kao posljedica onečišćenja, koriste se proteinski markeri (aloenzimi), DNA i mtDNA markeri (npr. analiza RAPD i AFLP profila, analiza mikrosatelitne DNA) (Bickham i sur., 2000.).

#### 3.1. DIREKTNI UČINAK ONEČIŠĆENJA

Geotoksične kemikalije, koje su primarni interes ekotoksikologa, uzrokuju direktna oštećenja genetskog materijala. Mjerenjem jakosti odgovora na takva oštećenja možemo pronaći dodatne dokaze koji se mogu iskoristiti kao odgovor na pitanje da li izlaganje mutagenima uzrokuje i promjene u frekvenciji gena. Direktna oštećenja genetskog materijala su točkaste mutacije, kromosomski rearanžmani poput inverzije, delecije, adicije, DNA adukti, lomovi DNA, te nastanak mitotskih i kromosomskih aberacija.

Sve te promjene mogu se pratiti pomoću citometrije, analizom lomova lanaca DNA, Amesovim i Komet testovima, RAPD i mnogim drugim tehnikama (Bickham i Smolen, 1994.; Hebert i Murdoch, 1996.; Dixon i sur., 2002.).

Evolucijski procesi potaknuti genotoksičnošću ovise o tome jesu li pogođene somatske ili germinativne stanice. Kada su pogođene somatske stanice može se pronaći serija fiziopatoloških promjena poznata kao sindrom genotoksičnih bolesti (Kurelec, 1993.). Iako takva oštećenja mogu izazvati razne bolesti, treba voditi računa da se ne prenose na buduće generacije te da postoje mehanizmi popravka DNA i stanične regeneracije koji omogućuju izbjegavanje dugotrajnih posljedica (Anderson i Harison, 1990.). Kada se direktni genotoksični učinci pojave na germinativnim stanicama novonastale promjene mogu biti nasljedne i imati bitne posljedice na izloženu populaciju. Iako ova hipoteza nije u potpunosti testirana pretpostavlja se da oštećenja utječu na smanjenje fertiliteta organizma, što rezultira smanjenjem populacije i u konačnici izumiranjem (Lynch i sur., 1995.).

### **3.1.1. Točkaste mutacije**

Točkaste mutacije su promjene u jednoj bazi u molekuli DNA. One su uzrokovane prvenstveno supstitucijom, a zatim inverzijom, delecijom i adicijom. Točkaste mutacije se kategoriziraju u:

- *Tranzicije* - gdje je purin je zamijenjen drugim purinom ili pirimidin zamijenjen drugim pirimidinom ( npr.  $A/T \rightarrow G/C$  ) i

- *Transverzije* - gdje je purin zamijenjen pirimidinom i obrnuto ( npr.  $A/T \rightarrow C/G$  ).

Kao posljedica točkastih mutacija javljaju se „null“ mutacije (potpuni gubitak funkcije), besmislene mutacije (nastanak stop kodona i nefunkcionalnih proteina), „missense“ mutacije (funkcionalan, ali ipak različit protein), uvjetne (kondicionalne) mutacije (očituju se samo u određenim okolnostima).

### **3.1.2. DNA adukti**

DNA adukt je dio molekule DNA na koju je kovalentno vezana neka kancerogena kemikalija. Dokazano je da je takva DNA početak nastanka kancerogenih stanica, odnosno procesa kancerogeneze. Takve stanice se koriste kao biomarkeri u znanstvenim istraživanjima, jer se pomoću njih može kvantitativno mjeriti učinak neke kemikalije na oštećenje molekule DNA.

### **3.1.3. Lomovi u molekuli DNA**

Jednolančani lomovi su najčešća primarna oštećenja DNA i ujedno najosjetljiviji pokazatelj oštećenja DNA. Dvolančani lomovi su potencijalno letalni i jedan su od najtežih tipova oštećenja jer mogu dovesti do rearanžmana genoma. Sami nisu mutageni ali mogu inducirati SOS odgovor koji može biti mutagen.

### **3.1.4. Kromosomske i mitotske aberacije**

Strukturne promjene kromosoma (kromosomske aberacije) nastaju zbog pogrešaka u crossing-overu ili zbog loma kromosoma uzrokovanih raznim nepovoljnim uvjetima. Tu spadaju kromosomski i kromatidni prekidi, kromosomski i kromatidni lomovi, dicentrični i ring kromosomi te acentrični fragmenti.

U mitotske aberacije spadaju nastanak anafaznog mosta, ostaci fragmenata kromosoma, zaostajanje cijelih kromosoma i višepolarna anafaza koji uglavnom nastaju kao posljedica poremećaja funkcije diobenog vretena.

## **3.2. INDIREKTNI UČINAK ONEČIŠĆENJA**

Indirektni učinci su populacijom posredovani procesi gdje onečišćenje mijenja genetsku varijabilnost populacije. Okolišni stres može uzrokovati promjenu u brojnim neutralnim genetskim markerima kroz nasumični genetski drift ili migraciju gena nakon velikog smanjenja u veličini populacije i/ili promjenom genetske varijabilnosti i dobivanjem odabranih svojstava nakon direktne selekcije (Cousyn i sur., 2001.; Van Straalen i Timmermans, 2002.).

Najbolji način da se ustanovi je li došlo do genetske varijabilnosti je mjerenjem genetskih adaptacija koje se događaju kao posljedica izlaganja onečišćivaču. Otkriveno je da su neki geni direktno povezani sa odgovorom na toksikante i detoksikacijskim procesom, a jedan od načina da se ustanove genetske promjene u populaciji je promatranje varijacija na tim lokusima.

### **3.2.1. Genetski drift**

Genetski drift (ili kako se negdje naziva genetska slučajnost) se uglavnom odnosi na promjene u učestalosti alela u genskoj zalihi koje su uvjetovane slučajnošću. On se odvija kad se nekim slučajem samo određeni članovi populacije razmnožavaju i prenose gene u iduću generaciju.



Iako je genetski drift u principu prirodan proces, on također može biti izazvan raznim okolišnim onečišćenjima koji uzrokuju naglo smanjenje populacije ili nastanak barijere toku gena (Selander i Whittam, 1983.)

### **3.2.2. Genetske adaptacije**

Genetska adaptacija je prilagodba populacije jedinki na okoliš tijekom nekog vremena, ona je sposobnost mijenjanja u skladu sa zahtjevima okoliša i uključuje procese korisnih mutacija i prirodne selekcije, koji se uglavnom odvijaju tisućama godina.

Genetske adaptacije također mogu biti rezultat promjene okoliša, a u odgovoru na onečišćivač osjetljive individue često plaćaju visoku cijenu (Selander i Whittam, 1983.). Kao primjer se navode oštećenja reproduktivnog sustava, smanjen rast, skraćivanje životnog vijeka, nisko preživljenje mladih i podložnost raznim bolestima (Kurelec, 1993.) i sve to kao posljedica nakupljanja mutacija (Lynch i sur., 1995.), indukcije detoksikacijskih procesa i imunosupresije (Weeks, 1992.).

Proces genetske adaptacije se zna nazivat i mikroevolucija uzrokovana onečišćenjem te se može dogoditi u nekoliko godina ili nakon nekoliko generacija umjesto da traje stoljećima ili tisućljećima (Klerks i Levinton, 1989.; Theodorakis i Shugart, 1997.). Evolucijske promjene u populacijama koje su izložene onečišćenju ovise o tome kako toksična tvar remeti zalihu gena izložene populacije.

Genetske adaptacije mogu imati za posljedicu promjenu frekvencije genotipova, selekciju protiv podložnih genotipova, selekciju na rezistentne genotipove ili selekciju na specifične rezistentne gene, čime se neka populacija bolje prilagođava na štetne uvjete u okolišu. Također može rezultirati u kompletno smanjenoj genetskoj varijabilnosti ako se dogodi selekcija koja će rezultirati u smanjenoj stopi heterozigotnosti (Belfiore i Anderson, 1998.)

## 4. ISTRAŽIVANJE GENETSKIH PROMJENA UVJETOVANIH ONEČIŠĆENJEM

### 4.1. POLIMORFNI DNA MARKERI

Da bi se promjene na molekuli DNA nekog organizma mogle dobro pratiti, koriste se mnogi genetski markeri. Biomarkeri služe za biokemijska i fiziološka mjerenja različitih odgovora na izlaganje nekom onečišćivaču. Oni služe da se povežu promjene u frekvenciji gena sa izlaganjem onečišćivaču. U situaciji gdje je prisutna veća količina onečišćivača oni pomažu otkriti o kojoj se stvari radi, na primjer pirimidinski dimeri su rezultat izlaganja UV svjetlu (Applegate i Lay, 1988.), a DNA adukti se formiraju nakon izlaganja policikličnim aromatskim ugljikovodicima (Stein 1994.; Sadinski i sur., 1995.).

Oni ne samo da nam govore o prirodi te promjene, već nam i daju uvid na neke buduće potencijalne promjene kojima bi populacija mogla odgovoriti na nove uvjete. Jedna od najpopularnijih metoda u istraživanju su neutralni DNA markeri, od kojih je možda najpopularnija analiza mikrosatelitne DNA (Van Straalen i Timmermans, 2002.). Mikrosatelitna DNA je zbog velike varijabilnosti i brze evolucije pogodna za analizu razlika između srodnih populacija i nedavnih brzih promjena genetičke strukture populacije, naročito onih uzrokovanih okolišnim mutagenima.

Ako govorimo u kontekstu konzervacijske biologije, ovakvi testovi nam mogu pomoći u identifikaciji i očuvanju najugroženijih vrsta, ali treba također voditi računa da se razlike u markerima u principu izražavaju kada je već došlo do naglog pada u populaciji.

#### 4.1.1. Praćenje promijena pomoću polimorfnih DNA markera

Ako stresni uvjeti u okolišu dovedu do stalnog pada u veličini populacije ili dovedu do redukcije toka gena, može doći do smanjenja u genetskoj varijabilnosti unutar neke populacije, čime će se istovremeno povećati genetske razlike između neke dvije populacije. Postoje mnogi dokazi da se te varijabilnosti mogu dobro popratiti promjenama u neutralnim markerima, što je dovelo do zaključka da bi oni bili dobri za praćenje promjena uzrokovanih okolišnim onečišćenjem (Van Straalen i Timmermans, 2002.).

Međutim, kada trebamo te rezultate dobiti na prirodnim populacijama, nailazi se na dvosmislene rezultate. Kao neki od glavnih razloga se navode činjenice da pad u populaciji treba

biti dovoljno visok da bi se vidio efekt genetske varijabilnosti, zatim da populacije moraju biti izolirane i da treba voditi računa o stopi mutacija koje često mogu uzrokovati povećanje, a ne smanjenje genetskih varijabilnosti u nekim DNA markerima (Muller i sur., 2007.).

Iz navedenog se zaključuje da su neutralni markeri korisni u praćenju ugroženih vrsta koji zadovoljavaju sve gore navedene uvjete.

Osim neutralnih markera moguće je pratiti promjene pomoću kvantitativnih promjena nekog svojstva. Te promjene su lako mjerljive na pojedincu i ukazuju na promjene u brojnim lokusima (Kruuk i Hadfield, 2007.). Međutim ta tehnika još nije u potpunosti dovršena i sklona je pogreškama te uvelike ovisi o ekološkim uvjetima.

## 4.2. PROCIJENA ADAPTIVNIH GENA

Alternativa neutralnim genetskim markerima su procijene adaptivnih gena, koji su direktno povezani sa promjenama u okolišu. U prošlosti je bilo teško pronaći lokuse koji bi dali točne odgovore kako se odvija selekcija populacija, odnosno što definira sposobnost prilagodbe vrste. Tada se postavila teza da genetske promjene na takvim lokusima imaju veliku ulogu na određene populacije tako što im omogućavaju život u uvjetima koji se mijenjaju.

Te teze su poduprte dokazima da polimorfizam samo jednog gena može utjecati na rast i preživljenje nekih populacija. Primjer za to možemo naći u porastu preživljenja brojnih korova, insekata i glodavaca koji su stekli otpornost na pesticide i herbicide nekim adaptivnim promjenama (Etterson, 2004.).

Znanstvenici u zadnje vrijeme pronalaze sve više setova gena u biljkama, insektima i sisavcima koji se direktno dovode u vezu sa adaptivnim odgovorom na sušu, stresne uvjete, toksikante i temperaturni stres.

### 4.2.1. Praćenje adaptivnih promjena

Što se tiče praćenja adaptivnih promjena pomoću seta adaptivnih markera treba napomenuti da mu je jedna od glavnih prednosti mogućnost praćenja vrsta koje nisu nužno modelni organizmi. Koristan set adaptivnih markera uključuje lokuse koji doprinose, u značajnoj količini, genetskoj varijabilnosti nekog svojstva unutar i između populacija te da ovisno o okolišnim promjenama podliježu promjeni frekvencije alela. Ako se pronađu takvi lokusi,

pomoću promjene u frekvenciji alela može se pratiti kako selekcija utječe na populaciju (Etterson, 2004.).

Svaki lokus unutar seta lokusa trebao bi doprinosti više od 5% i na temelju toga dijelimo alele na one visokog i niskog učinka (Hoffmann i Willi, 2008.). Iako su aleli visokog učinka lakše uočljivi, oni su prvenstveno bitni u brzim ekološkim promjenama, dok su aleli niskog učinka bitniji kada je u pitanju sporija promjena okoliša (Kopp i Hermission, 2007.).

## 5. ADAPTIVNE PROMJENE I ADAPTIVNI GENI

S obzirom da su procijene u promjeni adaptivnih gena relativno pouzdana metoda praćenja utjecaja onečišćenja na genom, a još uvijek nisu u potpunosti popularizirana metoda odlučila sam malo pobliže obraditi tu temu. Nakon što sam objasnila genetske adaptacije i način praćenja iste, odlučila sam objasniti što su uopće adaptivni geni, kako se pronalaze, koje metode služe za obradu podataka o adaptivnim promjenama i koju potencijalnu ulogu oni imaju u predviđanju odgovora na onečišćenje kod raznih organizama.

### 5.1. UTVRĐIVANJE GENA KANDIDATA

Set gena za koje pretpostavljamo da reagiraju na promjene u okolišu izazivajući adaptivne promjene nazivaju se geni kandidati (Steiner i sur., 2007.). Da bi se pojedini gen proglasio kandidatom mora imati odgovarajući položaj na genomu te bi trebao kodirati proteine za koje je poznato da sudjeluju u pojedinim regulacijskim mehanizmima traženog stanja, bilo na temelju podataka iz literature ili rezultata prethodnih istraživanja.

Neke od najkorištenijih metoda u pronalaženju gena kandidata su A priori kandidati, microarray metoda, QTL mapiranje, traženje selektivne prednosti i traženje mutanata.

Specifični aleli mogu se pronaći jednako u kodirajućoj i nekodirajućoj regiji, čemu govori u prilog da na adaptivne promjene jednako utjeću regulatorne i strukturne promjene, ali i duplikacija i gubitak gena (Steiner i Hoekstra, 2007., Chung, 2007.).

#### 5.1.1. A priori kandidati

Geni kandidati za adaptivne promjene su često očitni iz nekih ranijih biokemijskih istraživanja ili su se već prije spominjali kao genetski markeri u promjenama okoliša. Neki od primjera su fosfoglukoza izomeraza u leptira (Hanski i Saccheri, 2006.) i alkohol dehidrogenaza (ADH) kod *Drosophille melanogaster*. Proučavajući izoforme enzima ADH došlo se do zaključka da su ovisne o temperaturi. Alel ADH<sup>s</sup> se pojavljuje u većem broju pri višoj temperaturi, čime čini taj gen dobrim kandidatom za praćenje odgovora na promjenu temperature. Konzistentno sa tim zapažanjem je i činjenica da je najveća frekvencija alela ADH<sup>s</sup>

u tropskim područjima, ali je također zapaženo da se u zadnjih dvadeset godina ukupna frekvencija tog alela još povećala (Rank i sur., 2007.).

Također postoje takvi primjeri kod biljaka, konkretno vrste *Pinus eduli* kod koje možemo pratiti ovisnost različitih alela glicerat-dehidrogenaze (GLY) u ovisnosti o količini vlage, što ih čini dobrim markerima za klimatske promjene. Postoje tri alela GLY, a razlika se može vidjeti i u fenotipu. Jedan od tri alela je češći na sušim mjestima i u negativnoj je korelaciji sa ljetnim padalinama. Fenotipska razlika se vidi na dužim i užim pučima te boljoj vijabilnosti i rastu na suhim vulkanskim tlima, što ga čini dobrim markerom za nadgledanje adaptacije vrste pri različitim količinama vlage (Mitton i Duran, 2004.).

### **5.1.2. Istraživanja ekspresije gena**

U ovu skupinu spada DNA microarray i ostale tehnike koje prate promjene na razini transkripcije gena (Knight, 2006.).

DNA microarray je zapravo metoda višestruke hibridizacije na stakalcu, a ponegdje se koristi ime biočip čime se sugerira visoka gustoća "podataka" na maloj površini. Biočip se može koristiti kako na laboratorijskim tako i na prirodnim vrstama koje nisu nužno modelni organizmi. Metoda višestruke hibridizacije se uglavnom koristi za praćenje razlike u ekspresiji gena različitih linija iste vrste, pod utjecajem različitih ekoloških uvjeta, čime možemo otkriti neke gene koji odgovaraju na stresne uvjete. Kao primjer možemo navesti istraživanje koje su proveli Knight i suradnici da bi usporedili rezultate odgovora biljke vrste *Boechera holboellii* na suhe i vlažne uvjete. Na temelju cDNA – AFLP metode pokazana je razlika u fenotipskim promjenama, ali i u ekspresiji gena dviju populacija kao odgovor na vodeni stres, odnosno sušu.

Ograničavajući faktor u istraživanjima je što rezultati ponekad nisu konzistentni u različitim istraživanjima.

### **5.1.3. Gensko mapiranje**

QTL (engl. *quantitative trait loci*) ili u prijevodu mjesto količinskih značajki, je genski lokus koji je identificiran na temelju statističke analize složenog fenotipa, kao npr. visina ili masa, a koji je uglavnom uzrokovan interakcijom više gena pod utjecajem vanjskih čimbenika.

QTL mapiranje može identificirati dijelove genoma u kojima je došlo do adaptivne promjene. Uspoređivanjem raznih modela genske ekspresije došlo se do zaključka da su najveće

adaptivne promjene u kontroli genske ekspresije vezane za promjene u promotorskoj regiji ili regulatornim elementima.

Kao primjer za ovu metodu navodi se istraživanje u kojem je ispitivan set gena MT koji kodiraju metalotioneine. Metalotioneini su termostabilni proteini koji imaju veliki afinitet prema kationima teških metala, a ujedno su i specifični biomarker za onečišćenje teškim metalima. Novija istraživanja govore da su novi MT geni, strukturalne promjene i promjene u ekspresiji povezane sa adaptacijom na okolišno onečišćenje teškim metalima. Populacije vrste *Drosophilla melanogaster* i *Orchesella cincta* (Janssens, 2007.) imaju otpornost na onečišćenje teškim metalima, međutim kod člankonožaca je ona rezultat promjene u ekspresiji, a kod mušice u duplikaciji MT gena (Chen, 2007.; Maroni i sur., 1987.).

Jedan od najistraživanijih primjera pomoću QTL mapiranja je vrijeme cvjetanja kod vrste *A. thaliana*, koje je povezano sa sušom. Naime pronađeno je 28 lokusa koji utječu na razliku u vremenu cvjetanja pod različitim uvjetima. Četiri lokusa pokazuju veliku ulogu, neki lokusi su epistatski, a ostali su pokazali zamjetne učinke samo u određenim okolišnim uvjetima (Engelmann i Purugganan, 2006.).

#### **5.1.4. Traženje selektivne prednosti (selective sweep)**

Selektivna prednost je redukcija ili eliminacija varijabilnosti u susjednim nukleotidima molekule DNA kao rezultat nedavne i jake pozitivne prirodne selekcije (Storz, 2005.). Ona se može dogoditi kada se pojavi nova mutacija koja povećava fitnes jedinke u odnosu na populaciju.

Jedna od metoda kojima se može provjeriti nastanak selektivne prednosti je vezna neravnoteža ili model divergencije. Prednost ove metode je što se istraživanja mogu raditi na prirodnim populacijama.

#### **5.1.5. Pretraživanje mutanata**

Mutanti se mogu pretraživati na već postojećim linijama prateći neko svojstvo ili se mogu napraviti *de novo* mutanti pomoću kemijske mutageneze. S obzirom da su za ovakva istraživanja potrebna proučavanja na nekoliko tisuća linija, ova metoda je ipak ograničena na modelne organizme (Telonis-Scott i Hoffmann, 2007.). Jedan od primjera traženja takvih mutanata je, na primjer traženje novog svojstva otpornosti na insekticide.

## 5.2. KORIŠTENJE ZNANJA O ADAPTIVNIM PROMJENAMA

Iako se tokom evolucije gube neki geni ili se događa duplikacija nekih gena, ipak je velika većina gena zapravo očuvana kod srodnih organizama. To se dokazalo na usporedbi dvanaest genoma vinske mušice gdje se pokazalo da je 97.5% regije koja kodira proteine, nasljeđeno. To ima veliki značaj jer nam omogućuje da istraživanja na genima kandidatima neke vrste primjenimo na neke srodne vrste. Ali isto tako je istraživanje pokazalo da geni koji su povezani sa odgovorom na okolišna onečišćenja poput kemoreceptora, detoksikacije i obrane evoluiraju puno brže i podliježu promjenama duplikacije ili gubitka gena (Clark, 2007.).

Bez obzira na to što se pronašao nivo konzerviranosti na razini gena među različitim vrstama istog podrijetla, odgovori na selekciju i dalje mogu biti jako nepredvidljivi jer postoji nekoliko gena koji utječu na isto svojstvo.

Međutim ipak postoji mjesta za optimizam jer se, na primjer kod gena za rezistenciju na insekticide i fungicide ipak može pronaći određena predvidljivost što se tiče adaptacije gena i to čak i kod različitih vrsta. Rađena su istraživanja na komarcima, gdje je zaključeno da bez obzira što jedna vrsta razvija otpornost duplikacijom, a druga transpozicijom, obje mutacije pogađaju isti gen- gen za detoksikaciju (Daborn, 2002.).

Drugi dokaz koji potvrđuje tezu o predviljivosti je taj što je mehanizam nošenja sa stresom u principu isti kod većine organizama. Tu se posebno navodi primjer proteina stresa Hsp 70, koji je povezan sa odgovorom na promjene u temperaturi kod raznih organizama poput mikroorganizama, biljaka pa sve do beskralježnjaka i kralježnjaka.

Kao treći primjer imamo predvidljivost na nivou genetskih promjena kod mikroorganizama, konkretno kod *E.coli* gdje su primjećene iste genetske promjene na temperaturni šok kroz 2000 generacija, a koje su dovele do povećanja fitnesa i boljeg preživljenja.

I kao zadnji primjer, navode se iste promjene u adaptivnim genima ili neutralnim markerima na potpuno različite okolišne uvjete, što bi značilo da postoji konzistentni način odgovora na različite stresne situacije kod različitih vrsta.



## 6. OGRANIČENJA GENETSKIH ADAPTACIJA

Kao što sam već ranije spomenula, postoje ograničenja u adaptaciji, odnosno organizam se neće konstantno moći adaptirati promjenama klime i onečišćenju.

Neki od razloga koji se spominju u ograničavanju genetske adaptacije su povećanje broja pseudogena i povećan gubitak određenih razreda gena te postepeno propadanje nekih dijelova DNA koji nisu pod izravnom selekcijom (Harrison i Gerstein, 2002.). Naime, takvi geni kodiraju za neka svojstva koja ne mogu pridonijeti brzom adaptaciji u bližoj budućnosti.

Kao primjer propadanja gena navodi se uzročnik lepre *Mycobacterium leprae* kojem su geni povezani sa anaerobnom respiracijom propali, što se povezuje sa činjenicom da ta bakterija ne može naseljavati toplije dijelove tijela. Isto tako, smanjen broj gena za detoksikaciju kod pčela se povezuje sa činjenicom da su osjetljivije na brojne pesticide.

Kod čovjeka također postoji primjer gubitka gena i to onih gena koji se povezuju sa mogućnošću okusa gorkog. Naime geni za gorko nisu pod prirodnom selekcijom, jer čovjek već duže vremena nije u opasnosti od otrovne biljne hrane.

Propadanje DNA može se dogoditi kada neki geni nisu pod izravnom selekcijom, kada su se u njima nakupile brojne mutacije ili ako postoji direktna selekcija na gubitak funkcije.

Jednom izgubljena funkcija se u principu teško ponovno uspostavlja.

## SAŽETAK

Sa pojačanim onečišćenjem okoliša koji uzrokuje čovjek, razni organizmi se moraju nositi na razne načine. Samo onečišćenje može imati direktan ili indirektan utjecaj. Kao direktan utjecaj navode se razne mutacije i oštećenja DNA molekule i kromosoma, a kao indirektan utjecaj genetski drift i genetska adaptacija. Genetska adaptacija obuhvaća brze genetske promjene koje odgovaraju na prirodne promjene i koje će omogućiti bolju vijabilnost nekog organizma, odnosno populacije. Međutim genetske adaptacije se ne mogu stalno odvijati, jer postoji spora selekcija koji eliminira jedinke podložne mutacijama.

Komparativne analize nam omogućuju da se rezultati dobiveni na jednim genima kandidatima primjene i na druge organizme uključujući i vrste koje nisu modelni organizmi.

## SUMMARY

With substantial and increasing environmental pollution which is caused by man, different organisms have to cope with it in various ways. Contamination itself may have direct or indirect influence. Direct effects are set of various mutations and lesions which implicate DNA molecules and chromosomes, and indirect effects are genetic drift and genetic adaptation. Genetic adaptation includes rapid genetic changes that are response to environmental changes, and that will provide better viability for some organism or population. However, genetic adaptation can not be conducted to infinity because there is a slow selection, that eliminates the individuals subjected to mutations.

Comparative analysis make it possible to apply results, which are obtained in a single application of candidate loci, on other organisms, including species that are not model organisms.

## LITERATURA

Anderson, S.L., Harrison, F.L.: In Situ Evaluations of Biological Hazards of Environmental Pollutants. Plenum Press, New York, 81-93 (1990).

Appelgate, L.A. and Ley, R.D.: Mut. Res. 198, 85-92 (1988).

Armbuster, W.S., Schwaegerle, K.E.: Journal of Evol. Biol. 9, 261-276 (1996).

Baird, D.J., Maltby, L., Greig-Smith, P., Douben, P.E.T. Putting the 'ECO'- into ECOTOXICOLOGY. SETAC Publication, vol 4., 1-4 (1996).

Belfiore, N.M., Anderson, S.L.: Genetic patterns as a tool for monitoring and assessment of environmental impacts: the example of genetic ecotoxicology. Environ. Monitor. Assess. 51, 465-479 (1998).

Bickham, J.W., Sandhu, S., Hebert, P.D.N., Chikhi, L., Athwal, R.: Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. Mut. Res. 463, 33-51 (2000).

Bickham, J.W., Smolen, M.J.: Environ. Heal. Persp. 102, 25-28 (1994).

Boulding, E. G. & Hay, T.: Genetic and demographic parameters determining population persistence after a discrete change in the environment. Heredity 86, 313-324 (2001).

Chung, H. et al.: Cis-regulatory elements in the Accord retrotransposon result in tissue-specific expression of the *Drosophila melanogaster* insecticide resistance gene Cyp6g1. Genetics 175, 1071-1077 (2007).

Cousyn, C. et al.: Rapid local adaptation of zooplankton behavior to changes in predation pressure in the absence of neutral genetic changes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 6256-6260 (2001).

Dixon, D.R., Pruski, A.M., Dixon, L.R., Jha, A.N.: Marine invertebrate eco-enotoxicology: a methodological overview. Mutagenesis 17, 495-507 (2002).

Engelmann, K. & Purugganan, M.: The molecular evolutionary ecology of plant development: flowering time in *Arabidopsis thaliana*. Adv. Bot. Res. 44, 507-526 (2006).

Etterson, J. R.: Evolutionary potential of *Chamaecrista fasciculata* in relation to climate change. Evolution 58, 1459-1471 (2004).

Hanski, I. & Saccheri, I.: Molecular-level variation affects population growth in a butterfly metapopulation. PLoS Biol. 4, 719-726 (2006).

- Harrison, P. M. & Gerstein, M.: Studying genomes through the aeons: protein families, pseudogenes and proteome evolution. *J. Mol. Biol.* 318, 1155–1174 (2002).
- Hebert, P.D., Murdoch, M.: Genetic effects of contaminant exposure- towards an assessment of impacts on animal populations. *Sci. Tot. Environ.* 191, 23–58 (1996).
- Hoffmann A. A., Willi Y.: Detecting genetic responses to environmental change, *Nat.* vol 9, 421-432 (2008)
- Janssens, T. K. S. et al. Recombinational microevolution of functionally different metallothionein promoter alleles from *Orchesella cincta*. *BMC Evol. Biol.* 7, 88 (2007).
- Klerks, P.L., Lenington, J.S.: *Biol. Bull* 176, 135-141 (1989).
- Knight, C. A. et al.: Expression profiling and local adaptation of *Boechera holboellii* populations for water use efficiency across a naturally occurring water stress gradient. *Mol. Ecol.* 15, 1229–1237 (2006).
- Kondrashov, A.S.: *J. Theor. Biol.* 175, 583-594 (1995).
- Kopp, M. & Hermisson, J.: Adaptation of a quantitative trait to a moving optimum. *Genetics* 176, 715–719 (2007).
- Kristensen, T. N. et al.: Costs and benefits of cold acclimation in field-released *Drosophila*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 105, 216–221 (2008).
- Kruuk, L. E. B. & Hadfield, J. D.: How to separate genetic and environmental causes of similarity between relatives. *J. Evol. Biol.* 20, 1890–1903 (2007).
- Kurelec, B.: *Mar. Environ. Res.* 35, 141-348 (1993).
- Lynch, M., Conery, J., Bürger, R.: Mutation accumulation and the extinction of small populations. *Am. Nat.* 146, 489–518 (1995).
- Lynch, M., Conery, J., Bürger, R.: *Am. Nat.* 146, 489-518 (1995).
- Maroni, G., et al.: Metallothionein gene duplications and metal tolerance in natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 117, 739–744 (1987).
- Maroni, G. et al.: Elements segregate in promoters of small heat-shock genes in *Drosophila* populations. *J. Evol. Biol.* 20, 2056–2066 (2007).
- Medina, M. H., Correa, J.A., Barata C.: Micro-evolution due to pollution: Possible consequences for ecosystem responses to toxic stress, *Chemosphere* 67, 2105-2114 (2007).

- Mitton, J. B. and Duran, K. L.: Genetic variation in piñon pine, *Pinus edulis*, associated with summer precipitation. *Mol. Ecol.* 13, 1259–1264 (2004).
- Muller, L. A. H., Vangronsveld, J. & Colpaert, J. V.: Genetic structure of *Suillus luteus* populations in heavy metal polluted and nonpolluted habitats. *Mol. Ecol.* 16, 4728–4737 (2007).
- Parker, E.D. et al.: Stress in ecological systems. *Oikos* 86, 179–184 (1999).
- Rank, N. E. et al.: Phosphoglucose isomerase genotype affects running speed and heat shock protein expression after exposure to extreme temperatures in a montane willow beetle. *J. Exp. Biol.* 210, 750–764 (2007).
- Rosenberg, D.M., Resh, V.H.: *Freshwater Biomonitoring and Benthic Macroinvertebrates*. Chapman & Hall, New York, USA (1993).
- Sadinski, W.J., Leavay, G., Wilson, M.C., Hoffman, J.R., Bodell, W.J., Anderson, S.L.: *Aquat. Toxicol.* 32, 333–352 (1995).
- Stein, L.R., Theodorakis, C.: *Comp. Biochem. and Physiol.* 113C, 273–276 (1996).
- Steiner, C. C., Weber, J. N. & Hoekstra, H. E.: Adaptive variation in beach mice produced by two interacting pigmentation genes. *PLoS Biol.* 5, 1880–1889 (2007).
- Van Straalen, N. M. and Timmermans M.: Genetic variation in toxicant-stressed populations: an evaluation of the ‘genetic erosion’ hypothesis. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 8, 983–1002 (2002).
- Vitousek, P. M., Mooney, H. A., Lubchenco, J. & Melillo, J. M.: Human domination of Earth’s ecosystems. *Sci.* 277, 494–499 (1997).
- Weeks, B.A. et al.: *Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. Lewis Publishers, Chelsea, 211–234 (1992).