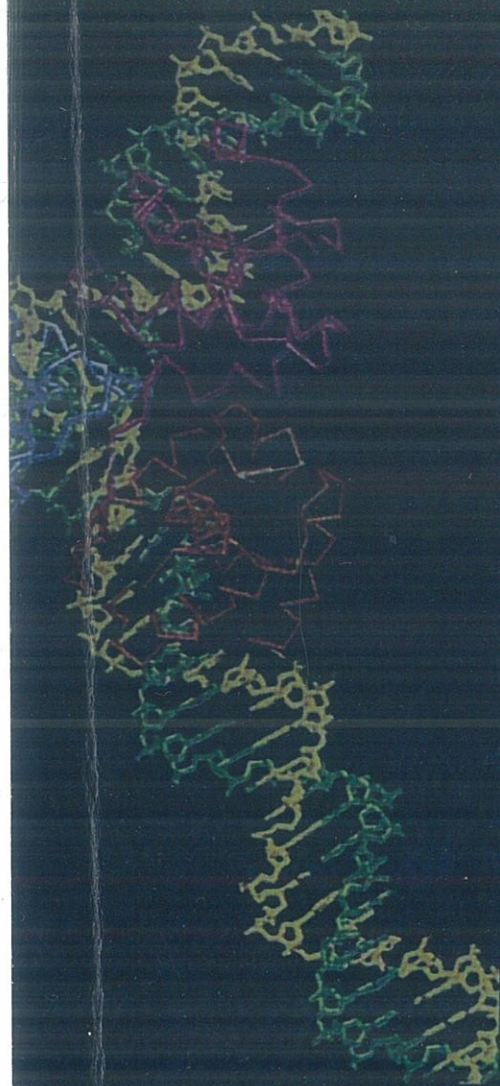
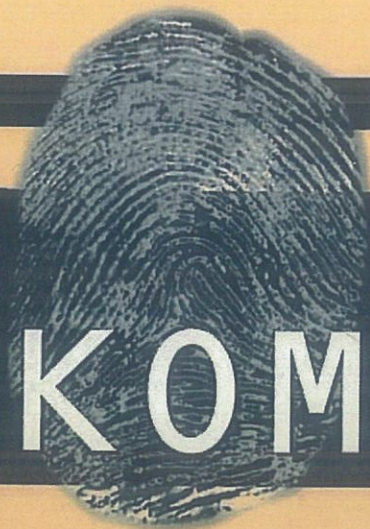


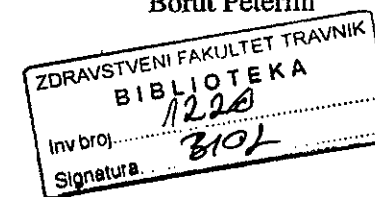
EMIRA ĐURIČIĆ
RIFET TERZIĆ
MILJENKO KAPOVIĆ
BORUT PETERLIN



BIOLOGIJA sa
HUMANOM
GENETIKOM



Emira Đuričić
Rifet Terzić
Miljenko Kapović
Borut Peterlin



BIOLOGIJA SA HUMANOM GENETIKOM

 Ocpu

Sarajevo, 2005.

AUTORI:

*Prof. dr. sci. Emira Đuričić,
Medicinski i Farmaceutski fakultet Univerziteta u Sarajevu.*

*Prof. dr. sci. Rifet Terzić,
Medicinski i Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Tuzli,
šef Odsjeka za biologiju.*

*Prof. dr. sci. Miljenko Kapović (dr. med.),
Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci,
šef Zavoda za medicinsku biologiju, dekan fakulteta.*

*Prof. dr. sci. Borut Peterlin (dr. med.),
Medicinski fakultet Univerziteta u Ljubljani,
direktor Centra za medicinski genetiku Kliničkog Centra za ginekologiju i akušerstvo.*

RECENZENTI:

*Prof. dr. sci. Pavao Rudan,
Prirodno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu,
direktor Instituta za antropologiju.*

*Doc. dr. sci. Danijel Petrović (dr. med.),
Medicinski fakultet Univerziteta u Ljubljani,
Zavod za histologiju i embriologiju*

Izdavač:
Medicinski fakultet Univerziteta u Sarajevu

Štampa:
CPU - Sarajevo

DTP:
Almir Kuduz

Tiraž:
500 kom.

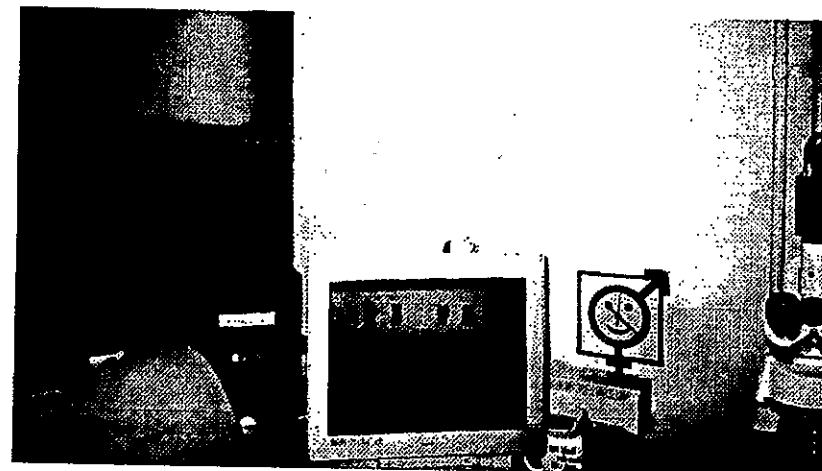
*Mišljenjem Federalnog ministarstva obrazovanja i nauke
Federacije Bosne i Hercegovine, broj 04-15-5568/04
od 27.12.2004. godine, ovo izdanje je oslobođeno
plaćanja poreza na promet proizvoda.*

CIP - Katalogizacija u publikaciji
Nacionalna i univerzitetska biblioteka
Bosne i Hercegovine, Sarajevo

577.2/.27(075.8)
575.1/.2:61(075.8)

BIOLOGIJA sa humanom genetikom / Emira Đuričić
... Set al.Č. - Sarajevo : Medicinski fakultet,
2005. - 401 str. : ilustr. ; 25 cm

ISBN 9958-608-24-3
Bibliografija: str. 387
1. Đuričić, Emira
COBISS.BH-ID 14053382



ZAVOD ZA GINEKOLOGIJU
PERINATOLOGIJU I NEPLODNOST
"MEHMEDBAŠIĆ"

**Zahvaljujemo se donatorima koji su podržali
izdavanje knjige**

Jedna od najdinamičnijih i najviše proučavanih oblasti iz područja biologije jeste nauka o ćeliji, posebno zadnje decenije prošlog vijeka. Danas su već poznate kompletne sekvence kvasca i bakterijskog genoma ili *Drosophila melanogaster* kao i mnoge sekvence genoma brojnih biljaka. Projekat otkrivanja sekvenci humanog genoma je, također, veoma brzo napredovao tako da je već kompletno sekvenciran. Sekvenciranjem genoma učinjen je veliki napredak, čime je otvoren put nizu novih prilaza u razumijevanju regulacije i funkcije ćelije, što je, također, nesumljivo, otvorilo i mogućnosti u proučavanju biologije ćelije i molekularne strukture.

Posebno je očigledan napredak u oblasti molekularne biologije eukariotskih ćelija, u otkrivanju kontrolnih mehanizama unutar ćelije, kao i procesa inicijacije DNA u procesu replikacije, objašnjena je histonska acetilacija, zatim objašnjena je jasna veza između hromatinske strukture i regulacije transkripcije ili opisani su novi mehanizmi regulacije translacije. Veliki napredak je postignut u razjašnjenju i razumijevanju osnovnih funkcija ćelije, kao transporta proteina u ćeliju ili iz ćelije. Zatim, transport proteina u endoplazmatski retikulum i transport u Goldžijev kompleks, ili molekularni mehanizam vezikularnog transporta kao i mehanizmi proteinskog importa u mitohondrijama i hloroplastima. Do detalja je proučena ćelijska signalizacija i ćelijski ciklus. Također, značajan napredak je postignut u razumijevanju regulacije programirane ćelijske smrti i signalizaciji puta ćelijske kontrole u toku embrionalnog razvoja.

Napredak u oblasti osnovne biološke nauke išao je paralelno sa progresom u medicinskim i srodnim oblastima. U novije vrijeme dostignuća ovih dviju nauka u velikoj mjeri su isprepletana i objedinjena. Njihov progres ide paralelno.

Novo izdanje udžbenika uključuje sve ove najnovije informacije i odgovore koji su izloženi. Osnovni tekst je upotpunjen savremenim dostignućima i pristupačnim sadržajima namijenjenim studentima medicine i srodnih fakulteta, koji slušaju kurs o ćeliji, molekularnoj biologiji ćelije kao i osnovama humane genetike.

Udžbenik je organizovan u četiri dijela. Svaki dio je cjelina za sebe, propraćena citiranom literaturom koja obuhvata najrelevantnije svjetske knjige i časopise iz ove oblasti.

U prvom dijelu knjige prikazane su osnove evolucije ćelije, hemija ćelije struktura i funkcija ćelije. Drugi dio knjige obrađuje reprodukciju ćelije i osnovne principe nasljeđa. Treći dio fokusiran je na molekularnu biologiju ćelije, posebno na dijelove koji opisuju organizaciju genoma; DNA replikacija, reparacija, i rekombinacija; transkripcija RNA, sinteza i obrada; i sinteza, obrada i regulacija proteina. Redoslijed izlaganja u ovom poglavlju prati tok genetske informacije i pruža koncizan, savremen pregled ovih tema. Na kraju, četvrti dio obrađuje odabrana poglavlja iz humane genetike sa posebnim osvrtom na organizaciju humanog genoma, prenatalnu dijagnostiku, terapiju genima i genetiku kancera.

U izlaganju materije kontinuirano je ukazivana uska veza između biologije ćelije i medicine, što je propraćeno ilustriranim priložima iz molekularne medicine. Želi se istaknuti veliki uticaj molekularne i celularne biologije na zdravlje čovjeka, što istovremeno ima namjenu davanje informacije studentima.

Preuzeti su brojni podaci iz savremene literature, brojnih referenci, monografija, revijskih članaka i stručnih izdanja. Kao dokumentacija upotrijebljene su brojne elektronske mikrografije, svetlosne mikrografije, šeme i crteži.

Na kraju, udžbenik je namijenjen svima onima koji žele da steknu ili prošire znanje iz ovih oblasti. S obzirom na to da služi kao udžbenik za sticanje inicijalnih saznanja onima koji već imaju osnovno znanje, bit će koristan pomagač i podsjetnik.

Sadržaj ukratko

I Uvod

- 1 Porijeklo i evolucija ćelije 23
- 2 Struktura i funkcija ćelije 37

II Osnovi molekularne biologije

- 3 Prenos genetske informacije 91
- 4 Rekombinacija genoma DNA 115
- 5 Sinteza i obrada RNA 125
- 6 Sinteza proteina, obrada i regulacija 147
- 7 Geni 165
- 8 Hromosomi 181

III Reprodukcija i nasljeđe

- 9 Ćelijski ciklus 209 LIŠ - MEJOTA
- 10 Genetska determinacija razvića 247
- 11 Mendelijanska genetika i nasljeđe 271

IV Humana genetika

- 12 Organizacija humanog genoma 307
- 13 Humani hromosomi, Genetski savjet i prenatalna dijagnostika 323
- 14 Genska terapija 341
- 15 Genetska determinacija imunoloških svojstava 351
- 16 Genetika tumora 371

I UVOD

1

PORijeklo i EVOLUCIJA

ĆELIJE 23

Prva ćelija 23

Evolucija metabolizma 25

RAZVOJ MULTICELULARNIH ORGANIZAMA 26

Prikaz Prokariota danas 27

Eukariotska ćelija 29

HEMIJA ĆELIJE 30

MOLEKULSKA STRUKTURA ĆELIJE 31

Proteini 31

Lipidi 22

Ugljeni hidrati 32

Centralna uloga enzima u

biološkoj katalizi 33

Molekularna medicina:

Fenilketonurija 34

FIZIČKA SVOJSTVA ĆELIJE 35

2

STRUKTURA I FUNKCIJA ĆELIJE 37

CITOPLAZMA 38

Struktura citoplazme 38

Citoskelet i citosol 39

Molekularna medicina:

Muskularna distrofija i citoskelet 42

Međućelijske interakcije 43

NUKLEUS 45

Organizacija nukleusa (nuklearna membrana) 46

Funkcija jedrove membrane 47

Unutrašnja organizacija jedra 48

NUKLEOLUS 50

Organizacija nukleolusa i

ribosomalni RNA geni 50

CITOPZMATSKI ORGANELI 52

RIBOSOMI 52

(organizacija ribosoma) 52

Formiranje ribosoma 53

Funkcija ribosoma 55

BIOENERGETIKA I

METABOLIZAM 56

MITOHONDRIJI 56

Organizacija mitohondrija 57

Genom mitohondrija 58

Funkcija mitohondrija 62

Glikoliza i ćelijsko disanje

(sinteza molekula ATP) 63

Glikoliza 63

Ćelijsko disanje 64

Transport elektronskog lanca 64

Mehanizam oksidativne

fosforilizacije 65

RAZDVAJANJE I TRANSPORT

PROTEINA: ENDOPLAZMATSKI

RETIKULUM, GOLDŽIJEV

KOMPLEKS I LIZOSOM 66

ENDOPLAZMATSKI

RETIKULUM 66

Sklapanje, obrada i selekcija proteina

u endoplazmatskom retikulumu 67

GOLDŽIJEV KOMPLEKS 69

Organizacija Goldžijevog

kompleksa 70

Mehanizam vezikularnog

transporta 72

LISOSOMI 72

Lisosomi i kisele hidrolaze 73

Endocitoza (formiranje lisosoma) 74

Fagocitoza i autofagija 75

LISOSOMI I BOLESTI 77

Molekularna medicina:

Gauchers bolest i lisosomi 78

UITRASTRUKTURA I SASTAV

ĆELIJSKE MEMBRANE 79

Struktura plazma membrane 80

FUNKCIJA ĆELIJSKE

MEMBRANE 82

Permeabilitet 82

Transport molekula kroz ćelijsku

membranu (transport malih

molekula) 82

Olakšana difuzija i

aktivni transport 84

Molekularna medicina

Cistična fibroza 87

LITERATURA 88

II OSNOVI MOLEKULARNE BIOLOGIJE

3

PRENOS GENETSKE INFORMACIJE 91

STRUKTURA DNA 92

REPLIKACIJA

DEOKSIRIBONUKLEINSKE

KISELINE (DNA) 97

REPLIKACIJA

CIRKULATORNOG

HROMOSOMA BAKTERIJE

E. COLI 102

REPLIKACIJA

JEDNOLANČANIH DNA I

RNA-Virusa 103

REPARACIJA DNA 104

Direktno otklanjanje DNA

promjena 104

Reparacija putem fotoreaktivacije 105

Reparacija isjecanjem 107

Postreplikativna reparacija 110

GENETSKA REGULACIJA

MEHANIZMA

REPARACIJE 112

BOLESTI USLOVLJENE

POREMEĆAJEM

MEHANIZMA ZA

REPARACIJU 113

4

REKOMBINACIJA

GENOMA DNA 115

Proizvođenje rekombinantnih DNA

molekula 115

Fragmentiranje DNA i restriktivne

endonukleaze 116

VEKTORI ZA

REKOMBINANTNU DNA 118

Virusni vektori 118

Plazmitski vektori 118

POVEZIVANJE FRAGMENTA

I ODABIR FRAGMENTA DNA

ZA KLONIRANJE 119

Unošenje rekombinantne DNA i kloniranje 120
Prepoznavanje, selekcija i izolacija kloniranog gena 121

DNA SEKVENCIRANJE 122

EKSPRESIJA KLONIRANIH GENA 123

AMPLIFIKACIJA KLONIRANE DNA UPOTREBOM PCR METODE 124

TEHNOLOGIJA REKOMBINANTNE DNA DOVELA JE DO REVOLUCIJE IZUČAVANJA ČELIJA 124

5

SINTEZA I OBRADA RNA 125
PROCES TRANSKRIPCije 125

EUKARIOTSKA RNA POLIMERAZA I OPŠTI TRANSKRIPCIONI FAKTORI 127

RNA polimeraza 127
Opšti transkripcioni faktori i inicijacija transkripcije polimerazom II 127

Transkripcija polimerazom I i III 128

Cis-aktivnosti regulatornih sekvenci: promotori i enhancer sekvence 129

Struktura i funkcija transkripcionih aktivatora 130
Represori u procesu transkripcije 130

Hromatinska struktura hromosoma i transkripcija 131

OBRADA RNA 132

INFORMACIONA RNA (iRNA) 132

Mehanizam splajsinga 133

Genetski kod 136

OBRADA TRANSPORTNE RNA (tRNA) 138

OBRADA RIBOSOMALNE RNA (rRNA) 140

RNA VIRUSI I REVERZNA TRANSKRIPCija 142

Molekularna medicina:

Pit-1 transkripcioni faktor i deficit hormona rasta 145

6

SINTEZA PROTEINA, OBRADA I REGULACIJA 147

Uloga RNA u sintezi proteina 147

Organizacija iRNA i inicijacija translacije 148

Organizacija tRNA i rRNA 150

PROCES TRANSLACIJE (sinteza proteina) 152

REGULACIJA TRANSLACIJE 158

Genetska regulacija translacije 158

Sistem pozitivne i negativne kontrole sinteze proteina (laktozni operon) 159

REGULACIJA SINTEZE PROTEINA NA NIVOU TRANSKRIPCije 161

REGULACIJA SINTEZE PROTEINA NA NIVOU TRANSLACIJE 162

KONSTITUTIVNA SINTEZA PROTEINA 162

Molekularna medicina:

Antibiotici i sinteza proteina 163

7

GENI 165

MOLEKULARNA DEFINICIJA GENA 165

MOLEKULARNA ORGANIZACIJA GENA 166

Protein-kodirajući geni mogu biti usamljeni ili pripadati familiji gena 167

Tandemi ponovljenih gena koji kodiraju rRNAs, tRNAs i histone 168

Kontrolni geni i geni regulatori 170

Regulacija genske ekspresije u eukariotskim ćelijama 170

Ekspresija genske informacije 171

Fenotipska ekspresija gena 172

MUTACIJE GENA 173

HEMIJSKI I FIZIČKI MUTAGENI 174

GENI I GENSKE BOLESTI 176

Molekularna medicina:

Primjena DNA-testova u dijagnostici

Huntingtonove bolesti 179

8

HROMOSOMI 181

INTERFAZNI HROMOSOMI 182

Hromatin 182

Euhromatin i heterohromatin 184

Centromera 184

Telomere 185

MOLEKULARNA STRUKTURA INTERFAZNOG HROMOSOMA 185

HROMOSOMI U MITOZI 186

POSEBNI HROMOSOMI 189

Lampbrush hromosomi 189

Politeni hromosomi 190

Amplifikacija gena 191

VARIJANTE HROMOSOMSKIH PROMJENA 192

VARIJANTE U HROMOSOMSKOJ STRUKTURI 192

Delecije 192

Duplikacije 194

Inverzije 195

Translokacije 196

Ring-hromosom 198

Dicentrični hromosomi 199

Strukturne aberacije spolnih hromosoma 199

VARIJANTE U PROMJENI BROJA HROMOSOMA 200

Poliploidija 201

Aneuploidija i tipovi nerazdvajanja 202

FUNCIJE EUKARIOTSKOG HROMOSOMA 205

LITERATURA 206

III REPRODUKCIJA I NASLJEDE

9

- ĆELIJSKI CIKLUS 209
- FAZE ĆELIJSKOG CIKLUSA 209
 - Regulacija ćelijskog ciklusa u toku rasta ćelije i ekstracelularni signali 210
 - Čekpoint ćelijskog ciklusa 212
 - Regulacija progresije ćelijskog ciklusa 213
- MITOZA 214
 - Re-formacija interfaznog nukleusa (kondenzacija hromatina) 214
- PROCES M-FAZE 215
 - Stadiji mitoze 216
 - MPF i progresija metafaze 217
 - Proteoliza i inaktivacija MPF: anafaza i telofaza 217
- MEJOZA 218
 - Proces mejoze I 219
 - Mejoza II 221
- MOLEKULARNI MEHANIZAM REKOMBINACIJE (crossingover) 221
 - Homologna rekombinacija 221
 - Multipli crossingover 224
 - Mitotički crossingover 226
 - Enzimi uključeni u homolognu rekombinaciju 227
 - Nehomologna rekombinacija 228
- GAMETOGENEZA 229
- OOGENEZA 229
 - Umnožavanje i rast jajne ćelije 229
 - Sazrijevanje jajne ćelije 230
- SPERMATOGENEZA 233

Spermiogeneza 234

- REPRODUKCIJA I GENETIČKA REKOMBINACIJA BAKTERIJA I VIRUSA 236
- KONJUGACIJA BAKTERIJA 236
 - Mapiranje bakterijskih hromosoma 238
 - Transformacija 240

- MOLEKULARNA GENETIKA VIRUSA 241
 - Virusi bakterija (bakteriofagi: fag T4 i fag) 241
 - Lizogeni ciklus i rekombinacioni mehanizmi 243
 - Transdukcija 245

10

- GENETSKA DETERMINACIJA RAZVIĆA 247
- OPLOĐENJE 247
 - Interakcija između gameta u procesu oplodnje 247
- EMBRIONALNI STADIJUMI 249
 - Brazdanje-segmentacija (tipovi brazdanja) 251
 - Neurulacija 252
 - Organogeneza 252
- REGULACIJA PROGRAMIRANE ĆELIJSKE SMRTI - APOPTOZA 253
 - Mehanizam apoptoze 254

EMBRIONALNA INDUKCIJA 255

- NUKLEOPLAZMATSKE REAKCIJE U PROCESU EMBRIOGENEZE 257
- MOLEKULARNE AKTIVNOSTI U EMBRIONALNOM RAZVOJU 259
 - Aktivnost jedra ovocita 259
 - Procesi biosinteze u zigoti 259
 - Proliferacija, diferencijacija i determinacija ćelija 260

- DIFERENCIJACIJA GENETIČKIH AKTIVNOSTI U PROCESU EMBRIOGENEZE 263
- REGULACIJA GENETIČKIH AKTIVNOSTI U PROCESU EMBRIOGENEZE 264
 - Regulacija na nivou transkripcije 265
 - Regulacija na nivou translacije 265
- DETERMINACIJA SPOLA 266
 - Uloga Y-hromosoma u determinaciji spola 267
- DIFERENCIJA SPOLOVA 267
 - Barrovo tjelašće 267
 - Bubnjarski štapić ili "drumstick" 268
 - Y hromosom I "F" tjelašće 269
 - Molekularna medicina: Fertilizacija in vitro 270

11

- MENDELJANSKA GENETIKA I NASLJEDE 271
- MENDELOVI EKSPERIMENTI 272
 - Princip segregacije 272
 - Princip nezavisnog kombinovanja 273
- POVRATNO UKRŠTANJE 275
- MENDELJANSKA GENETIKA U ČOVJEKA 276

Nasljeđivanje dominantnih svojstava 277
Nasljeđivanje recesivnih svojstava 280

- POLIGENO NASLJEĐIVANJE (interakcija gena) 282
 - Nasljeđivanje multipli allela 285
 - Pleiotropno djelovanje gena 285
- VEZANO NASLJEĐIVANJE 286
 - Rekombinacija (crossingover) vezanih gena 288
- NASLJEĐIVANJE VEZANO ZA SPOLNE HROMOSOME 291
 - X-vezano recesivno nasljeđivanje 291
 - X-vezano dominantno nasljeđivanje 294
 - Nasljeđivanje vezano za Y-hromosom (holandrično nasljeđivanje) 295
- NASLJEĐIVANJE OGRANIČENO SPOLOM 296
- EKSTRANUKLEARNO NASLJEĐIVANJE 296
 - Mitohondrijalno nasljeđivanje 296
 - Materinski efekti i citoplazmatsko nasljeđivanje 298
 - Nasljeđivanje infekcijom 299
 - Plazmidi 299
- PRIONI 300
 - Struktura priona 301
 - Sinteza (replikacija) normalnog i patološkog prionskog proteina 301
- VANHROMOSOMSKE MUTACIJE 302
- KARAKTERISTIKE EKSTRA NUKLEARNOG NASLJEĐIVANJA 303
- LITERATURA 304

IV HUMANA GENETIKA

12

ORGANIZACIJA HUMANOG GENOMA 307

Intermedijalne sekvence DNA 307
Simpl sekvence ili visoko repetitivne sekvence DNA 309
Nerepetitivna DNA 310
SNP(polimorfizmi pojedinačnih nukleotida) 310

KOLIČINA DNA U HUMANOM GENOMU 312

TEHNIKE MAPIRANJA HUMANIH GENA 313

Značaj projekta ljudski genom 319

13

HUMANI HROMOSOMI 323

Identifikacija hromosoma čovjeka 323

ABERACIJE HROMOSOMA 326

Sindromi i bolesna stanja kao posljedica numeričkih aberacija autosoma 327

Sindromi kao posljedica numeričkih aberacija spolnih hromosoma 329

Sindromi i bolesna stanja kao posljedica strukturnih aberacija hromosoma 330

Sindromi hromosomske nestabilnosti 331
Nomenklatura 332

GENETSKI SAVJET 333

PRENATALNA DIJAGNOSTIKA 335

Razlozi za prenatalnu dijagnostiku 335

Metode prenatalne dijagnostike 337

Amniocenteza 337

Biopsija horionskih čupica 338

Kordocenteza 338

Predimplantacijska genetska dijagnostika (PGD) 339

KONGENITALNE ANOMALIJE 339

14

GENSKA TERAPIJA 341

PRISTUPI U GENSKOJ

TERAPIJI 341

U zavisnosti od molekularnog mehanizma bolesti 341

Ex vivo i in vivo 342

Somatske ili spolne ćelije 343

NAČIN PRIJENOSA GENETSKOG MATERIJALA U ĆELIJE / TIJELO BOLESNIKA 344

Virusni vektori 344

Liposomi 345

Terapija gensko modificiranim ćelijama 345

DNA TESTIRANJE U

GENETSKO USLOVLJENIM

BOLESTIMA 347

PRISTUP DNA TESTIRANJU 347

Direktan DNA test 347

Indirektan DNA test 348

Tkiva za pretragu 349

Specifičnosti DNA testa 349

15

GENETSKA DETERMINACIJA IMUNOLOŠKIH SVOJSTAVA 351

KRV-SASTAV I FUNKCIJA 352

Eritrociti 352

Trombociti 353

Leukociti 354

IMUNOLOŠKI SISTEM 355

Ćelije imunološkog sistema 355

Antigeni 355

Antitijela-sinteza i molekulska struktura 356

Neke karakteristike pojedinih imunoglobulina 358

KOMPLEKS GENA GLAVNOG SISTEMA TKIVNE

SRODNOSTI

(HLA-sistem) 359

GENSKA REGIJA KLASE I 360

GENSKA REGIJA KLASE II 360

GENSKA REGIJA KLASE III 361

IMUNOLOŠKA REAKCIJA 362

GENETSKA DETERMINACIJA

KRVNIH GRUPA U ČOVJEKA 363

ABO-SISTEM 363

Rh-SISTEM 365

MNSs-SISTEM 366

HEMOGLOBINOPATIJE I

IMUNOGLOBINOPATIJE 367

KRVNE GRUPE I BOLESTI 368

Molekularna medicina:

AIDS I HIV 369

16

GENETIKA TUMORA 371

Razvoj i uzroci kancera 371

Tipovi kancera 371

Razvoj kancera 372

Uzročnici kancera 372

Specifičnosti kancer ćelija 373

VIRUSNI TUMORI 374

Hepatitis B virus 374

SV40 i Polioma virus 374

Papilomavirus 375

Herpesvirus 375

Adenovirus 375

Retrovirusi 375

ONKOGENI 376

Retroviralni onkogeni 376

Proto, -onkogeni (onkogeni u humanim kancerima) 378

Tumor supresorni geni 381

SAVREMENE TEORIJE O MEHANIZMU NASTANKA TUMORA 382

Hipoteza o djelovanju onkogenih

RNA virusa 382

DNA virusna hipoteza 383

Tumori kao posljedica poremećaja

genske kontrole transkripcije 384

Imunogenetska hipoteza 385

APLIKACIJA MOLEKULARNE BIOLOGIJE U KANCER

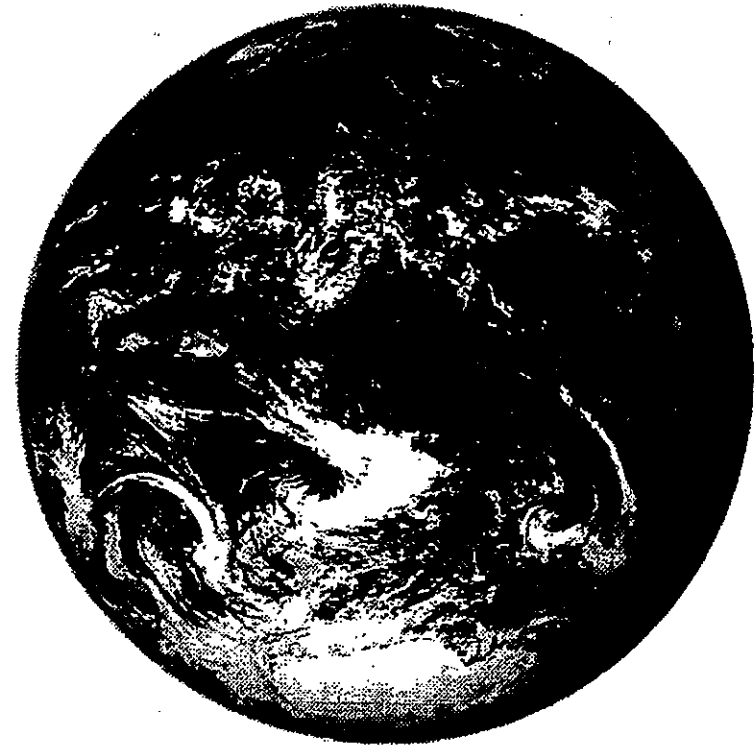
PREVENCIJI I TRETMANU 386

LITERATURA 387

POJMOVNIK 389

I

Uvod



-
- 1 Porijeklo i evolucija ćelije*
 - 2 Struktura i funkcija ćelije*

PORIJEKLO I EVOLUCIJA ČELIJE

Čelije su podijeljene u dvije grupe određene prema prisustvu nukleusa (jedra). Prokariotske čelije (bakterije) nemaju nukleus dok eukariotske čelije imaju nukleus čiji je genetski materijal odvojen od citoplazme. Prokariotske čelije su općenito male i jednostavne građe. Nemaju izdiferencirani nukleus, struktura genoma je jednostavnija, nemaju izdiferencirane organele i citoskelet. Razlike u građi ali isti osnovni molekularni mehanizam koji upravlja životom i prokariotskih i eukariotskih organizama, ukazuje na to, da sve čelije potiču od jednog prvobitnog pretka. Kako se razvila prva čelija? Kako je evoluirala kompleksnost i različitost koja se ispoljava u ćelijama danas?

Prva čelija

Smatra se da se prvi život pojavio prije od 3.8 biliona godina, približno 750 miliona godina nakon formiranja Zemlje. Kako je život bio organiziran, koja je prva čelija - majka ne može se reprodukovati u laboratoriji. Međutim, na osnovu nekoliko vrsta eksperimenata dobiveni su važni podaci na osnovu kojih je bilo moguće predvidjeti smjer nekih faza u ovom procesu.

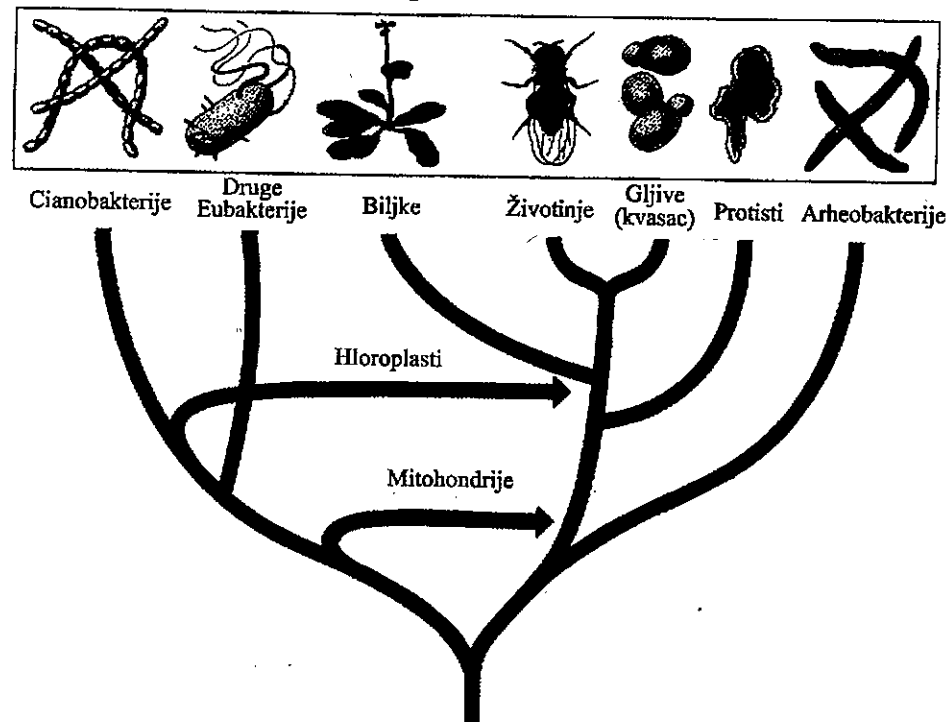
Prve pretpostavke potiču od 1920. godine i sugerišu da je bila moguća spontana polimerizacija jednostavnih organskih molekula u makromolekule sadržane u prvobitnoj zemljinoj atmosferi. U toku života zemlje atmosfera je sadržavala male količine slobodnog oksigena ili ne, umjesto toga sadržavala je u principu CO₂ i N₂ sa malom količinom gasa kao H₂, H₂S i CO. U takvim uslovima atmosfera je uz sunčevu energiju objezbjeđivala spontano formiranje organskih molekula. Spontano formiranje organskih molekula prvi puta je demonstrirano eksperimentalno 1950. kada je Stanley Miller prikazao da otpuštanje električnih varnica u mješavini H₂, CH₄ i NH₃ u prisustvu vode, dovodi do formiranja različitih organskih molekula, obuhvatajući i nekoliko amino kiselina. Sljedeći korak u evoluciji je bio formiranje makromolekula. Građa bloka monomera makromolekula je demonstrirana pri spontanjoj polimerizaciji, vjerodostojno prabiotičkom sadržaju. Zagrijavanje mješavine amino kiselina, naprimjer, rezultiralo je polimerizacijom polipeptida. Ali,

osnovna karakteristika makromolekula od kojih je evoluirao život mora biti sposobnost replikacije. Samo su makromolekule sposobne da direktno sintetišu nove kopije sebe koje su bile sposobne da se reprodukuju u procesu evolucije.

Od dvije važne grupe makromolekula (nukleinskih kiselina i proteina) u prezentiranim ćelijama, samo su nukleinske kiseline sposobne da se direktno repliciraju. Važan korak u razumijevanju molekularne evolucije bio je osamdesetih godina kada se pokušala razjasniti kataliza i broj hemijskih reakcija koje učestvuju u polimerizaciji nukleotida. Zbog toga je vjerovatno RNA bila inicijalni genetski sistem u ranim stadijima hemijske evolucije koja se bazirala na samo-replikaciji RNA molekula, period poznat kao RNA-svijet (Gilbert, 1986). Određena interakcija između RNA i amino kiselina evoluirala je u današnji genetski kod i replikaciju DNA i RNA kao genetski materijal.

Prva ćelija, pretpostavlja se nastala pri samoreplikaciji RNA, bila je ogradena područjem fosfolipida. Fosfolipidi su osnovni elemenat svih membrana prokariotskih i eukariotskih ćelija. Za molekule fosfolipida je karakteristično da se amplifiraju i jedan dio molekule je rastvorljiv u vodi a drugi nije. Imaju hidrofobne i hidrofilne lance. Fosfolipidi imaju duge u vodi nerastvorljive (hidrofobni) hidrokarbonske lance i rastvorljive (hidrofilne) grupe koje sadrže fosfate. Kada su u vodi, fosfolipidi se spontano skupljaju sa fosfatnim grupama okrenutim prema vanjskoj strani koja je u kontaktu sa vodom i hidrokarbonskim dijelom okrenutim prema unutrašnjosti. Takav fosfolipidni bilajer oblik je postavljen između dva vodena područja - naprimjer, odvajanje unutrašnjosti ćelije od vanjske sredine. Samoreplikacija RNA i povezivanje molekula u fosfolipidnu membranu je jedinica koja je sposobna da se samoreprodukuje u procesu evolucije i da RNA direktno sintetiše proteine. Ćelije formiraju zaštitni omotač, zatim, ksilem i flojem imaju ulogu u transportu vode i hrane kroz biljke. Životinjske ćelije se znatno razlikuju od biljnih ćelija. Humani organizam sadrži oko 200 različitih vrsta ćelija koje općenito strukturiraju pet različitih tipova tkiva: epitelno tkivo, konektivno, krv, nervno tkivo i mišićno tkivo. Epitelno tkivo ima više vrsta specijaliziranih ćelija za specifične funkcije, obuhvataju zaštitu (koža) absorpciju (obloge, male intestine), sekretorne (ćelije žlijezda) i druge. Krv, također, ima nekoliko tipova ćelija, čija je funkcija transport oksigena (eritrociti, granulociti, monociti, makrofage i imuni limfociti). Nervne ćelije imaju funkciju transmisije nervnih signala kroz tijelo. Nervno tkivo je građeno od nervnih ćelija ili neurona koji su visoko specijalizirani transmiteri signala iz vanjske sredine. Različiti tipovi senzornih ćelija, kao ćelije očiju ili sluznih kanala, specijalizirane su za prijem vanjskih signala iz okoline. Na kraju, nekoliko različitih tipova mišićnih ćelija odgovorne su za produkciju pokreta ili snage i jačine organa. Evolucija životinja jasno je ugradila razvoj razdvajanja i specijaliziranja ćelijskog nivoa, diferencijaciju, poredak specijaliziranih ćelija, počevši od pojedinačnih jajnih ćelija za oplodnju, pa dalje. Sve su to izazovi sa kojima se susreće molekularna biologija. Slika 1. prikazuje šemu evolucije ćelije

na osnovu današnjih prikaza predaka tj. prokariota koji su se razvijali preko duge tri linije: Arheobakterija, Eubakterija i Eukariota. Mitohondrije i hloroplasti potječu od endosimbiotskih asocijacija Arheobacter i Ciano Bacterija, odnosno predaka Eukariota (Knoll, 1992).



Slika 1. Evolucija ćelija Na osnovu današnjih prikaza evolucije ćelija pretci su prokarioti koji su se razvijali preko duge tri linije: Arheobakterije, Eubakterije i Eukariote. Mitohondrije i hloroplasti potiču od endosimbiotskih asocijacija Arheobakterija i Ciano bakterija, odnosno predaka Eukariota. (Prema Cooper, G. M. 2000.).

Evolucija metabolizma

Kako su ćelije nastale u moru od organskih molekula, to su morale uzimati i hranu i energiju iz okoline. Ali, takva situacija je samolimitirajuća i u takvim ćelijama je evoluirao jedan mehanizam za proizvodnju energije i sintezu molekula potrebnih za replikaciju. Razvoj i kontrola korištenja metaboličke energije je centar svih ćelijskih aktivnosti i taj osnovni princip energetskog metabolizma je evolucijski konzerviran u ćelijama. Sve ćelije upotrebljavaju adenozin 5-trifosfat (ATP) kao izvor metaboličke energije za pokretanje sinteze, ćelijske konstitucije, kao i za druge energetske potrebe i aktivnosti kretanja (muskulatura, kontrakcije). Mehanizam za proizvodnju ATP u ćeliji evoluirao je

kroz tri stadija, korespondirajući sa evolucijom glikolize, fotosinteze i oksidativnim metabolizmom. U inicijalnoj anaerobnoj atmosferi Zemlje, prvi procesi proizvodnje energije, vjerovatno, podrazumijevaju poremećaje organskih molekula u odsustvu oksigena. Ove reakcije su bile slične danas poznatoj glikolizi- anaerobni prekid glukoze do laktične kiseline, sa dobivenom energijom (ATP). U dodatku, upotreba ATP kao izvora međucelijske energije koju danas ćelije proizvode glikolizom dosljedno je sa mišljenjem da su se te reakcije dešavale vrlo rano u evoluciji. Generalno se smatra da je razvoj fotosinteze sljedeći veliki evolucionarni korak koji je dopuštao ćeliji korištenje sunčeve energije, neovisno o prethodno formiranim organskim molekulama. Prva fotosintetska bakterija, čija je evolucija trajala više od tri biliona godina, vjerovatno je koristila H₂S i CO₂ u organskim molekulama. Upotreba H₂O, kao donora elektrona i hidrogena za konverziju CO₂ u organski spoj, evoluirao je kasnije i imao je važne kosekvence za izmjenu zemljine atmosfere. Upotrebom H₂O u fotosintetičkim reakcijama produkovan je slobodni O₂; smatra se da je ovaj mehanizam odgovoran za nastajanje O₂ kojeg obilno ima u zemljinoj atmosferi. Oslobađanje O₂ kao posljedica fotosinteze dovelo je do promjena u ćelijama i van ćelija, što je sve zajedno vodilo direktno ka razvoju oksidativnog metabolizma. Alternativno, oksidativni metabolizam mogao je imati evoluciju prije fotosinteze, sa povećanjem O₂ u atmosferi, a potom selektivnu prednost u korist organizama sposobnih za upotrebu O₂ i proizvodnju energije. U drugom slučaju, O₂ je visoko reaktivna molekula za oksidativni metabolizam i vjerovatno ova reaktivnost ima mehanizam za proizvodnju energije za organske molekule, mnogo više i efikasnije nego anaerobna glikoliza. Naprimjer, kompletna oksidativna promjena glukoze u CO₂ i H₂O daje energiju ekvivalentnu 36-38 molekula ATP, suprotno dva molekula ATP formirana pri anaerobnoj glikolizi.

RAZVOJ MULTICELULARNIH ORGANIZAMA

Mnogi eukariotski jednoćelijski organizmi i bakterije sadrže samo jednu ćeliju sposobnu za samoreprodukciju. Jednostavni eukarioti su, naprimjer, ćelije kvasca. Ćelije kvasca su složenije od bakterija, ali mnogo jednostavnije od ćelija životinja ili biljaka. Naprimjer, studije ćelija kvasca *Sacharomices cerevisiae* je pokazala da su ove ćelije veličine oko 6 μm u dijametru i sadrže 12 miliona parova baza DNA. Međutim, drugi eukarioti su složeniji, neki sadrže više DNA. To su specijalizirane, preformirane varijante koje vrše fotosintezu, kretanje, uzimanje drugih organizama kao hranu. Ameba proteus, naprimjer, velika je složena ćelija, volumen je 100.000 puta veći od bakterije *E. coli*. Ameba je visokomobilni organizam. Može mijenjati oblik, može se izdužiti

preko pseudopodija, može obuhvatati i druge organizme kao, naprimjer, bakterije, ćelije kvasca, kao hranu. Drugi jednoćelijski eukarioti (zelene alge) sadrže hloroplaste i mogu vršiti fotosintezu. Multicelularni organizmi su se razvili od jednoćelijskih eukariota prije 17 biliona godina. Neke jednoćelijske eukariotske forme multicelularnih agregata su na putu tranzicije evolucijski preorijentirani od jednoćelijskih do multicelularnih organizama. U slučaju algi (zelene alge *Volvox*) ćelija asociira sa svakom drugom formom multicelularnih kolonija koje su bile evolucijski prekursori današnjih biljaka. Biljke su građene od manjeg broja različitih ćelijskih tipova u odnosu na životinje. Ali, svaka različita vrsta biljnih ćelija je specijalizirana za izvođenje specifičnih zadataka koje zahtjeva organizam kao cjelina. Ćelije biljaka organizuju tri vrste tkivnih sistema: parenhimske ćelije u kojima se odvijaju metabolički procesi npr. fotosinteza. Kolenhim i sklerenhim grade ćelijske zidove. Dermalno tkivo je pokrovno i površinsko tkivo biljaka.

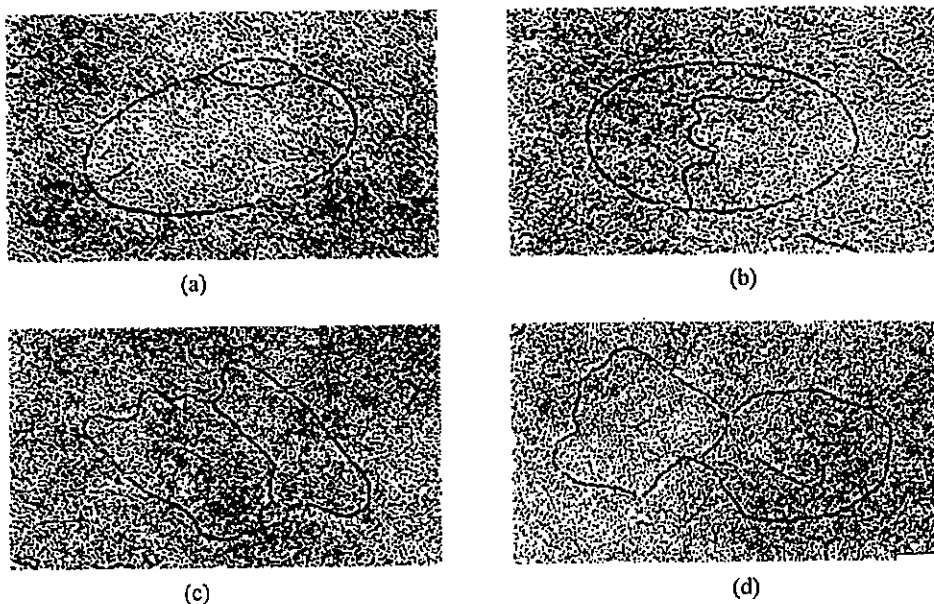
Prikaz prokariota danas

Jednoćelijski organizmi prokarioti su najjednostavniji organizmi u prirodnoj okolnoj sredini. Tipični predstavnici su bakterije. Biohemijski su različitog sastava. Sastoje se od DNA, RNA, proteina i malih molekula raspoređenih po bakterioplazmi. Obavijene su plazminom membranom, a neke i ćelijskim zidom. Nasljedni materijal DNA nije ograničen posebnom membranom već se nalazi difuzno uklopljen u citoplazmi. U ovim ćelijama se javljaju samo tri ćelijske diferencijacije: plazma membrana, nukleoid i ribosomi. Strukturu tipične prokariotske ćelije ilustrira *Escherichia coli* (*E. coli*) sl.1.1, živi u humanom intestinalnom traktu. Veličine je oko 1 μm u prečniku i oko 2 μm u dužini. Ćelijski zid je građen od polisaharida i peptida. Ispod ćelijskog zida je plazma membrana, periferni dio citoplazme debljine oko 100 Å, lipoproteinske prirode. Višestruko se uvija prema unutrašnjosti citoplazme i ovi dijelovi sadrže pigmente. Ribosomi su jedini organeli u citoplazmi prokariota, ima ih oko 30.000. Nukleoid ili "bakterijsko jedro", smješteno u citoplazmi, zapravo je jedinstvena cirkulatorna molekula DNA (sl.1.2). Na hromatinskim petljama koje ekspandiraju iz kromomera bakterijskog hromosoma nalaze se molekule enzima RNA-polimeraze koji započinje sintezu proteina tako što se transkribuju iRNA, rRNA i tRNA. Genetska poruka prepisana sa DNA na iRNA ne obuhvata informaciju s jednog gena već sa više gena koji su blisko locirani. Takva bakterijska iRNA naziva se policistronska iRNA ona već u toku vlastite sinteze veže za sebe ribosome. Tako nastaju polisomi na kojima se simultano događa prevodenje genetske poruke sa iRNA u redosljed amino kiselina u proteine u procesu sinteze proteina.

Prokariotske ćelije imaju veliku mogućnost adaptacije na najrazličitije uslove u životnoj sredini zahvaljujući nukleoidu bez ovojnice, što omogućava hromosomu da brzo reaguje postojećim regulacijskim mehanizmima na svaku promjenu u sastavu hranilišta. Naprimjer, dodatkom novog šećera laktoze bakterija *E.coli* u toku od svega od tri minute započinje nove sintetske aktivnosti koje omogućavaju korištenje tog novog šećera kao izvora energije.



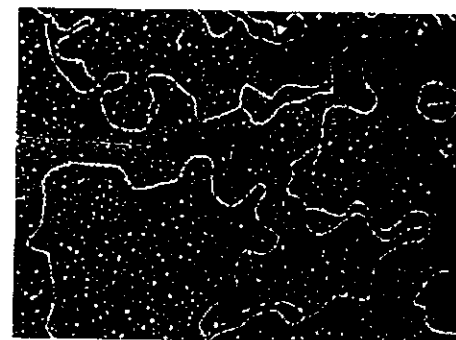
Slika 1.1 Ćelije *Escherichia coli*, heterotropni prokarioti najviše ispitivani živi organizmi. Genetski materijal (DNA) je smještena u centru ćelije; ovaj region nije obavijen membranom, poznat kao nukleoid. Mala tijela u citoplazmi su ribosomi. Dvije ćelije u centru su pri kraju diobje, nisu još potpuno odvojene. (Prema Barnes, C.1999.)



Slika 1.2 Elektronska mikrofotografija cirkulatorenog hromosoma (nukleotid) *E. coli* u replikaciji.

Proces replikacije počinje u specifičnim sekvencama nukleotida i produžava se u suprotnom smjeru od te tačke (a). Rani stadiji replikacije kada omča liči na oko. (b) Kasnije replikacioni hromosom ima oblik grčkog slova zeta. (c) Replikacija zahvata cijeli hromosom (d) Dva nova cirkulatorna hromosoma koja su u odvajanju. (Prema Menge and Wurdz.1995.)

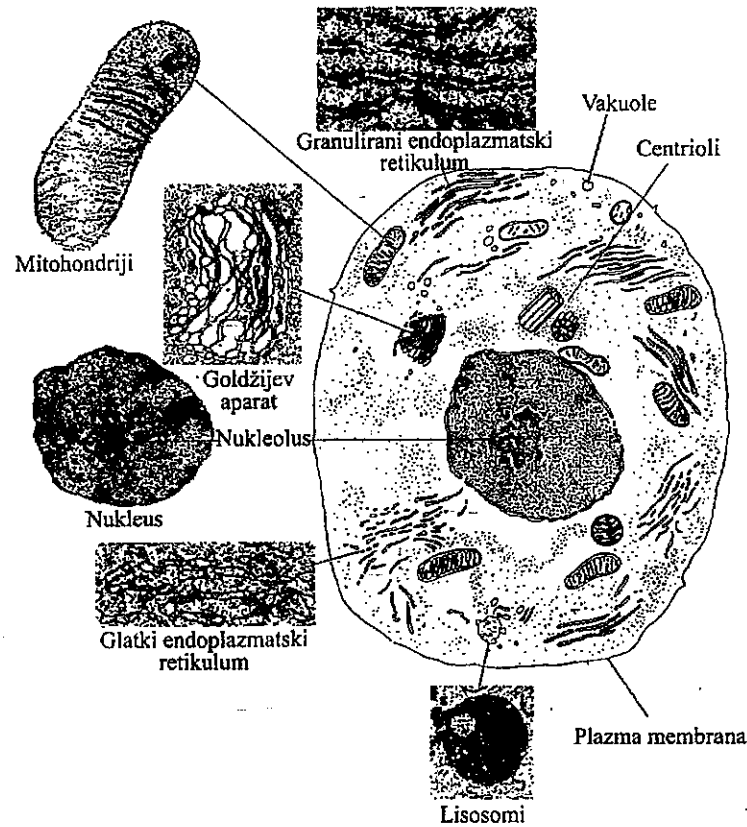
Elektronska mikrofotografija (sl. 1.3) replikacije eukariotskih hromosoma u embrionalnim ćelijama *Drosophila melanogaster* pokazuje analogan proces replikaciji nukleoida bakterije *E.coli*.



Slika 1.3 Elektronska mikrofotografija replikacije eukariotskih hromosoma u embrionalnim ćelijama *Drosophila melanogaster*. Replikacija započinje na više mjesta. Replikacione omče se šire dok se ne sretnu i spoje. Proces analogan replikaciji nukleoida bakterije *E.coli*. (Prema Menge and Wurdz 1995.)

Eukariotska ćelija

Slično prokariotskim ćelijama sve eukariotske ćelije imaju plazma membranu i sadrže ribosome. Međutim, eukariotske ćelije su mnogo više složene i sadrže nukleus, citoplazmatske organele i citoskelet (sl.1.4). Najveći i najprominentniji organel eukariotskih ćelija je nukleus, veličine oko 5 μm. Nukleus sadrži genetsku informaciju ćelije koja je organizovana kod eukariota linealno duž DNA molekula. Nukleus je mjesto DNA replikacije i RNA sinteze; translacija se odvija preko RNA do ribosoma mjesta sinteze proteina. Eukariotske ćelije sadrže različite ćelijske organele u citoplazmi. Organeli su obavijeni dvostrukom lipoproteinskom membranom i na taj način odvojeni od citoplazme (jedro, mitohondriji, endoplazmatski retikulum, Goldžijev kompleks, centrioli, hloroplasti, lisosomi). Mitohondriji i hloroplasti imaju važnu ulogu u energetskom metabolizmu. U mitohondrijima se odvija proces oksidativne fosforilacije i proizvodnja ATP. Lizosomi i peroksisomi su odgovorni za digestiju makromolekula i za različite oksidativne reakcije. Dva ćelijska organela endoplazmatski retikulum i Goldžijev kompleks imaju specifičnu funkciju u separaciji i transportu proteina i produkata sekrecije, povezivanjem sa ćelijskom membranom i lisosomima. Citoskelet se nalazi u dijelu citoplazme koji se naziva citosol. Citoskelet održava oblik i generalnu organizaciju citoplazme i služi za transport organela.



Slika 1.4 Tipična eukariotska ćelija. Dijagram prikazuje relativnu veličinu, a elektronska mikrofotografija ćelijske organele znatno povećane. (Prema Porter H.R.1998.)

HEMIJA ĆELIJE

Hemijski sastav ćelije može više ili manje da varira, što zavisi od vrste i kombinacije hemijskih elemenata i spojeva. [Aktivnosti ćelije se mijenjaju pod uticajem sredine, zavise od dinamike procesa, položaja i funkcije ćelije u organizmu, broja hromosoma, starosti itd.] U odnosu na hemijski sastav protoplazma ćelije veoma je složena supstancija, u čiji sastav ulazi niz organskih i neorganskih jedinjenja molekula i slobodnih jona. Biološku specifičnost protoplazme uslovljavaju jedino organske materije, odnosno takva jedinjenja kojih u ostaloj prirodi van njenog sastava nema. Od organskih jedinjenja u sastav ćelije ulaze na prvom mjestu bjelačevine, zatim ugljeni hidrati i masti. Uvijek prisutni organski sastojci su vitamini. Posebno specifičnu grupu bjelačevina čine fermenti. U izgradnju svih organskih ćelija učestvuje mala količina hemijskih elemenata-oko dvadeset. Samo pet glavnih elemenata (O, H, C, N, P) učestvuje sa 97%, a sam kiseonik sa 60%.

MOLEKULSKA STRUKTURA ĆELIJE

Proteini

Proteini su biopolimeri amino-kiselina. Kao biopolimeri sintetišu se od amino-kiselina, od kojih se svaka sastoji od amino grupe (NH_2) i acidne karboksilne grupe (COOH). U biosintezi proteina učestvuje 20 amino-kiselina povezanih peptidnim vezama, od kojih veći broj učestvuje u različitim sintetičkim procesima. Neke od njih organizam može da sam sintetiše dok druge ne, to su esencijelne amino-kiseline kao: arginin, histidin, lizin, triptofan, izoleucin, valin, fenilalanin, leucin, metionin i treonin. Amino-kiseline koje imaju izuzetnu biološku vrijednost za specifične procese rasta su: triptofan, tirozin, histidin i fenilalanin. Ove amino-kiseline organizmi unose hranom. Amino-kiseline međusobno reaguju i grade složene spojeve koji imaju krupne molekule i označeni su kao peptidi. Najjednostavnije jedinjenje sadrži samo dvije amino-kiseline označeno je kao dipeptid, sa tri amino-kiseline tripeptid i uopšte polipeptid. Proteini mogu biti hidrofilni ili hidrofobni, ali i pozitivno ili negativno naelektrisani. Osim toga, isti molekul proteina može da ima i hidrofilne i hidrofobne predjele koji se vezuju za nukleotide nukleinske kiseline ili su tijesno povezani za šećere i imaju i katalitičko područje. Uglavnom određuju specifičnost vrste ćelije, dobri su katalizatori specifičnih hemijskih reakcija (enzimi), kontrolišu ekspresiju gena, permeabilnost bioloških membrana, obezbjeđuju strukturalnu stabilnost, regulišu koncentraciju metabolita, obezbjeđuju intracelularna pokretanja ili migraciju ćelija (citoskelet) itd. Proteini su građeni od veoma krupnih molekula koje ne mogu prolaziti kroz ćelijsku membranu. U vodi se rastvaraju i zbog veličine molekula obrazuju koloidne rastvore. Zagrijavanjem nastaje gust talog koji je ireverzibilan. Za tako izmjenjene bjelačevine kažemo da su denaturisane. Proteini se dijele u odnosu na složenost strukture na proste i složene. Prosti proteini građeni su samo od amino-kiselina. Složeni proteini sastoje se od jedne proste bjelačevine i jedne nebjelačevinaste komponente-prostetičke grupe. Ove grupe su karakteristične za fermente, krvne pigmente i dr. U odnosu na porijeklo, proste bjelačevine se dijele na biljne i životinjske. Proteini životinjskog porijekla su: albumini, globulini, protamini, histoni, keratini i kolageni. Proste bjelačevine biljnog porijekla su: protamini i glutamini. Složene bjelačevine se dijele u: glikoproteide (prostetička grupa šećer), lipoproteide (prostetička grupa fosfor), nukleoproteide (prostetička grupa nukleinske kiseline), hromoproteide (prostetička grupa boja), u disajnim fermentima prostetička grupa je citohrom, a u hemoglobinu željezo itd. Proteini u ćeliji mogu imati strukturalnu ulogu -strukturalni proteini ili mogu imati različite funkcije poput enzima, antitijela, hormona itd.-funkcionalni proteini. Strukturni proteini imaju bitnu ulogu u održavanju glavnih aktivnosti ćelija. Većina ovih proteina su pravilni agregati jednostavnih polipeptidnih lanaca i imaju specifične kovalentne ili nekovalentne veze.

Filamenti aktina nalaze se u svim ćelijama viših organizama i imaju bitnu ulogu u organizaciji, obliku i veličini ćelije. Kolagen je najzastupljeniji protein u ekstracelularnom matriksu svih vrsta životinja. Proteini kao konačni proizvodi gena imaju bitnu ulogu u regulaciji gena, strukturi i specifičnoj aktivnosti ćelija.

ULOGA

Lipidi

Lipidi su glavna strukturalna komponenta biomembrana i predstavljaju glavna mjesta za vezivanje nekih proteina. To su organski molekuli nerastvorljivi ili slabo rastvorljivi u vodi zbog toga što je veliki dio ove molekule hidrofoban. Ovaj hidrofobni dio sadrži samo atome vodonika i ugljenika-hidrokarbon. Javljaju se u obliku:

1. prostih masti (loj i ulje),
2. složenih lipida-fosfolipida i
3. derivata lipida-steridi.

Glavne sastavne komponente liganada i membrana su masne kiseline. Većina masnih kiselina u ćeliji ima 16-18 atoma ugljenika i najviše do tri duple veze. Masne kiseline bez duplih veza su poznate kao zasićene, a one sa najmanje jednom duplom vezom su nezasićene. Trigliceridi su primjer akumuliranih (zasićenih) masnih kiselina. Sastoje se od tri molekula masnih kiselina i molekula glicerola. Nerastvorljivi su u vodi i slanim rastvorima i formiraju masne kapljice, nagomilavaju se u masnim ćelijama i izvor su energije. U masnim ćelijama se aktiviraju adrenalinom, nastaje hidroliza triglicerola u slobodne masne kiseline koje se izlučuju u krv i upotrebljavaju se kao izvor energije neophodne za metabolizam drugih ćelija. Fosfolipidi su jedinjenja masnih kiselina, glicerina i fosforne kiseline. Fosfolipidi su ključni molekuli u organizaciji strukture svih biomembrana.

Najzastupljeniji su fosfogliceridi (lecitin i kefalin), sfingomijelin i holesterol. Nastaju kada se u molekuli glicerina dvije OH grupe zamijene masnim kiselinama, a treća fosfornom kiselinom. Za taj ostatak fosforne kiseline vezuje se neka azotna baza. Steridi se nalaze u svim strukturama koje sadrže lipide. Najrasprostranjeniji steroid je holesterol prisutan u svim tkivima, posebno u nervnom, u ćelijama jetre, kori nadbubrežne žlijezde, slezeni itd. Ovoj grupi pripadaju i polni hormoni (testosteron, estrogen, progesteron), hormoni kore nadbubrežne žlijezde (aldosteron, kortizon) i neki vitamini.

Ugljeni hidrati

Ugljeni hidrati nastaju iz neorganskih materija u biljkama u procesu fotosinteze. To su organska jedinjenja kiseonika, vodonika i ugljenika. Ugljeni hidrati čine osnovni izvor energije u ćelijama. U biljnim i životinjskim ćelijama ugljeni hidrati grade strukturalne dijelove ćelije. Prema građi molekula dijele se na monosaharide, oligosaharide i polisaharide.

Monosaharidi su najrasprostranjeniji ugljeni hidrati koji čine osnovnu gradnju svih složenih ugljenih hidrata. U monosaharide spadaju: glikoza ili groždani šećer, galaktoza koja se nalazi u molekulama mliječnog šećera, fruktoza ili voćni šećer nalazi se u biljnim plodovima. Glikoza se nalazi u svim životinjskim i biljnim ćelijama gdje predstavlja osnovni izvor energije koja se oslobađa pri njenoj razgradnji u procesima respiracije. Pentoze i heksoze predstavljaju monosaharide koji u svojoj molekuli imaju pet, šest ili više atoma kiseonika. Najvažniji monosaharidi u ćeliji, pored glikoze, jesu riboza (pentoza) i deoksiriboza (tetроза). Oligosaharidi nastaju spajanjem molekula monosaharida uz izdvajanje vode. Ovoj grupi ugljenih hidrata pripadaju maltoza čiji je molekul sastavljen od dva molekula,

zatim laktoza ili mliječni šećer sastavljen od jednog molekula glikoze i jednog molekula galaktoze. Saharoza je građena od glikoze i fruktoze, a celobioza je sastavljena od dva molekula glikoze i ulazi u sastav ćelijske membrane kod biljaka. Polisaharidi su najsloženiji šećeri sastavljeni isključivo od glikoze. Skrob kao rezervna hrana deponuje se u ćelijama. U ovu grupu spadaju još važni polisaharidi: glikogen nalazi se u životinjskim ćelijama i sličan je skrobu, tunicin sličan celulozi. Sve ove šećere nalazimo u protoplazmi. Ipak, fiziološki su aktivni samo monosaharidi koji su pretežno rastvorljivi u vodi i obrazuju prave rastvore, za razliku od bjelančevina imaju karakter koloida. Tačna struktura nekih ugljenih hidrata, vezana za lipide i proteine membrana, genetski je determinisana. Glikolipidi i glikoproteini u čovjeka su antigeni krvnih grupa i mogu izazvati štetnu imunu reakciju. To znači da kada jedna osoba primi transfuziju krvi koja sadrži različite antigene, strani ugljeni hidrati mogu stimulisati imuni odgovor na strane ćelije. Ugljeni hidrati krvnih grupa čovjeka kao A, B i O su antigeni po strukturi i srodni oligosaharidima koji mogu biti vezani za lipide ili proteine. O-antigen je lanac fruktoze, galaktoze, N-acetilglikozamina i glikoze sa lipidima. A-antigen se razlikuje od O-antigena prisustvom H-acetilgalaktozamina vezanog za spoljnu reziduu galaktoze. B-antigen se razlikuje od O-antigena po tome što ima dodatnu reziduu galaktoze.

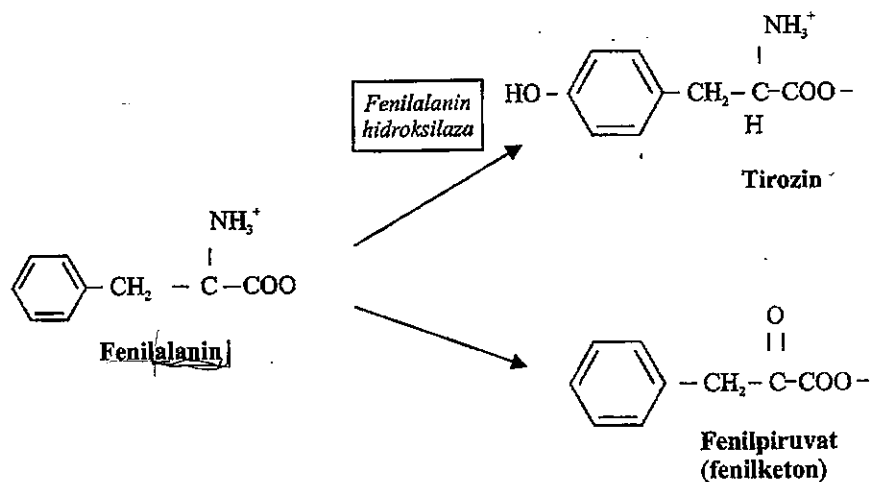
Centralna uloga enzima u biološkoj katalizi

Osnovni zadatak proteina sa funkcijom enzima katalizatora je da praktično povećaju brzinu svih hemijskih reakcija u ćeliji. Također je i RNAs sposobna da katalizuje neke reakcije, mnoge su reakcije katalizovane proteinima. U odsustvu enzimske katalize najveći broj biohemijskih reakcija se usporava, što može dovesti do pada temperature i pritiska što je kompatibilno sa životom. Enzimi ubrzavaju stopu svake reakcije preko milion puta. Ćelije sadrže hiljade različitih enzima koji aktiviraju određene hemijske reakcije aktuelne za ćeliju. Katalitički aktivne enzime, slično svim drugim katalizama, karakterišu dva osnovna svojstva. Prvo, oni povećavaju stopu hemijske reakcije pri čemu se sami mogu mijenjati i mijenjati reakciju. Drugo, oni povećavaju stopu reakcije unutar promjene hemijskog ekvilibriuma između reakcije i produkta. Vezivanje supstrata za aktivno mjesto enzima je vrlo specifična interakcija. Aktivna mjesta su ključna za sklapanje enzima na površini, obično sadrže amino kiseline različitih dijelova polipeptidnih lanaca. Supstrati su inicijalno vezani za aktivna mjesta pri nekovalentnim interakcijama uključujući hidrogene veze, jonske veze i hidrofobne interakcije. Kada se supstrat graniči sa aktivnim mjestom enzima mnogostrukim mehanizmom, može doći do konverzije, tj. promjene produkta. Mehanizam enzimske katalize se ogleda u: povećavanju stope reakcije pri spajanju supstrata, pri izmjeni konformacije supstrata i djelimično pri direktnoj hemijskoj reakciji. Enzimske aktivnosti su regulisane na nivou udovoljavanja fizioloških potreba ćelije. Enzimska aktivnost može biti kontrolisana spajanjem malih molekula pri interakciji sa drugim proteinima i kovalentno modificirana. Međutim, enzimska aktivnost može biti poremećena djelovanjem različitih faktora spoljašnje i unutrašnje sredine. Od unutrašnjih faktora najčešće su mutacije (mutacije gena koji determinišu sintezu određenog enzima) koje najčešće imaju za posljedicu niz nasljednih bolesti. Naprimjer, jedna od takvih bolesti je Fenilketonurija.

Molekularna medicina

Fenilketonurija

Kao posljedica mutacija gena koji determinišu sintezu enzima javljaju se nasljedne bolesti poznate kao enzimopatije i metaboličke bolesti. Uzrokovane su smanjenjem aktivnosti ili nedostatkom odgovarajućeg enzima. Fenilketonurija ili PRV je urođena greška metabolizma amino kiseline fenilalanina sa teškim posljedicama. Uzrokovana je deficitom enzima fenilalanin hidrosilaze, koji prevodi aminokiselinu fenilalanin u tirozin. Ovaj deficit dovodi do akumulacije fenilalanina i drugih abnormalnih derivata u krvi, urinu i moždanoj tečnosti, uzrokujući mentalnu retardaciju i druge teške posljedice. Bolest se ispoljava u adultnih individua. Rutinskim skrining testom za fenilketonuriju može se uspješno otkriti nivo fenilalanina u krvi novorođenčadi i preduzeti prevencija i tretman.



Abnormalni metabolizam fenilalanina u bolesnika sa fenilketonurijom

FIZIČKA SVOJSTVA ČELIJE

Čelija je izgrađena od veoma raznovrsnih složenih hemijskih supstanci. To je složen dinamički sistem u kojem su supstance u neprekidnoj interakciji, što uslovljava fizičko stanje protoplazme. Protoplazma je tečne konzistencije, što dokazuju kapilarne pojave u njoj, a što predstavlja jednu od njenih fizičkih karakteristika. Međutim, protoplazma ne predstavlja običnu i jednostavnu tečnost. Protoplazma je posebna organska specifična tečnost. Polazeći od fizičko hemijskih osobina i zakona, protoplazma se može posmatrati kao: složen disperzni sistem. Postoje različiti disperzni sistemi i svi se mogu svrstati u homogene i heterogene. Homogeni disperzni sistemi su uniformni. Oni se u svim dijelovima odlikuju istim svojstvima, a to znači da su sastavljeni od jedne faze. Takav homogeni disperzni sistem nastaje kada, naprimjer, glikozu rastvorimo u vodi. U tom slučaju su molekuli ovog šećera ravnomjerno raspoređeni među molekulima vode. Heterogeni disperzni sistemi su sastavljeni od dvije ili više međusobno različitih faza. Ako, naprimjer, pomiješamo ulje i vodu, dobit ćemo takav sistem u kojem ulje predstavlja jednu, a voda drugu fazu. Faze disperznog sistema možemo odvojiti jednu od druge i mehaničkim silama. Heterogeni rastvori nastaju kada se tečna faza pomiješa sa tečnom (pa nastaje emulzija), čvrsta rastvori u tečnoj ili se pomiješa sa gasovima, zatim, gasovita rastvori u tečnoj ili kada se pomiješaju dvije čvrste faze. Međutim, veliki broj materija disocira u vodi na takve čestice koje su suviše male da bi mogle dati talog na dnu, a suviše velike da bi obrazovale homogeni rastvor, kao što je rastvor glikoze. Stoga, one obrazuju poseban koloidni rastvor. Koloidni rastvori se odnose na disperzne sisteme koji su sastavljeni od čestica veličine 10-1000Å, jer se sastoje od makromolekula ili agregata ovih molekula. U koloidnom disperznom sistemu čestice rastvorene materije predstavljaju disperznu fazu koja lebdi u disperznoj sredini. Mnoge materije obrazuju koloidne rastvore. Razlikuju se organski i neorganski koloidi. Među organskim koloidima najinteresantniji su koloidni rastvori bjelančevina. Osnovna fizičko-hemijska karakteristika protoplazme ogleda se u njenoj koloidnoj organizaciji. U odnosu na mogućnost adsorpcije vode površinske koloidne čestice koloide dijelimo na dvije grupe: hidrofobne i hidrofilne.

Protoplazma je hidrofilni koloid. S obzirom na to da je hidrofilni koloid, protoplazma može da mijenja svoje fizičko stanje. U zavisnosti od različitih faktora postaje gušća i rjeđa. Ova reverzibilna promjena fizičke konzistencije protoplazme ima ogroman značaj za odvijanje biohemijskih procesa u ćeliji, zasniva se na osobini da prima ili otpušta vodu.

Ispuštanjem vode nastaje gušće gel-stanje. Gušće gel-stanje primanjem vode prelazi u rjeđe, sol-stanje. Ovo stanje nastaje zahvaljujući hidratacionoj sposobnosti bjelančevina. Na formiranje sol-stanja utiču, slabije ili jače, različiti joni, naprimjer litijuma, natrijuma, kalijuma kalcijuma i drugih. Liofilne koloide karakteriše poseban oblik koagulacije, što je uslovljeno promjenom

električnog i dehidratacionog stanja. Pri djelimičnoj neutralizaciji ili nepotpunoj dehidraciji nedovoljno hidrirane koloidne čestice ne obrazuju talog. One se međusobno spajaju, formiraju znatno krupnije čestice koje sadrže manju količinu rastvarača. Takav sistem naziva se koacervat, a taj vid koagulacije označen je koacervacija. Ona može biti izazvana, naprimjer, alkoholom ili acetonom. Posebne koacervate obrazuju fibrilarne bjelančevine.

2. Viskoznost je jedna od fizičkih osobina protoplazme. Viskoznost podrazumijeva poseban međuodnos čestica nekog rastvora, određeni stepen sile trenja koje nastaje pri klizanju čestica jedne preko druge. Viskoznost se mjeri otporom čestica na koji nailaze pri bilo kojem spoljašnjem pokušaju promjene njihovog uzajamnog položaja u rastvoru. Otpor može biti uslovljen silama među susjednim molekulama, njihovom asimetričnom gradom, a, također, i različitim hemijskim vezama. Cijepanjem hemijskih veza između molekula smanjuje se viskoznost, a uspostavljanjem veza viskoznost se povećava. Protoplazma je od 800 do 8.000 puta viskoznija od vode. Viskoznost zavisi od temperature, svjetlosti, pH itd. Tiksotropnost je mogućnost raskidanja i ponovnog uspostavljanja hemijskih veza u protoplazmi. Intermolekularne veze u živoj ćeliji moraju biti očuvane. Ako bi došlo do narušavanja veza među molekulama bjelančevina, izgubila bi se karakteristična struktura za živu protoplazmu, nastupila bi njena smrt. Molekule proteina se ili odbijaju ili privlače zavisno od uzajamnog rastojanja. Te veze su veoma dominantne što znači da se neprekidno obrazuju i raskidaju. Elastičnost je svojstvo rastezanja protoplazme. Pomoću mikroigle moguće je izmijeniti dimenzije protoplazme. To znači da se protoplazma može rastezati pomoću mehaničkih sila. Ali nakon prestanka djelovanja sile, ona ponovo poprima prvobitne dimenzije. Elastičnost protoplazme uslovljavaju fibrilarne bjelančevine čiji molekuli mogu da mijenjaju dimenzije. Amebe i leukociti pokazuju veliku elastičnost. Veliku elastičnost pokazuju jedro i hromosomi. Soli Na i kiseline smanjuju elastičnost protoplazme, dok je soli Ca povećavaju. pH označava relativnu koncentraciju vodonikovih jona u rastvoru. U protoplazmi se nalaze rastvoreni elektroni u obliku slobodnih jona H^+ i OH^- koji svojim naelektrisanjem imaju važnu ulogu u održavanju stabilnosti vodenih rastvora makromolekula u ćeliji. Od količine i uzajamnog djelovanja H^+ i OH^- jona zavisi da li će reakcija vodenog rastvora biti neutralna, bazna ili kisela. Ukoliko je u rastvoru H^+ jona više, vodeni rastvor će imati kiselu reakciju. Ukoliko je u rastvoru više OH^- jona, reakcija je bazna. Ako pH ima manju vrijednost od 7 reakcija rastvora je kisela, ako je pH oko 7, reakcija rastvora je neutralna, a ako je pH vrijednost od 7 do 14, reakcija je bazna. Različite ćelije imaju različitu vrijednost pH. Jedro ima veću vrijednost pH od citoplazme. U živoj materiji pH vrijednost je uglavnom neutralna. Od pH stanja zavise mnoge funkcije u ćeliji.: aktivnost enzima, permeabilitet membrane, kontraktilnost vlakana, oplodnja i drugi procesi. Regulaciju pH u ćeliji vrše joni karbonata i bikarbonata.

2

STRUKTURA I FUNKCIJA ĆELIJE

OBLIK I VELIČINA ĆELIJE

Ćelija je osnovna morfološka elementarna jedinica žive materije sposobna da samostalno obavlja promet materija i energije. Individualnost ćelija ispoljava se njenim oblikom i veličinom. Oblik ćelije veoma varira, zavisno od vrste organizma, mjesta nalaženja u organizmu i njene funkcije. Primarna ćelija ima okrugao ili elipsoidan oblik. Takva je većina jajnih ćelija, prve embrionalne ćelije blastomere itd. Iz primarnog oblika sekundarno su izvedeni različiti drugi oblici ćelija, u zavisnosti od njene funkcionalne izdiferenciranosti. Tako kod višćelijskih organizama postoje plazmatične, pločaste, cilindrične, vretenaste ćelije, a one mogu imati nepravilan i promjenljiv oblik (razne ameboidne ćelije), zavisno od toga kojem tkivu pripadaju. Postoje velike razlike u obliku jednoćelijskih i višćelijskih organizama. Jednoćelijski organizmi, kao što su amebe i dr., imaju sposobnost stvaranja pseudopodija i mijenjaju oblik. Ćelije višćelijskih organizama su različitog oblika, prilagodene su za specifične funkcije, a u skladu sa uslovima u kojima su diferencirane i organizovane u specifična tkiva i organe. Sposobnost za pokretanje i mijenjanje oblika ima većina ćelija tokom rane embriogeneze višćelijskih organizama. Ovu sposobnost imaju leukociti, ali van krvnih sudova. Druge ćelije imaju oblik karakterističan za svaku vrstu što olakšava identifikaciju. Mnoge ćelije imaju poligonalan oblik, zavisno od odnosa sa susjednim ćelijama i pritiska koji postoji u odgovarajućem organu. Oblik ćelija zavisi i od učestalosti diobe, od količine i prirode međućelijske supstance, a posebno od organizacije i rasporeda sastavnih elemenata citoskeleta. Epitelne, žljezdane i nervne ćelije imaju tendence polarizacije. Nervne ćelije imaju vrlo raznolik oblik. Razlike u obliku u većini ćelija nastale su tokom evolucije i adaptacije na uslove sredine. Veličina ćelija, također, varira što zavisi od vrste organizama i tkiva kao i od funkcije ćelija, te količine rezervnog materijala, ili ekskreta u njoj. Ćelije mogu biti veoma sitne, okom nevidljive, mikroskopske veličine, koje mjerimo mikronima. Najsitnije ćelije su bakterije, dimenzija 1 μ m. Ima jednoćelijskih organizama čije su dimenzije do 50 μ m, kao npr. fotosintetska alga Euglena gracilis. Najveći

, najveća

jednoćelijski organizam je biljka Acetabularija koja ima dužinu do 8 cm. Veličina ćelija životinja obično varira između 4 mm do oko 10 μ m, od eritrocita nekih sisara do gigantskih ćelija, npr. nojevo jaje, nervne ćelije koje mogu biti dugačke i preko jednog metra, zatim mišićna vlakna dužine i preko 10 cm. Veličina i oblik ćelija zavisi od inteziteta biosinteze proteina, masti i šećera, odnosno transporta hranljivih supstanci u ćeliju i odstranjivanja produkata metabolizma. Dimenzije i zapremine su konstantne za određenu vrstu ćelija i nezavisne od veličine organizama (npr. ćelije jetre, bubrega u čovjeka, konja i miša). Razlika u veličini organa vezana je sa brojem i veličinom ćelija. Postoje, međutim, ćelije koje mijenjaju dimenzije i zapreminu u raznim fazama aktivnosti (apokrine žljezdane ćelije, folikularne ćelije tireoideje i dr.).

CITOPLAZMA

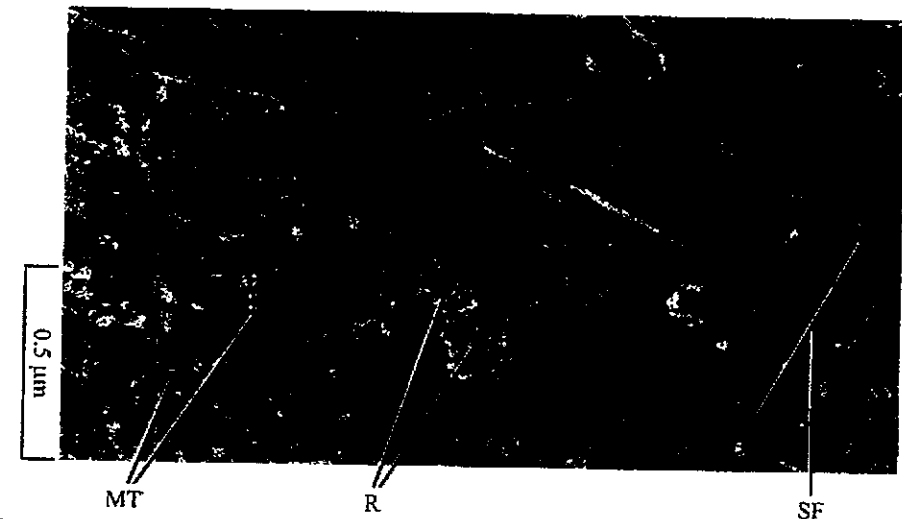
Struktura citoplazme

Citoplazma je posebna organska specifična tečnost, koloidni hidrofilni disperzni sistem. To je viskozni dio ćelije u kojem se nalaze citoplazmine organele, odvijaju procesi biosinteze, pokretanje molekula i organela i drugi vitalni procesi. U eukariotskim ćelijama citoplazma je odvojena plazminom membranom od okolne sredine, odnosno međućelijskog prostora. U središnjem dijelu citoplazme nalazi se jedro, a u ostalom dijelu citoplazme nalaze se organeli, Golgijev kompleks, lizosomi, centrioli, mikrotubuli, mikrofilamenti, mitohondriji, endoplazmatski retikulum, ribosomi i razne vrste inkluzija i pigmenti. U citoplazmi biljaka npr. nalaze se hloroplasti u kojima se odvija fotosinteza. U citoplazmi se odvijaju specifični procesi kao: biosinteza proteina, prenošenje impulsa i drugih informacija, prenošenje hranljivih materija i drugih supstanci. U citoplazmi se odvijaju katabolički i anabolički procesi. U toku kataboličkih procesa razlažu se hranljive materije, proteini i amino- kiseline, masti, masne kiseline, monosaharidi, koje se unose iz međućelijskih prostora odnosno kapilara. Biosinteza proteina, ugljenih hidrata, masti nastaje u toku anaboličkih procesa. Katalizu ovih procesa vrše enzimi koji se, također, nalaze u citoplazmi.

Količina citoplazme je različita u različitim vrstama ćelija. U nekim ćelijama je količina znatno manja, ali visoko diferencirana npr. u spermatozoidima. U većini ćelija znatno je veća količina citoplazme u odnosu na jedro. Tokom rasta ćelije mijenja se volumen citoplazme, mijenja se intezitet i dinamika različitih aktivnosti, mijenja se priroda i sastav. Tipičan primjer su jajne ćelije. Odnos veličine jedra i citoplazme se mijenja u toku diferencijacije i u toku diobe ćelije. U jajnoj ćeliji odnos je 1:550 u odnosu na normalan odnos 1:6. Limfociti su, naprimjer, ćelije sa izrazito malom količinom citoplazme, a najosjetljiviji su na zračenje.

Citoskelet i citosol

U nizu karakteristika eukariotske ćelije je i izdiferencirana struktura prisutna u samoj citoplazmi, a koja se naziva *citoskelet*. Citoskelet se nalazi u dijelu citoplazme koji se naziva citosol. Citosol ne sadrži subcelularne organele tj. ne sadrži partikule, organele, odnosno supstance okružene membranom. Citoskelet održava oblik, strujanje u citoplazmi, migraciju ćelija itd. Pored citoskeleta u citoplazmi se nalaze granule glikogena, kao polimeri glikoze, kapljice triglicerida (masne ćelije), visoke koncentracije raznih vrsta proteina, od kojih su enzimi zastupljeni sa 25-50%. Citoskelet obrazuje kompleksnu trodimenzionalnu strukturu i pruža se u raznim pravcima, objezbjeđuje kontakt između susjednih ćelija i međućelijskog matriksa. Ima bitnu ulogu u migraciji ćelija, mitozu i mejozi, endocitozi i egzocitozi, intracelularnom transportu, mikrocirkulaciji, pokretanju citoplazmatskih organela (kao što su ribosomi, poliribosomi, mitohondriji, vezikule, inkluzije) transportu lisosoma, održavanju polarosti i oblika ćelija itd. Citoskelet je građen od *mikrotubula*, *mikrofilamenata*, i *intermedijalnih mikrofilamenata*. Glavni proteini koji grade citoskelet su aktin i tubulin. Kao polimeri brzo se spajaju i razdvajaju. Razlikuje se membranski citoskelet vezan za membrane mnogobrojnih jednoćelijskih organizama kao i eukariotskih ćelija i metazoa i citoplazmin citoskelet raspoređen po citoplazmi. Mikrotubuli su upravo nosioci citoskeleta. To su cjevčice promjera 240 Å, dugačke više mikrometara. Zidovi su izgrađeni od globularnih proteina, tzv. tubulina. Funkcionalna jedinica tubulina sastoji se od dva različita proteinska lanca (alfa i beta tubulina). Te se globularne jedinice slažu u nizove, tako da 13 nizova zatvaraju plašt mikrotubula (sl.2.1) Pored toga što izgrađuju citoskelet ćelije, mikrotubuli se udružuju u specifične sastave i izgrađuju centriole, bazalna tjelesa, bičeve i trepetljike. Najvažnija njihova funkcija je u izgradnji teznih niti diobenog vretena u toku diobe ćelije čime omogućuju distribuciju genetskog materijala.



Slika.2.1 Elektronska mikrografija citoskeleta ćelije. Mikrotubuli (MT), poliribosomi (R), i naglašene fibrile (SF).

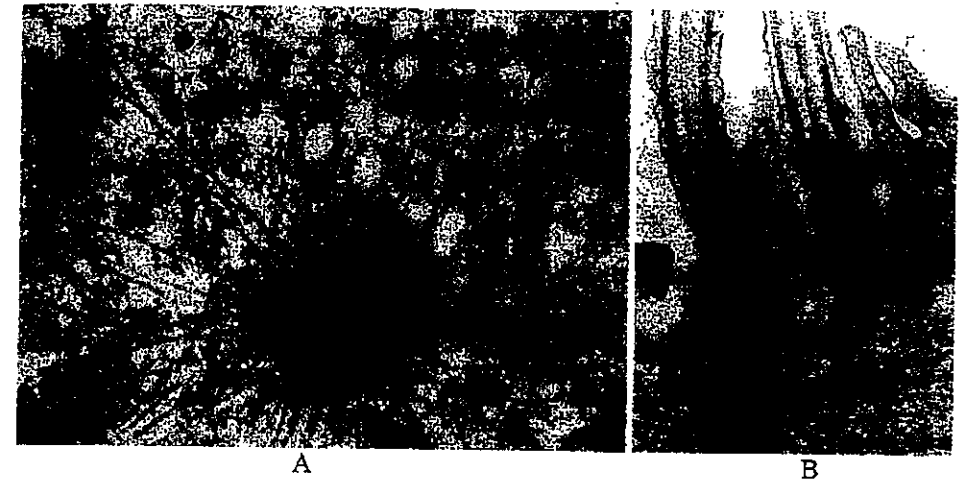
Mikrofilamenti su tanka vlakna oko 60-80Å u promjeru, nalaze se u svim eukariotskim ćelijama. Najviše ih ima u mišićnim ćelijama, miofibrilama nosiocima mišićne kontrakcije. Neke epitelne ćelije, također, imaju sposobnost pokretanja i to zahvaljujući snopu mikrofilamenata koji se protežu njegovim lumenom. Nosioci mišićne kontrakcije i mehanizama pokretanja mikrofilamenata i mikrovila su aktin i miozin. [Ovi proteini se nalaze i u drugim vrstama ćelija.] Svi miozini mogu razgraditi ATP u prisustvu aktina. Intermedijalni filamenti obuhvataju tinofilamente, neurofilamente, glijalne filamente sa fibrilarnim proteinima i vimentin filamente. Ovi filamenti formiraju mrežu koja omogućava interakciju između plazmine membrane, spoljne membrane jedra i citoplazminih organela. Ova mreža ima ulogu u održavanju i funkciji ćelija u toku razvića, diferencijaciji i specifičnim funkcijama ćelijskih tkiva i organa.

Diobjeno vreteno (sl.2.2) je struktura citoplazme koja nastaje za vrijeme diobje jedra ili mitoze i mejoze, a dio je mehanizma za ravnomjernu raspodjelu nasljednog materijala (DNA i RNA) u dvije ćelije kćeri. Sastavljeno je od submikroskopskih podjedinica -mikrocjevčica, a do kretanja hromosoma duž vretena dolazi usljed uzajamnog djelovanja posebnih područja hromosoma (centromera) s mikrocjevčicama.

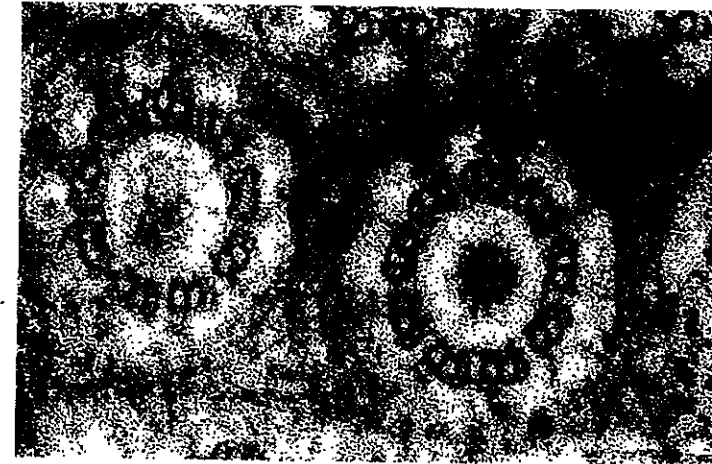


Slika 2.2 Elektronska mikrografija mitotičkog vretena. Mikrotubule vretena dodiruju kondenzovane hromosome. (Prema Rieder and Bowser. 1985.)

Blizu jedra ili na svakom polu vretena za vrijeme mitoze nalaze se dva centrosoma (sl.2.3A). To su cilindrična tjelašca koja obično međusobno leže pod pravim uglom. Centrosomi su tvorbe koje se samoumnožavaju. Sadrže svoju DNA i RNA, što im omogućava diobu. Poseban značaj centrosoma je u genezi bičeva i flagela. Na njima se razlikuje stabljika dio koji je iznad slobodne površine ćelije i bazalno tjelašce koje se nalazi u apikalnoj citoplazmi, od kojeg je izrasla treplja odnosno bič (sl.2.3B). Centrosomi su građeni od devet tripleta mikrotubula kao i bazalnih tjelašaca koja se razvijaju iz centrosoma (sl. 2.4).



Slika 2.3 Struktura centrosoma (A) Elektronska mikrografija ilustruje centrosom i mikrotubule koje se iz njega razvijaju. (B) Elektronska mikrografija cilija usidrenih u bazalnim tjelašcima koja se razvijaju iz centrosoma (Prema Don Fawcett. 1998.).



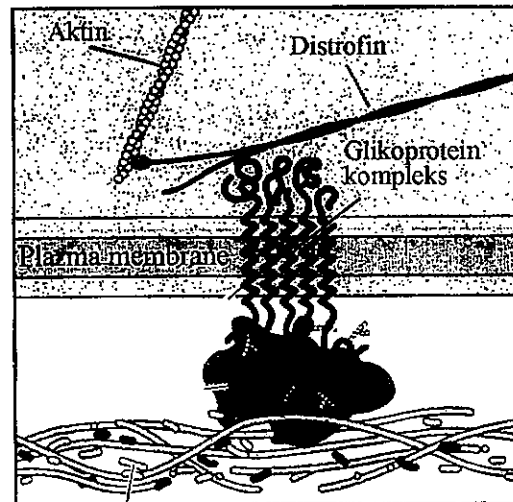
Slika 2.4 Elektronska mikrografija poprečnog presjeka centrosoma ilustruje triplet mikrotubula, što se vidi i na poprečnom presjeku svakog bazalnog tijela koje nastaje iz centrosoma.

Molekularna medicina

Muskularna distrofija i citoskelet

Muskularna distrofija je iz grupe nasljednih bolesti za koje je karakteristično progresivno smanjenje muskularnih ćelija. Od više formi ove bolesti, najčešći oblik je Duchenne- s muskularna distrofija (DMD Uglavnom se ispoljava kod muškaraca, a manje kod žena. Genetske studije su pokazale da je DMD posljedica mutacije gena u specifičnoj regiji na X hromosomu. Grupa naučnika sekvenciranjem kloniranog gena je dokazala da on kodira protein nazvan distrofin. Distrofin je vezan u plazma membrani muskularnih ćelija za transmembranski proteinski kompleks koji vezuje citoskelet muskularnih ćelija za ekstracelularni matriks. Distrofin ima ulogu u učvršćivanju citoskeleta muskularnih ćelija sa ekstracelularnim matriksom. Ovo učvršćivanje stabilizuje plazma membranu i omogućuje ćeliji da izdrži stres muskularne kontrakcije. Mutacije odgovorne za DMD ili drugi oblik BMD rezultiraju odsustvom distrofina ili u ekspresiji abnormalnog proteina, odnosno, dosljedno jačini bolesti DMD i BMD ili drugih oblika bolesnika.

Kombinacijom genetskog savjetovanja i prenatalne dijagnostike povećava se mogućnost sprečavanja i zaštite transmisije nasljedne DMD i drugih oblika ove bolesti. Također, za dijagnozu i prilaz razvoju nove terapije za muskularnu distrofiju, postavili su osnovu revolucionarna otkrića iz područja molekularne genetike tj. sekvenciranja humanog genoma.



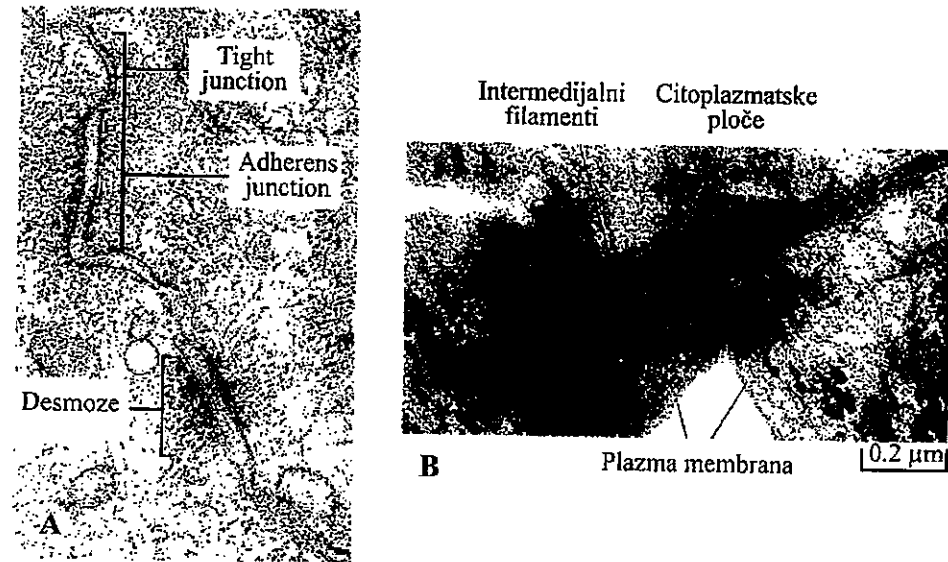
Distrofin je vezan sa aktinom u kompleks transmembranskih proteina koji se povezuje sa citoskeletom muskularnih ćelija u ekstracelularnom matriksu (vidi sliku).

Ekstranuklearni matriks
Campbell.1995.

ligati juncijom
formula celudic

Medućelijske interakcije

U procesu razvoja i funkcije multicelularnih organizama vrlo je značajna interakcija između ćelija i ekstracelularnog matriksa. Neke interakcije ćelija-ćelija prenose se direktno, kao interakcije između ćelija imunog sistema, naprimjer, interakcije između bijelih krvnih ćelija na mjestu upale tkiva. U drugom slučaju, stabilnost ćelijske interakcije ima važnu ulogu u organizaciji, diferencijaciji i funkciji ćelija. Naprimjer, stabilnost interakcija ima važnu ulogu u funkciji epitelnih ćelijskih listova u procesu embriogeneze. Jedan tip ćelijskih interakcija jeste čvrsta veza ili tajt džankšn (tight junctions) (sl.2.5A). Ovaj tip interakcija je karakterističan za neka spacificna animalna tkiva. Obično asocira po principu spajanja sa desmozama (sl. 2.5B) čineći džankšn kompleks koji je važan za funkciju epitelnih ćelija čineći barijeru prema tečnoj sredini. Tajt džankšn uspostavlja blizak kontakt između susjednih ćelija. Naprimjer, crijevni epitel odvaja lumen crijeva od donjeg vezivnog tkiva koje je prožeto krvnim kapilarima. Čvrsta veza ili tajt džankšn ima dvojaku ulogu u funkciji epitela kao barijere. Prvo, čvrsta veza je zaštitnik slobodnog prolaza molekula (obuhvatajući jone) između ćelija epitelnih ploča. Drugo, čvrsta veza odvaja apikalna i bazolateralna područja plazma membrane sprečavajući slobodnu difuziju lipida i membranskih proteina između njih.



Slika 2.5 Tight junctions (A) Elektronska mikrografija epitelnih ćelija spojene džankšn kompleksom, obuhvata tight junctions i desmoze. Kompleks se formira inetrakcijom između struka transmembranskih proteina susjednih ćelija.(B) Elektronska mifeografija prikazuje komponente desmoza između epitelnih ćelija. (Prema Newcomb, E.H. 2000.).

Zbog toga, specijalni transportni sistem u apikalnom i bazolateralnom području može biti kontrolisan i obustavljen. Posebno u ekstracelularnom dijelu, kao u slučaju transporta glukoze između crijevnog lumena i krvne tečnosti. Ovaj tip interakcije opisan je kao mjesto fuzije između listića-slojeva plazma membrane, a jasno je da sama membrana nije fuzionisana. Čelija je obavijena proteinskom mrežom. Svaki sloj (struka) u ovoj mreži je sastavljen od transmembranskih proteina vezanih za srodne proteine na susjednim ćelijama, zatvarajući na taj način prazne prostore između plazma membrana.

Susjedne ćelije komuniciraju međusobno i preko *apikalnog prstena* (zonula occludens), čiji se vrhovi epitelnih ćelija međusobno tijesno pripijaju, preko prstenja priljubljenih membranama - *desmozoma* (macula adherens). Poseban tip ćelijskih interakcija je putem neposrednih spona ili "gap džankšn" i malih molekula među ćelijama (sl.2.6A).

Desmozom - veza sa malim molekulom fuzijom slijede nexusu povezuje citoskelet susjednih ćelija. Stoga su toliko čvrsti da su u prstenu vidljivim filamentima



A

Gap junction

50 nm



B

Konekson

Slika 2.6 Gap junction (A) Elektronska mikrofografija Gap junction (strelica) između dvije ćelije jetre. (B) Gap junction sadrži 6 skupljenih koneksiona oko centralnog kanalića. Koneksioni prolaze kroz membranu. Dvije susjedne ćelije su u interakciji i komuniciraju preko otvorenih centralnih kanalića koneksiona. (Uslužnošću Don Fawcett and Wood.2000.)

Nexus ili

Gap junction je tip ćelijskih interakcija između citoplazme dvije susjedne ćelije u mnogim animalnim tkivima. Na ovaj način ćelije komuniciraju i omogućeno je puštanje jona i malih molekula između susjednih ćelija, ali se sprečava prolaz proteina i nukleinskih kiselina. Čelije epitelnog tkiva, endotelnog, ćelije srčanog mišića, ćelije glatkog mišićnog tkiva uglavnom komuniciraju preko gap junction. Joni direktno prolaze kroz gap junction i indukuju sinhronizovano kontrakciju susjednih ćelija. Gap junction, također, omogućava prolaz nekih intracelularnih molekula, kao cAMP i Ca²⁺ između susjednih ćelija koje predstavljaju signale za koordinaciju tkiva u tijelu. Gap junction je konstruisan od transmembranskih proteina nazvanih connexins (vezani). Neposredne spona izgrađene od jedinica nazvanih koneksioni (sl. 2.6B) uronjeni su u membrane i to pravilno jedni nasuprot drugima, tako da su međusobno povezani. Koneksioni su raspoređeni u heksagonalne rešetke kao što je to prvi opisao Robertson (1963.). Probijaju membranu, što znači da izviruju iz dvosloja lipida na dvije strane: citoplazmatsku i vanjsko lice. Što se tiče molekulske strukture, konekson predstavlja prstenasti proteinski oligomer, sastavljen od šest integralnih membranskih proteina, koji su raspoređeni u obliku prstena oko tankog kanalića. Pretpostavlja se da taj kanalić predstavlja hidrofilni put kojim su povezane citoplazme dviju susjednih ćelija. Još jedan primjer međusobnog kontakta i načina komuniciranja ćelija je fenomen prepoznavanja određenih područja ćelijskih membrana, između dvije ćelije. Pomoću fenomena prepoznavanja ili fenomena sinapse, ostvaruje se neuralna signalizacija, kako između dviju nervnih ćelija, tako i između motornih neurona i mišićnih ćelija.

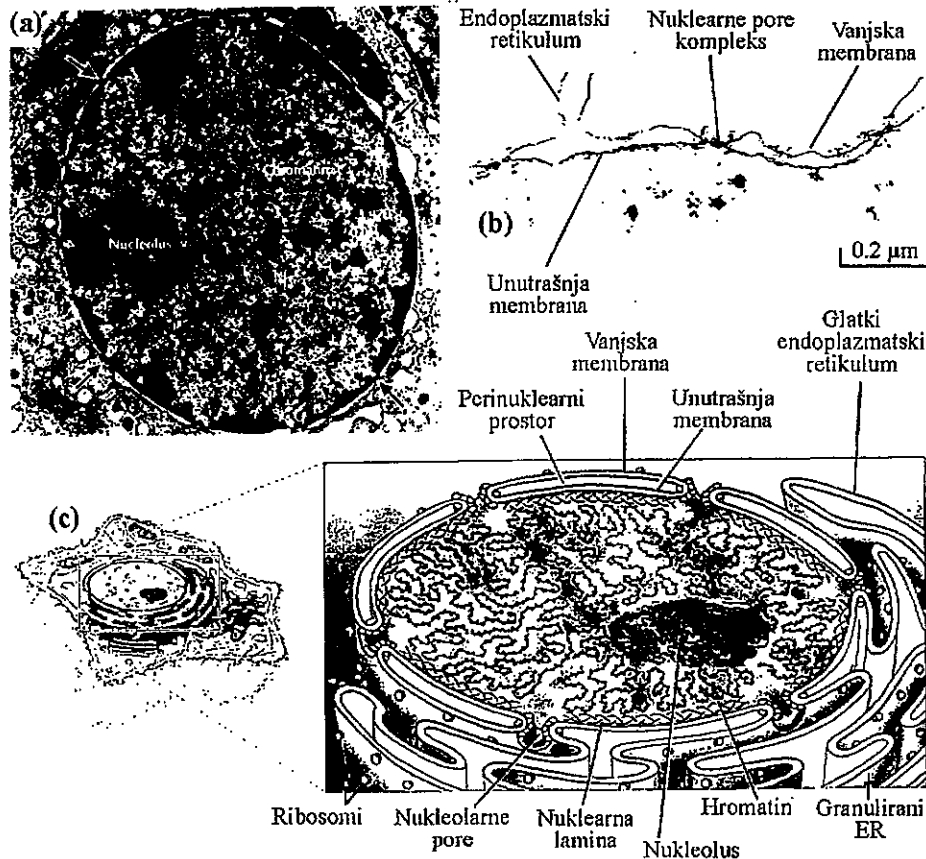
NUKLEUS

Ćelijsko jedro (lat.nucleus) i citoplazma su osnovni sastavni dijelovi ćelije neophodni za njen život. Izgled jedra u diobi i izvan diobe (u interfazi) se bitno razlikuje. Izvjesne ćelije kao što su eritrociti sisara sekundarno gube jedro. Najčešće su ćelije sa jednim jedrom, ali postoje ćelije sa po dva jedra i poznate su kao binuklearne ćelije, kao ćelije jetre sisara (hepatociti) iako većina ima jedan nukleus i polinuklearne ćelije sa više jedara (skeletalne, mišićne ćelije, osteoklasti i megakariociti i dr.). Oblik jedra je karakterističan za svaku ćeliju, a mijenja se u toku raznih faza aktivnosti i još zavisi od vrste i starosti ćelije. Najčešće je okrugao ili ovalnog oblika. Oblik zavisi u najvećoj mjeri od prirode i zastupljenosti citoskeleta. Veličina jedra somatskih ćelija je približno ista za svaku vrstu ćelija raznih životinjskih vrsta u istoj fazi aktivnosti. Međutim, dimenzije jedra iste vrste ćelija variraju zavisno od količine DNA i stepena kondenzovanosti hromosoma. Npr. u toku rasta ćelija povećava se i volumen jedra.

Organizacija nukleusa (nuklearna membrana)

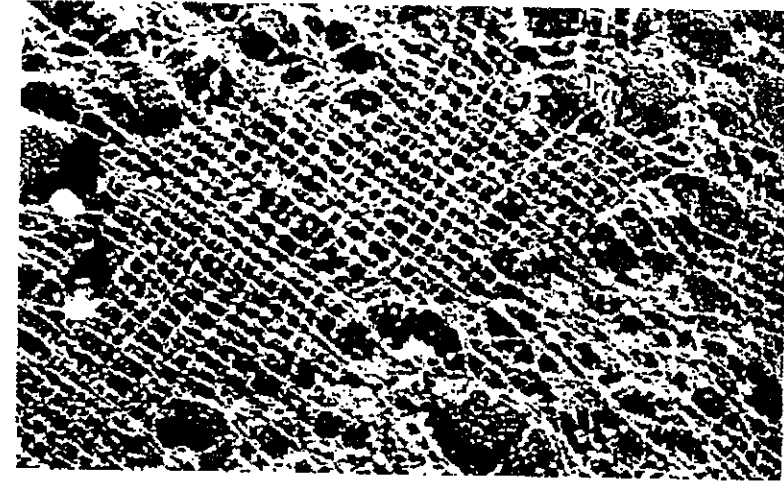
Jedro ima složenu strukturu, obavijeno je sa dvije nuklearne membrane, unutrašnjom i spoljašnjom. Unutrašnja jedrova membrana ograničava karioplazmu, dok je spoljašnja membrana povezana sa lumenom endoplazmatskog retikuluma. Po površini ove membrane nalaze se brojni ribosomi. Ove membrane su lipoproteinske prirode, slične membranama ostalih organela. Između ove dvije membrane je perinuklearni prostor. U prisustvu jona Ca^{2+} ove membrane su sposobne da se obnavljaju.

Po površini jedrove membrane nalaze se kompleksi nuklearnih pora složene strukture odgovorni za selektivni prenos proteina i RNA, između nukleusa i citoplazme. Najčešće su kružnog oblika promjera 30-100 nm. Broj pora varira u toku aktivnosti ćelije. [Postoji korelacija između broja i rasporeda pora i aktivnosti jedra razvijenosti jedra i sposobnosti za transport materijala.] U jedrovom omotaču ćelija sisara nalazi se oko 400-3000 kompleksa pora (jedna pora na mm^2 membrane) Sl. 2.7



Slika 2.7 Nukleus (a) Elektronografska slika nukleusa. (b) Unutrašnja i vanjska membrana sa brojnim porama. (c) Šematski prikaz nuklearnog sadržaja-šema ilustrira kontinuitet vanjske membrane sa endoplazmatskim retikulumom (Prema Wood and Revel .1987.)

Lamina jedra je mreža fibrilarnih proteina lokalizovana neposredno uz unutrašnju površinu jedrove membrane (sl.2.8). Ima važnu ulogu za strukturnu stabilnost omotača i za organizaciju mjesta i rasporeda interfaznih hromosoma. Lamine povezuju hromatin i pomažu i posreduju u njihovim interakcijama. Jedrova lamina je građena od jednog ili više proteina, nazvanih lamine. Proteini lamine su povezani sa središnjim filamentima proteina citoskeleta i, također, asociiraju sa drugim sličnim filamentima.



Slika 2.8 Elektronografska slika nuklearne lamine. Lamina je mreža filamentata ispod unutrašnje membrane jedra. (Uslužnošću Aebi, V., Cohn, J.1989.)

Funkcije jedrove membrane

Funkcija jedrovog omotača je složena i višestruka. Kao složene duple membrane sa razvijenim kompleksom pora one kontrolišu stalnu izmjenu materijala između citoplazme i jedra i obrnuto. Smatra se da je prolaz jona i sitnih molekula iz citoplazme u jedro moguć po cijeloj površini omotača, a da makromolekuli prolaze samo kroz pore. Jedna od osnovnih karakteristika jedrovog omotača je selektivni permeabilitet. Mehanizam transporta molekula omogućavaju enzimi jedrove ovojnice, kao npr. glikoza-6-fosfataza, nukleotid difosfataza, acidne fosfataze, ATP-aza i dr.

Makromolekule prolaze kroz pore, kako je već navedeno, selektivnim transportom pri energetskim procesima. Transport proteina iz jedra kroz kompleks nuklearnih pora odvija se na osnovu nuklearnih lokacijskih signala u receptorima. Dalje prebacivanje i transport proteina do citoplazme odvija se na osnovu nuklearnih eksport signala. Za proces translokacije kroz pore i za određivanje usmjerenog transporta upotrebljava se mala količina ATP-a.

Aktivnost nekih proteina i njihovo unošenje u jedro regulišu transkripcioni faktori. RNA se transportuje kroz nuklearne pore, kao ribonukleoproteinski kompleksi. iRNA, rRNA i tRNA se eksportuju iz nukleusa za potrebe sinteze proteina. [Male nuklearne inicijalne RNA se transportuju iz nukleusa u citoplazmu nakon što asociraju sa proteinima snRNPs i potom se vraćaju u nukleus.] x

Unutrašnja organizacija jedra

Ispitivanjem hemijskog sastava jedra utvrđeno je da njegove organizacione sastojke koji se nalaze u karioplazmi čine uglavnom proteini i nukleinske kiseline. Proteini se nalaze u obliku prostih (histoni, protamini i globulini) kao i složeni nukleoproteini u obliku jedinjenja, prostih proteina i nukleinskih kiselina. Histonski proteini pojavljuju se u obliku pet baza i predstavljaju glavnu komponentu proteina koji ulaze u sastav hromosoma. Bazični proteini se nalaze cijelom dužinom DNA molekule. Nehistonski proteini se javljaju u obliku enzima za koje se zna da imaju mnogostruku funkciju jer učestvuju u transkripciji, replikaciji i reparaciji DNA. To su: DNA-polimeraza, RNA-polimeraza, adenzin diaminaza, nukleozid fosforilaza, nukleozid trifosfataza, glikoza-fosfataza i dr. U jedru se nalaze i prekursori kiseline, kofaktori i minerali: P, Na, K, Ca i Mg, te lipidi i glikogen. Glavni izvor energije se objezbjeđuje glikolizom, odnosno aerobnim procesima u toku kojih se sintetiše ATP. [Količina nehistonskih proteina u jedru je nepostojana i zavisi od metaboličkih aktivnosti.] DNA se javlja u različitim količinama u raznih vrsta organizama. Međutim, količina DNA je stabilna karakteristika vrste jer strogo zavisi od broja i veličine hromosoma. RNA se u jedru javlja u obliku ribonukleoproteina. Ribosomske RNA nikada ne odlaze direktno u citoplazmu već prvo asociraju sa većim brojem proteina čineći jednu od struktura u ribosomskim jedinicama. Proces asocijacije odvija se u dijelu jedra koji se naziva jedarce (nukleolus). [Hromatin unutar nukleusa je

organizovan u vidu velikih petlji DNA, neke od njih se graniče sa nuklearnom masom. Hromatin jedra je nukleoprotein i boji se bazičnim bojama. Drugu konstituentu koja se ne boji bazičnim bojama čini ahromatski matriks ili kariolimfa. Hromatin u jedru se javlja u obliku: *euhromatina* i *heterohromatina* (sl. 2.9). Euhromatin se ugrađuje u tijelo hromosoma, boji se difuzno. Ovi regioni hromosoma počinju da se despiralizuju još za vrijeme telofaze. Sadrži više DNA i genetski aktivnih gena od heterohromatina. Heterohromatin je dio hromatina koji se za vrijeme interfaze ne despiralizuje već ostaje kondezovan i intezivno se boji. Postoje dvije funkcionalno različite vrste heterohromatina: konstitutivni i fakultativni heterohromatin. Konstitutivni ili strukturni heterohromatin je gusto kondezovan i precizno raspoređen u određenim hromosomskim regionima, tako da se pojavljuje na

11
istim mjestima u oba homologna hromosoma diploidnog komplementa i u istoj količini. Konstitutivni heterohromatin se prema mjestu nalaženja obilježava kao centromerni. Lociran je u području centromere hromosoma. Fakultativni heterohromatin je karakterističan po ispoljavanju u nejednakim količinama i na različitim mjestima u jednom paru homolognih hromosoma.



Slika 2.9 Heterohromatin u interfazi nukleusa distribuiran unutar nukleusa. Elektronska mikrofotografija prikazuje heterohromatin naznačen vrhom strelice a nukleolus strelicom. (Uslužnoću, Lodish H. et al. 2002.)

Unutrašnja organizacija jedra je određena funkcionalnim područjima tj. lokacijama nekih procesa u određenim regionima, kao DNA replikacija ili pre-iRNA proces (obrada primarnog transkripta iRNA) itd. Procesu mogu biti locirani u subnuklearnoj strukturi ili nekom drugom području nukleusa.

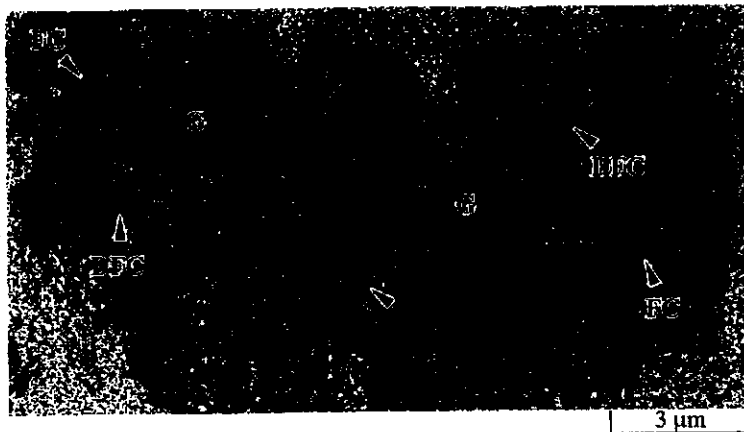
Priroda i funkcija ovih nuklearnih substrukture nije još poznata. Međutim, poznavanje organizacije funkcionalnih područja unutar nukleusa je nepotpuno istražen prostor biologije ćelije. DNA replikacija, transkripcija, splajsing komponente su centralne komponente unutrašnje organizacije u nukleolarnom matriksu koji se još definiše kao strukturni skelet nukleusa. Ima analognu ulogu citoskeletu. Sadrži hromatin omče DNA, replikacione faktore, splajsing područje i struktura uključuje još iRNA transport.

NUKLEOLUS

Jedna od značajnih substrukture nukleusa je nukleolus, koji je mjesto za transkripciju rRNA i strukturiranje ribosoma. U toku aktivnog rasta ćelija sisara, naprimjer, ima 5-10 miliona ribosoma. Broj, veličina i oblik nukleolusa je vrlo različit, zavisi od vrste ćelije i stanja aktivnosti ćelije. Nukleolus je ribosomalni produkcijski faktor, jer proizvodi veliku količinu rRNA potrebne za ribosomne subjedinice.

Organizacija nukleolusa i ribosomalni RNA-geni

Morfološki, nukleolus sadrži tri različita regiona: fibrilarni centar, guste fibrilarne komponente i granularne komponente (sl. 2.10.). Ovi različiti region su mjesta transkripcije rRNA. Ribosomalni geni su locirani u fibrilarnom centru, a procesi transkripcije se dešavaju na granici između fibrilarnog centra i zbijenih fibrilarnih komponenti. Proces sinteze pre-rRNA (prekursora RNA) se inicira u zbijenim fibrilarnim komponentama, a nastavlja u području granularne zone gdje rRNA asocira sa ribosomalnim proteinima, formiraju male periribosomalne subjedinice spremne za eksport u citoplazmu.



Slika 2.10 Struktura nukleolusa. Elektronska mikrofografija prikazuje fibrilarni centar (FC), gusto zbijene fibrilarne komponente (DFC) i granularne komponente (G) nukleolusa (Uslužnošću Cooper G.M. 2000.)

Prateći ćelijsku diobu, nuklearna forma oko hromosomalnih regiona koja se, prije svega, naziva region organizator nukleolusa (skraćeno, NOR) obuhvata 5.8S, 18S i 28S rRNA gene. To je sekundarno suženje hromosoma i formira se za vrijeme mitoze. Ova suženja (mostovi) asociraju sa nukleolusom. Humani genom, naprimjer, obuhvata oko 200 kopija gena koji kodiraju 5.8S, 18S i 28S rRNA i približno oko 2000 kopija gena koji kodiraju 5S rRNA. Geni se nalaze

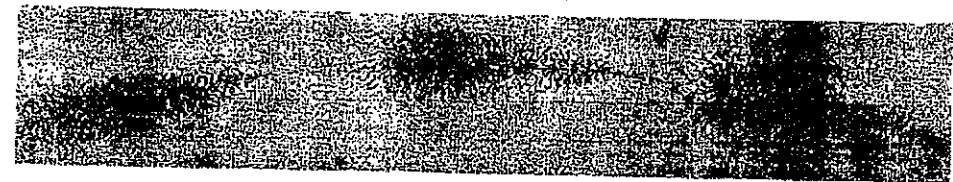
u tandemima na 5 različitih hromosoma (13, 14, 15, 21 i 22), a 5 S rRNA geni su u jednom tandemu smješteni u hromosomu br. 1. Neki nukleolarni hromosomi sa nukleolusima prikazani su na slici 2.11



Slika 2.11 Nukleolusi (n) na sekundarnim suženjima nukleolarnih hromosoma u mamalija označeni strelicom (sc). (Prema Curtis-Barnes: 1989.)

Djelimično važna produkcija ribosomalnih gena odvija se u oocitama, čiji se rRNA geni amplifiraju i objezbjeđuju za rani embrionalni razvoj. U oocitama *Xenopus* rRNA geni se amplifiraju približno hiljadu puta što se rezultira u oko jedan milion kopija na jednu ćeliju. Ovi amplificirani rRNA geni se distribuiraju iz nukleusa što objezbjeđuje akumulaciju blizu 1012 ribosoma po jednoj oociti.

Transkripcija i obrada rRNA se odvija sa DNA u interfazi ćelijskog ciklusa pod kontrolom enzima polimeraze. Svaki region organizator nukleolusa (NOR) sadrži tandeme repetitivnih rRNA gena, odvojenih jedan od drugog neredovitim dijelovima DNA. Elektronska mikrofografija prikazuje svaki tandem rRNA gena obavijen gusto zbijenim RNA lancima po kojima se nalaze molekule enzima RNA polimeraze (sl.2.12)



Slika 2.12 Transkripcija rRNA gena Elektronska mikrofografija nuklearnog hromatina, pokazuje tri gena rRNA razdvojena netranskripcionim sekvencijama DNA. Svaki od tri gena je obavijen velikim brojem omči rastućeg rRNA lanca.

Modifikacija i obrada primarnog transkripta rRNA koji je dugačak, jer sadrži i ribosomalne gene i netranskripcione sekvence, odvija se na sličan način kao i postsintetska obrada tRNA.

CITOPLAZMATSKI ORGANELI

Eukariotske ćelije se razlikuju u prisustvu organela odvojenih membranama od citoplazme. Organele su mjesta u kojima se odvijaju specifične aktivnosti. Unutar složene organizacije eukariotskih ćelija odvija se proces sinteze proteina (u ribosomima) kao i izdvajanje i transport proteina. Prvi korak izdvajanja proteina je u procesu translacije. Mnogi proteini su sadržani u ER, Goldžijevom kompleksu, lisosomima i plazma membrani. Polipeptidi sintetisani u poliribosomima na membrani ER transportuju se u vezikule Goldžijevog kompleksa, gdje se obrađuju, a potom transportuju u lisosome, plazma membranu ili sekretorne ćelije. ER, Goldžijev kompleks i lisosomi su značajniji od drugih citoplazmatskih organela, jer su uključeni u obradi proteina i povezani su sa vezikularnim transportom.

RIBOSOMI

(organizacija ribosoma)

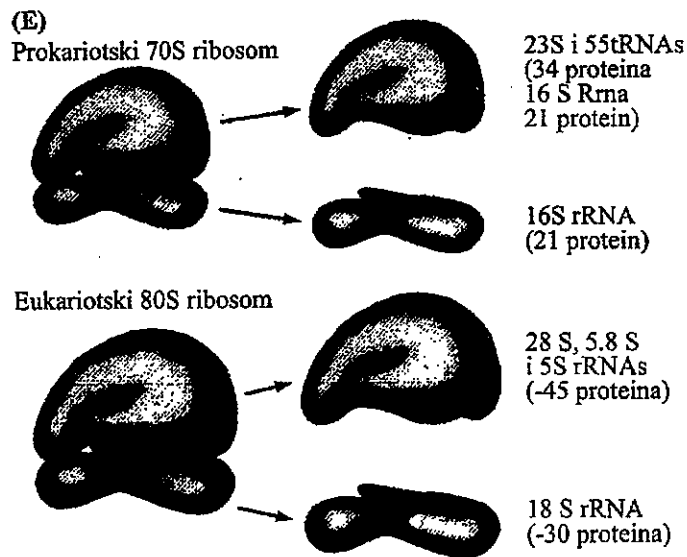
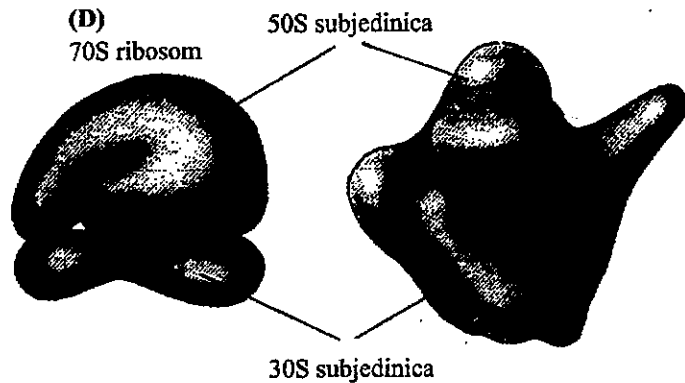
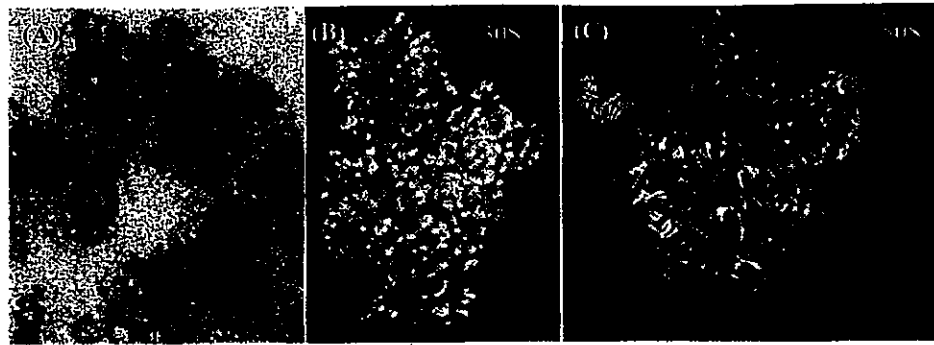
Ribosomi posmatrani elektronskim mikroskopom izgledaju kao kompaktne čestice sfernog oblika, lokalizovani na raznim mjestima u citoplazmi eukariotskih ćelija, bakterija, modrozelenih algi, mitohondrijima, nukleolusu i hloroplastima. Velikim dijelom su fiksirani za spoljašnju membranu jedra i na određenim dijelovima membrane endoplazmatskog retikuluma. Broj ribosoma je različit ne samo u raznim vrstama ćelija već i u raznim fazama aktivnosti. Naprimjer, dok se kod bakterija *Escherichia coli* nalazi oko 6000 ribosoma na jednom kvadratnom mikronu, u citoplazmi retikulocita kunića ima oko 100 u jednom kvadratnom μm . Čisti ribosomi se dobijaju diferencijalnom centrifugacijom homogenata ćelija koji, pored ribosoma, sadrži i sve proteinske faktore neophodne za sintezu proteina.

Ribosomi se sastoje od dvije komponente-subjedinice (sl. 2.13). Subjedinice ribosoma povezuju se u monosome u prisustvu jona Mg^{2+} i proteinskih faktora. Ribosomi bakterija i eukariota, plavozelenih algi, mitohondrija, hloroplasta imaju sedimentacionu konstantu 70S (Svajnbergova konstanta), a molekulsku težinu 2.7×10^6 , sadrže 65% rRNA i 35% proteina. Citohemijском analizom je utvrđeno da se ribosomi sastoje uglavnom od proteina (50%) i rRNA (45%). U eukariotskim ćelijama utvrđeno je oko 80 različitih proteina u ribosomima. Pretpostavlja se da imaju prvenstveno strukturnu ulogu, zatim da imaju katalitičko djelovanje u procesu sinteze proteina. Postoje proteini koji su slabo vezani za ribosome i koji se pri ponovljenom centrifugiranju odvajaju od ribosoma. Druga vrsta proteina je tijesno povezana sa ribosomima. Treću grupu čine proteini ireverzibilno vezani za partikule. To je slučaj sa strukturnim proteinima koji su

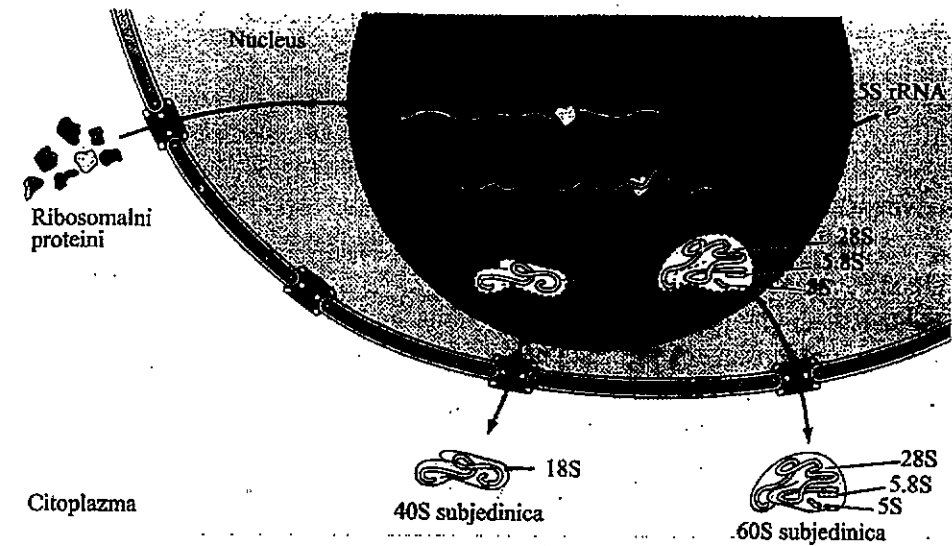
neposredno vezani za rRNA, imaju potpunu ulogu za rRNA lanac i utiču na formiranje oblika ribosoma. Što se tiče rRNA, ona je prisutna u obje subjedinice. Njena sedimentaciona konstanta kod eukariotskih ćelija je 18S u manjoj subjedinici, a kod prokariota 16S, dok je u većoj subjedinici kod eukariota zastupljena rRNA sa sedimentacionom konstantom 28S, 5S, 5S, a kod prokariota rRNA sa sedimentacionom konstantom 23S i 5S. Obje komponente ribosoma i proteini i rRNA su materije koje se sintetisaju pod kontrolom gena. Poznato je da se geni koji kontrolišu sintezu ovih materija nalaze u genomu ćelije. Tako je kod prokariota utvrđeno da su to tri susjedna gena koji se nalaze u određenom dijelu cirkulatornog hromozoma. Ovi geni se mogu ponavljati nekoliko puta.

Formiranje ribosoma

U formiranju ribosoma glavnu ulogu ima jedarce-nukleolus i nukleolarni hromosomi. To su najčešće akrocentrični hromosomi iz grupe D i G humanog kariotipa. Formiranje ribosoma podrazumijeva spajanje ribosomalnog prekursora RNA sa ribosomalnim proteinima (sl. 2.14). Geni koji kodiraju ribosomalne proteine transkribuju se van nukleolusa u prisustvu RNA polimeraze II. Potom se ribosomalni proteini transportuju iz citoplazme u nukleolus gdje vezuju rRNA formirajući preribosomalne partikule. Vezivanje ribosomalnih proteina sa pre-rRNA započinje kada se i pre-rRNA počinje sintetisati. Više od polovine ribosomalnih proteina se veže za pre-rRNA prije nego se ova odvoji, a ostali dio se ugrađuje pri samom odvajanju pre-rRNA. Male ribosomalne subjedinice koje sadržavaju samo npr. 18SrRNA sazrijevaju prije velikih subjedinica koje sadržavaju više rRNA, kao 28S, 5S rRNA. Finalni stadij formiranja ribosoma prati eksport periribosomalnih partikula u citoplazmu formirajući zrele aktivne 40S i 60S subjedinice eukariotskih ribosoma (sl. 2.14).



Slika 2.13 Struktura ribosoma. (A) Elektronska mikrografija 50S ribosomalne subjedinice bakterije *E.coli*. (B-C). Visokorezolutni X-zraci kristal strukture 30S i 50S ribosomalnih subjedinica. (D). Model ribosomalne strukture. (E). Komponente prokariotskih i eukariotskih ribosoma. (Prema Cooper G.M. 2000.)



Slika 2.14 Formiranje ribosoma. Ribosomalni proteini dolaze iz citoplazme u nukleolus gdje počinje spajanje sa pre-rRNA. Nakon obrade pre-rRNA dodaju se ribosomalni proteini iz citoplazme i vezuju se za preribosomalne partikule. Nastale partikule prebacuju se u citoplazmu dajući 40S i 60S ribosomalne subjedinice. (Uslužnošću Cooper G.M. 2000.)

Funkcija ribosoma

Funkcija ribosoma je u procesu sinteze proteina, tj. prevodenju genetskog programa u strukturu proteina. Međutim, ovu funkciju ribosomi ne mogu provesti pojedinačno već samo u obliku kompleksa-poliribosoma. Poliribosomi su organeli koje čine ribosomi vezani za iRNA. Pod poliribosomom se podrazumijeva jedan molekul iRNK sa najmanje dva ribosoma, što zavisi od veličine iRNK koja se za njih vezuje i veličine molekula proteina koji se na njima sintetišu. U citoplazmi se nalaze slobodni i vezani polisomi. Slobodni polisomi sintetišu citoplazmine proteine, a polisomi vezani za E.R. obrazuju granulisan E.R. i na njemu se sintetišu ekskretni proteini. Razgradnja poliribosoma na ribosome nastaje nakon završene sinteze specifičnog proteina. Nakon toga slobodni ribosomi se ponovno spajaju u poliribosome, spremni za sintezu specifičnog proteina.

BIOENERGETIKA I METABOLIZAM.**MITOHONDRIJI**

Mitohondrije su organele citoplazme, nalaze se u svim eukariotskim ćelijama, nema ih u eritrocitima sisara i ćelijama organizama čija se metabolička aktivnost odvija u anaerobnim uslovima. Oblik mitohondrija je različit i promjenljiv.

Najčešće su u obliku končića, štapića ili su sfernog oblika. Veličina je, također, različita i iznosi od 0,2x2 μm do 2x7 μm. Ima ćelija (spermatide) u kojima se mitohondrije međusobno spajaju, nakon čega se formira organela spiralno orijentisana oko fibrila i na taj način zauzima najpovoljniji odnos koji omogućava pokretanje spermatozoida. Broj mitohondrija u raznim vrstama ćelija varira. U nekim ćelijama se nalazi samo po nekoliko mitohondrija ili samo jedna mitohondrija. Broj mitohondrija se kreće od 50-500, naročito su brojne u ćelijama sa visokom respiratornom aktivnošću. Brojne su na spojevima nervnih ćelija u aktivnom dijelu spermatozoida i u mišićnim ćelijama. U ćelijama jetre broj se kreće od 100 do 2500. Postoje jednoćelijski organizmi sa oko 500.000 mitohondrija (Haos-Haos). Međutim, tipična ćelija sadrži 200-300 mitohondrija i prosječno čine 15-20% volumena ćelije. Raspored mitohondrija zavisi od specifičnosti ćelija, ciklusa, fiziološke aktivnosti ćelija, razvijenosti i stanja drugih citoplazmatskih organela. U toku metafaze nalaze se u blizini diobjenog vretena. Nakon diobe ravnomjerno se raspoređuju i na jednake dijelove u kćeri ćelije. U žljezdanim ćelijama sa vrlo razvijenim membranoznim sistemom često su potisnute u ostale dijelove citoplazme i nalaze se u grupama.

Porijeklo mitohondrija se objašnjava na više načina: stvaranje od membrane endoplazmatskog retikuluma, jedrove i plazmine membrane. Ova tvrdanja se zasniva na nalazima da postoji kontinuitet između mitohondrijalne membrane sa membranama jedra, endoplazmatskog retikuluma i membranama vakuola. Sintaza mitohondrija de novo zasniva se na ne baš ubjedljivim dokazima kao što su frakcionisanje i nalaz mitohondrija u frakciji jajne ćelije koja na početku eksperimenta nije sadržavala ove granule. Nastajanje mitohondrija diobom (sl. 2.15) je konačno potvrđeno stavljanjem mutanata *Neurospora crassa* u medijum sa radioaktivnim holinom. Prateći raspored i broj granula srebra u mitohondrijama, poslije raznih vremenskih intervala, ustanovljeno je da se broj ovih organela povećava, a broj granula srazmjerno opada. Time je dokazano da mitohondrije nastaju diobom. Poluvijek ovih organela iznosi 10,3 dana. Ali, razlike u poluvijeku raznih vrsta ćelija su vrlo velike i vezane sa sastavom i aktivnošću ovih organela. Poluvijek mitohondrija je uglavnom mnogo kraći od ćelija u kojima se nalaze (Gray, M.W.1999).



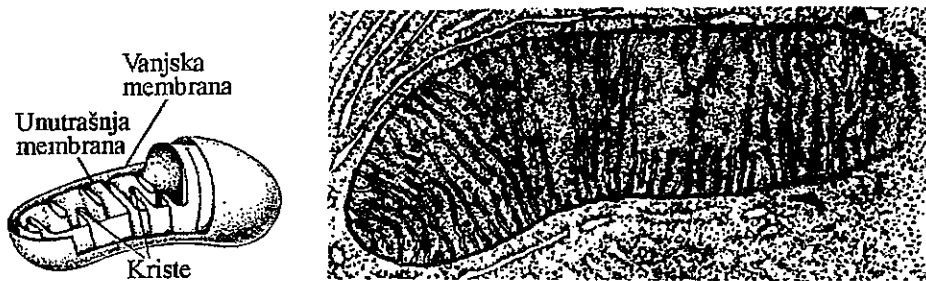
Slika 2.15 Elektronska mikrofografija mitohondrija u diobi. Podjela mitohondrija na dvije kćeri ćelije je upravo na kraju. (Lodisch H. et al.2001.)

Organizacija mitohondrija

Mitohondrije su obavijene duplom membranom, unutrašnjom i vanjskom, razdvojene intermembranskim prostorom. Spoljašnja membrana odvaja mitohondrije od citoplazme, a unutrašnja obrazuje invaginacije ili kriste prema središtu (sl. 2.16). Kriste povećavaju ukupnu površinu unutrašnje membrane. Broj krista, pravac pružanja i međusobni odnos su različiti i specifični za svaku vrstu ćelije. Najbrojnije su u srčanim mišićnim ćelijama. Ima mitohondrija u kojima kriste obrazuju tubule-tubularne kriste. One se nalaze, naprimjer, u mitohondrijama ćelija koje sintetišu steroide, kao što su nadrenokortikociti nadbubrežnih žlijezda. Na kristama prema matriksu nalaze se brojne kratke izbočine (čvorići) koje se zajedno označavaju kao FoF kompleks proteina, a predstavljaju enzimski sistem (ATP sinteze) koji sintetiše ATP iz ADP-a i P_i.

Membrane mitohondrija su građene od proteina i lipida. Proteini su zastupljeni sa 60-65%, od toga 50% su strukturni proteini, a ostali imaju enzimatsku funkciju. Lipidi su zastupljeni sa 35-40%, najviše ima fosfolipida. Enzimi mitohondrija ili su vezani za membrane ili se nalaze u matriksu. Enzimi čija je lokacija ograničena označeni su kao obilježivači, tako se, naprimjer, citohrom-oksidadza smatra isključivo mitohondrijski enzim. Opet, druga grupa enzima koji se nalaze kako u mitohondrijama tako i u citoplazmi, a katalizuju iste reakcije, ali su različiti njihovi molekularni oblici, označeni su kao izoenzimi.

Rezultati istraživanja pokazuju da se spoljašnja i unutrašnja membrana razlikuju u permeabilnosti i sastavu lipida i proteina. Enzim spoljašnje membrane je, [naprimjer, NADH citokrom b5 monoaminoooksidaza,] (enzim obilježivač). U unutrašnjoj membrani nalaze se enzimi koji učestvuju u vezivanju kiseonika i transportu elektrona i proteina, kao i permeaza-protein koji transportuje molekule, kao što su ADP, ATP, fosfat i citrat, tako što formiraju kanale kroz koje molekule mogu ulaziti i izlaziti iz mitohondrija. Tu su, dakle, enzimi respiratornog lanca i enzimi fosforilacije kao, naprimjer, glicerofosfatoholin hidrogenaza, nikotinamid-adenin dinukleotid transhidrogenaza, nikotinamid-adenin dinukleotid dehidrogenaza, translokaza i drugi. Enzimi intermembranoznog prostora su adenilat, kreatin i nukleozid difosfat kinaza. Enzimi matriksa: glutamin hidrogenaza, kompleks piruvat dehidrogenaza. U matriksu su zastupljeni i enzimi koji učestvuju u biosintezi nukleinskih kiselina i proteina, enzimi koji objezbjeđuju oksidaciju masnih kiselina, enzimi Krebsovog ciklusa, enzimi metabolizma ugljenih hidrata, lipida i metabolizma masnih kiselina

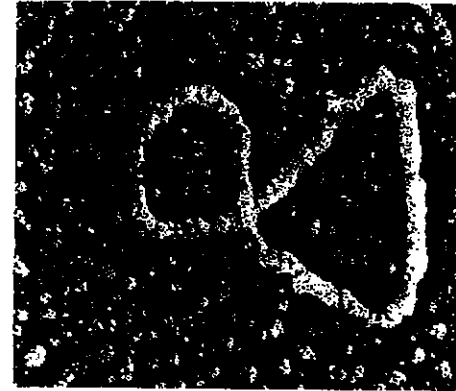


Slika 2.16 Struktura mitohondrija. Mitohondriji se graniče dvostrukom lipoproteinskom membranom. Nabori unutrašnje membrane (kriste) pružaju se kroz matriks. (Mikrografija od Porter, K.R.)

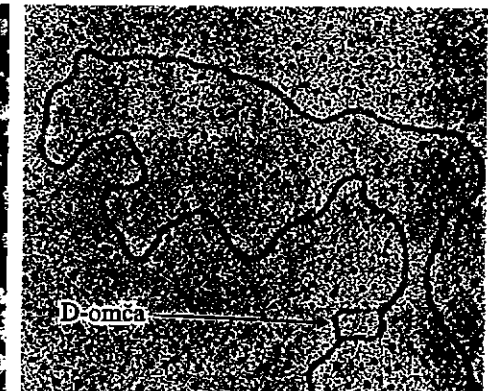
Genom mitohondrija

U mitohondrijima se nalazi manja količina DNA (sl. 2.17). Prisustvo DNA je ustanovljeno primjenom elektronskog mikroskopa, autoradiografski i bojenjem po Feulgenu. Nukleinske kiseline (DNA i RNA) nalaze se u matriksu, predjelu nukleoida i u kontaktu su sa unutrašnjom membranom ili kristama. DNA mitohondrija većine vrsta ćelija je dvolančana i ima cirkulatoran oblik dužine prosječno 4, 74 - 5, 45 m. Replikacija ove DNA je nezavisna u odnosu na replikaciju DNA jedra i odvija se pod, također, kontrolom enzima polimeraze. Proces replikacije mtDNA (sl. 2.18) odvija se van ćelijskog ciklusa kada se dešava nukleolarna DNA replikacija. Kod najvećeg broja organizama dva lanca mtDNA imaju različitu gustoću označeni su sa H (teški) i L (laki) lanac.

D-omča model replikacije pokazuje relativnu asimetričnost u DNA replikaciji komplementarnih lanaca H i L, ali se lanci kompletiraju u toku procesa replikacije. Ako u prosjeku ima oko 800 organela u jednoj ćeliji, mitohondrijalna DNA čini 1% ukupne ćelijske DNA. mtDNA je u potpunosti sekvencirana. Veoma mali procenat nukleotida predstavlja kontrolne sekvencije koje započinju replikaciju, uglavnom su to kodirajuće sekvencije



Slika 2.17 Elektronska mikrofotografija mitohondrijske DNA.



Slika 2.18 Elektronska mikrofotografija mtDNA replikacije obuhvata formaciju strukture D-omče. (Prema Russel P.J. 1992.)

U sastavu matriksa ustanovljeno je prisustvo granula prečnika oko 120A bogate molekulama RNA za koje se smatra da su ekvivalentne ribosomima (tab. 2.1) što ukazuje na to da se u mitohondrijama nalazi, ne samo molekuli DNA, već da sadrže kompletan mehanizam za replikaciju DNA, transkripciju, odnosno za biosintezu proteina. Ribosomi imaju protein-sintetski mehanizam i u nekim formama je analoogan sintezi proteina kod bakterija kao, naprimjer, inicijalni faktor (IF). Informaciju za sintezu proteina prenosi iRNA koja se transkribuje sa mtDNA sa koje se transkribuju i obje rRNA kao i sve tRNA.

Tabela 2.1 Relativna veličina mitohondrijalnih (mt) ribosoma i citoplazmatskih. (cito) ribosoma u humanim i ćelijama kvasca.

	Humane (HELA) ćelije		Kvasac	
	mt	cito	mt	cito
RIBOSOMI				
Velika subjedinice	60S	74S	75S	80S
Mala subjedinice	45S	60S	53S	60S
	35S	40S	35S	40S
RIBOSOMALNA RNA				
Velika ribosomalna subjedinica	16S	28S	21S	26S
Mala ribosomalna subjedinica	12S	18S	15S	18S

DNA mitohondrija sadrži strukturne gene (13) za oko 40 polipeptida koji su dijelovi respiratornog lanca i sastava oksidativne fosforilacije, zatim dva gena za rRNA (16 SrRNA i 12 SrRNA) koji strukturiraju veliku i malu subjedinicu ribosoma i 22 gena za tRNA molekule mitohondrija. Geni za tRNA su na različitim mjestima H i L lanca (sl.2.20) Nalaze se u grupama, a neki pojedinačno jedan između drugog ribosomalnog gena. Protein kodirajući geni su nađeni u oba lanca. Ima gena koji imaju introne koji moraju biti "isječeni" prije funkcionalne rRNA, što znači da se i mtDNA postsintetski obraduje.

Mitohondrijalna DNA ili mitohondrijski hromosom je prisutan u hiljadama kopija. Graden je od 17 000 pari baza koje sadržavaju više od 5000 kodova (sl. 2.17) što znači da maksimalno može da kodira oko 5000 amino kiselina.

	U	C	A	G	
U	77 UUU Phe 140 UUC 73 UUA Leu 17 UUG	32 UCU Ser 99 UCC 83 UCA 7 UCG	46 UAU Tyr 89 UAC UAA Stop UAG Stop	5 UGU Cys 17 UGC 93 UGA Trp 10 UGG	U C A G
C	65 CUU Leu 167 CUC 276 CUA 45 CUG	41 CCU Pro 119 CCC 52 CCA 7 CCG	18 CAU His 79 CAC 81 CAA Gln 9 CAG	7 CGU Arg 25 CGC 29 CGA 2 CGG	U C A G
A	125 AUU Ile 196 AUC 166 AUA Met 40 AUG	51 ACU Thr 155 ACC 133 ACA 10 ACG	33 AAU Asn 130 AAC 85 AAA Lys 10 AAG	14 AGU Ser 39 AGC AGY Stop AGG Stop	U C A G
G	30 GUU Val 49 GUC 71 GUA 18 GUG	43 GCU Ala 124 GCC 80 GCA 8 GCG	15 GAU Asp 55 GAC 64 GAA Glu 24 GAG	24 GGU Gly 88 GGC 67 CGA 34 GGG	U C A G

Slika 2.19 Genetski kod humanog mitohondrijalnog genoma. Kodovi AUA, UGA, AGA i AGG imaju različito svojstvo kodiranja (vezuju dvije amino kiseline ili su STOP kodovi) u odnosu na mnoge eukariotske i prokariotske organizme.

Veći dio mitohondrijske DNA ima funkciju koda koji se razlikuje od bilo kojeg drugog genetskog koda, npr. koda jedra ili genetskog koda prokariotske DNA.

Slika 2.19 prikazuje genetski kod humanog mitohondrijalnog genoma, kao i broj kodona u genomu mitohondrija. Prikazani su svi kodoni, kao i terminacioni UAA i UAG i drugi. Interesantno je da genetski kod mitohondrija kvasca nije u potpunosti identičan sa genetskim kodom humanih mitohondrija. Tabela 2.2 prikazuje te razlike. To ukazuje da mitohondrijski genetski kod može biti različit u mnogih eukariota. Drugim riječima, genetski kod nije univerzalan kao što je bilo mišljenje u oblasti klasične genetike (tabela 2.3).

Tabela 2.2 Razlike između genetskog koda mitohondrija humanih ćelija i ćelija kvasca

Kodon	Nuklearni kod	Nuklearni kod	
		Životinja	Kvasca
UGA	Terminacioni	Triptofan	Triptofan
AUA	Izoleucin	Metionin	Izoleucin
CUNb	Leucin	Leucin	Treonin
AGG, AGA	Arginin	Terminacioni	Atginin
CGNb	Arginin	Arginin	Terminacioni

AAll sekvence u smjeru 5 prim prema 3 prim

Bn = samo jedna od 4 baze A, G, U i C.

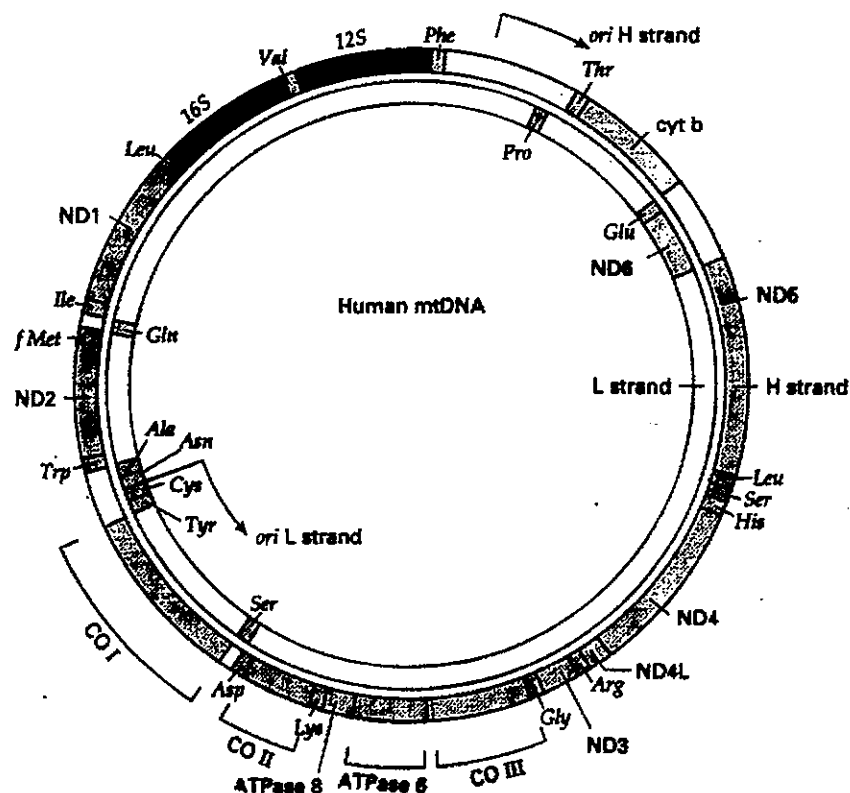
Tabela 2.3 Razlike između univerzalnog i mitohondrijalnog genetskog koda

Kodon	Univerzalni kod	Humani mitohondrijalni kod
UGA	STOP	Trp
AGA	Arg	STOP
AGG	Arg	STOP
AUA	Le	Met

Drugi kodoni variraju od univerzalnog koda u kvasca i mitohondrijama biljaka.

DNA mitohondrija može se mijenjati spontano ili inducirano djelovanjem različitih mutagenih faktora sredine. Mutacije najčešće imaju za posljedicu bolesti koje se najčešće nasljeđuju preko citoplazme. Mehanizam mitohondrijskog nasljeđivanja kao i neke nasljedne bolesti koje se javljaju kao posljedica mutacija mtDNA opisan je u poglavlju ekstranuklearno nasljeđivanje.

Mapa gena humane mitohondrijalne DNA



Slika 2.20 Mapa prikazuje veliki broj gena humane mtDNA koja je inače u cijelosti sekvencirana. (Prema Anderssen S.G.E. et al.1991.)

Funkcija mitohondrija

Mitohondriji su osnovna mjesta produkcije ATP u aerobnim ćelijama. ATP su glavne energetske molekule u živom svijetu. Učestvuju u različitim ćelijskim procesima, od hemijske biosinteze do kretanja ćelija, kontrakcije mišića, aktivnog transporta molekula kroz ćelijsku membranu ili širenja elektronskog impulsa kroz nervna vlakna. U mitohondrijima se proizvodi velika količina energije pri razgradnji karbohidrata ili u procesu oksidativne fosforilizacije. Npr. razgradnjom glukoze pri glikolizi oslobadaju se 4 molekule ATP, 10 molekula NADH i 2 molekule FADH₂. Elektroni NADH i FADH₂ se potom transformišu u molekularni oksigen vezujući se na dodatnu formaciju od 32 na 34 ATP oksidativnom fosforilizacijom. Transport elektrona i oksidativna fosforilizacija su osnovne aktivnosti proteinskih kompleksa unutrašnje mitohondrijske membrane s krajnjim ciljem proizvodnje ćelijske energije.

 Glikoliza i ćelijsko disanje
(sinteza molekula ATP)

Slobodna energija nastala u organizmu upotrebljava se za funkciju i rad ćelije. Razlaganje glukoze se odvija u dvije faze. U prvoj, poznatoj kao glikoliza, molekula glukoze koja sadrži 6 ugljenikovitih atoma razdvaja se na dvije molekule jedinjenja sastavljenog od 3 ugljenikova atoma (pirogroždana kiselina). Elektrone prihvata NAD (nikotinamide-adenin dinukleotid), posebne molekule, primaoci atoma vodonika, pri čemu se oslobada relativno mali dio od ukupne energije molekule glukoze. U drugoj fazi oksidacije glukoze, koja se naziva ćelijsko disanje ili respiracija, elektrone i protone otklonjene kroz seriju reakcija sa ugljenikovim atomima, prihvata kiseonik, pri čemu se oslobada relativno velika količina energije. Razlaganjem jedne molekule glukoze, tokom glikolize i ćelijskog disanja, nastaje 36 molekula ATP-a iz ADP-a.

Glikoliza

Proces anaerobnog disanja (anaerobna respiracija ili glikoliza) se odvija u citoplazmi, direktnije u citosolu (van mitohondrija) u 9 faza i svaka je katalizovana specifičnim enzimom. Na početku glikolize energija se troši prenošenjem 2 fosfatne grupe sa 2 molekule ATP-a na šećer. Ovo ulaganje energije dovodi do razgradnje jedinjenja sa 6 C-atoma (glukoza) na 2 molekule jedinjenja sa 3-C atoma (fosfoglicerin-aldehid). U daljem procesu svaka od ove 2 molekule se oksidiše (to znači otklanjaju se vodonikovi atomi sa njihovim elektronima) do pirogroždane kiseline, a oslobodena energija se deponuje u NADH (primajući vodonikove atome NAD se redukuje u NADH) i ATP. U ovom procesu ukupno nastaju 2 molekule NADH (iz 2 molekule NAD⁺) i 4 molekule ATP-a (iz 4 molekule ADP-a). Pošto je za otpočinjanje glikolize neophodna energija iz fosfatnih veza 2 molekule ATP-a, čisti energetski dobitak po molekuli glukoze su 2 molekule ATP-a i 2 molekule NADH-a. Dvije molekule pirogroždane kiseline, dobijene na kraju glikolize, sadrže još uvijek veliku količinu potencijalne energije koja je bila deponovana u početnoj molekuli glukoze. Ova serija reakcija izvodi se u svim živim ćelijama, od prokariota do eukariota.

U nedostatku dovoljne količine kiseonika, kada je njegova potrošnja u ćelijama velika (npr., prilikom vršenja napornog rada, u mišićnim ćelijama) pirogroždana kiselina se redukuje u mliječnu kiselinu. Na ovaj način se regeneriše akceptor vodonika NAD čiji nedostatak dovodi do smrti ćelije, jer obustavlja proces dehidrogenacije u glikolizi. Dovodom kiseonika u ćeliju mliječna kiselina dehidrogenacijom prelazi u pirogroždanu kiselinu, a ova se zatim uključuje u dalji proces razlaganja putem oksidacije. Iz ćelija anaerobnih organizama koji ne posjeduju mehanizme za aerobnu respiraciju mliječna kiselina se odstranjuje. U biljnim anaerobnim ćelijama vrše se dekarboksilacija i

redukcija pirogroždane kiseline u etil-alkohol. Ova pojava se naziva fermentacija. Intermedijarna jedinjenja, mliječna kiselina i etil-alkohol još uvijek su bogati energijom.

Ćelijsko disanje

Sljedeća faza u razgradnji glukoze se odvija u mitohondrijama. U ovoj fazi se postepeno oksidira pirogroždana kiselina do CO₂ i H₂O u prisustvu kiseonika-proces je poznat kao ćelijsko disanje ili respiracija.

Ćelijsko disanje se odvija kroz dva procesa: *Krebsov ciklus* ili ciklus limunske kiseline i transport elektrona. Obje reakcije se odvijaju u mitohondriji, pri čemu se stvara 95% ATP-a.

Kao što je navedeno, mitohondrija je obavijena sa dvije membrane: spoljašnjom, glatkom, i unutrašnjom koja formira nabore-kriste. U unutrašnjem prostoru koji opkoljava kriste nalazi se gusti rastvor (matriks) koji sadrži prethodno navedene enzime, koenzime, vodu, fosfate i druge materije koje učestvuju u respiraciji. Spoljašnja membrana je propustljiva za većinu malih molekula, dok unutrašnja omogućava prolaz samo određenih molekula kao što su pirogroždana kiselina i ATP, a zadržava prolaz drugih molekula. Neki enzimi Krebsovog ciklusa su u matriksu, dok su ostali ugrađeni u membrane krista, kao i enzimi i druge komponente transportnog lanca elektrona. Otuda je oko 80% unutrašnje membrane mitohondrija proteinske prirode.

Pirogroždana kiselina nastala tokom glikolize u citoplazmi oksidiše se u mitohondriji u ugljen-dioksid i vodu završavajući tako razgradnju molekule glukoze.

Transport elektronskog lanca

Samo dio energije dobiven oksidacijom glukoze biva utrošen za proizvodnju ATP-a iz ADP-a. Najveći dio energije ostaje u elektronima koji potiču iz C-C i C-H veza, a koji prelaze na prenosioce elektrona NAD⁺ i Fad. Elektroni su još uvijek na visokom energetsom nivou. Na konačnom stupnju oksidacije glukoze ovi elektroni prelaze korak po korak na nizak energetska nivo kiseonika. Energija koju oni otpuštaju tokom ovog prolaska stvara ATP iz ADP-a. Ovaj postepeni prolaz omogućava seriju prenosioca elektrona, od kojih svaki drži elektrone na nešto nižem elektronskom nivou. Ovi prenosioći sačinjavaju tzv. transportni lanac elektrona. Osnovne komponente ovog lanca su citohromi. Ove molekule se sastoje od porfirinskog prstena (slično hemu) koji zatvara atom gvožđa. Svaki atom gvožđa alternativno prihvata i otpušta elektron predajući ga sljedećem citohromu na nešto nižem energetsom nivou, sve dok elektroni potrošivši energiju ne pređu na krajnji akceptor-kiseonik. Energija oslobođena ovim silaskom elektrona koristi se za formiranje molekula ATP iz ADP-a. Ovakvo stvaranje ATP-a poznato je kao

oksidativna fosforilacija. Na kraju lanca elektrone prihvata kiseonik koji se zatim kombinuje sa protonima (vodonikovim jonima) iz rastvora stvarajući vodu. Svaki put kada dva elektrona pređu sa NADH na kiseonik formiraju se tri molekule ATP-a iz ADP-a i fosfata. Kada par elektrona prelazi sa FADH₂ koji elektrone drži na nešto nižem energetsom nivou nego NADH, formiraju se dvije molekule ATP-a.

Mehanizam oksidativne fosforilacije

Proces anaerobnog disanje (anaerobna respiracija, ili ponekad se naziva glikoliza) se odvija u citoplazmi, van mitohondrija, pri čemu nastaju molekule ATP. U citoplazmi van mitohondrija se, također, odvija i proces razgradnje glukoze, a sastoji se u cijepanju glukoze u dvije manje molekule pirogroždane kiseline i oslobođenju dvaju molekula vodonika. U tom procesu su dobitak dvije molekule ATP. Pirogroždana kiselina se može dalje razgraditi i proizvesti CO₂ i alkohol ili dvije molekule mliječne kiseline, što ovisi o tome o kojoj vrsti ćelije se radi. Put razgradnje glukoze nije dovoljan za količinu proizvedene energije.

Međutim, ćelija ima niz biohemijskih mehanizama koji upotrebljavaju dvije molekule pirogroždane kiseline i vodikove atome koji se oslobađaju pri razgradnji glukoze. Tim procesima nastaje mnogo više molekula ATP nego što ih je nastalo anaerobnim disanjem. Proces aerobne respiracije (disanje), kako se naziva skup ovih reakcija, događa se u mitohondrijama. Proces aerobne respiracije odvija se kroz dvije skupine reakcija. Prvu grupu reakcija čine procesi u kojima učestvuju atomi vodonika koji su se oslobodili u anaerobnim procesima (u citoplazmi) i one grupe vodonika koje se oslobađaju u drugoj grupi reakcija koje se dešavaju u mitohondrijama. Atome vodonika koji se oslobađaju prihvataju posebne molekule, primaoci atoma vodonika, zvane NAD (nikotinamide-adenin dinukleotid). Primajući vodikove atome, NAD se redukuje u NADH₂. Potom se molekule NADH₂ primaknu skupini molekula prenosilaca, nakon čega se formira dišni lanac (lanac za prenos elektrona), predaje im elektrone koji prelaze od jednog do drugog prenosioca tog lanca pri čemu se postepeno otpušta energija koja se ugrađuje u ATP. Atomi vodonika koji su izgubili energiju za vrijeme putovanja niz dišni lanac spajaju se s kisikom, pa nastaje voda. Na kraju procesa nastaju tri molekule ATP i jedna molekula vode.

U drugom dijelu procesa odvijaju se reakcije oslobađanja energije u obliku vodika iz molekula pirogroždane kiseline. Tom prilikom pirogroždana kiselina ulazi u mitohondrije i reaguje sa enzimom zvanim koenzim A (CoA), pa nastanu dvije molekule acetil-CoA i CO₂. Tom prilikom se oslobađa četiri atoma vodika. Vezuju se za NAD, nastaju dvije molekule NADH₂ koje se vezuju za dišni lanac, nakon čega nastaju dvije molekule ATP. Pirogroždana kiselina nakon što je ušla u mitohondrije uključuje se u Krebsov ciklus, za vrijeme kojeg se oslobađa više atoma vodika, nastaje više NADH₂ i više ATP.

Na kraju, ukupan energetski bilans obuhvata slijedeće vrijednosti: tokom glikoze nastaju 2 molekula ATP-a direktno i 6 molekula ATP-a preko dvije molekule NADH. Međutim, ukupni dobitak je samo 6 ATP-a, jer se 2 molekule troše za transport 2 molekule NADH kroz membranu mitohondrija. Pretvaranje pirogroždane kiseline u acetyl-Coa (u mitohondriji) daje dvije molekule NADH za svaku molekulu glukoze, a to znači i 6 molekula ATP-a (Lodisch, H.2001).

U Krebsovom ciklusu po molekuli glukoze nastaju 2 molekula ATP-a, 6 NADH i 2 FADH₂, ili ukupno 24 molekula ATP-a. Znači, jedna molekula glukoze daje ukupno 36 molekula ATP-a. U toku cijelog procesa oslobađa se 686 kilokalorija po molekuli glukoze, a oko 252 (7x36) kilokalorija (1054 kilodžula) (oko 40%) po molekuli biva zadržano u visokoenergetskim vezama molekula ATP.

RAZDVAJANJE I TRANSPORT PROTEINA:

ENDOPLAZMATSKI RETIKULUM, GOLDŽIJEV KOMPLEKS I LISOSOMI

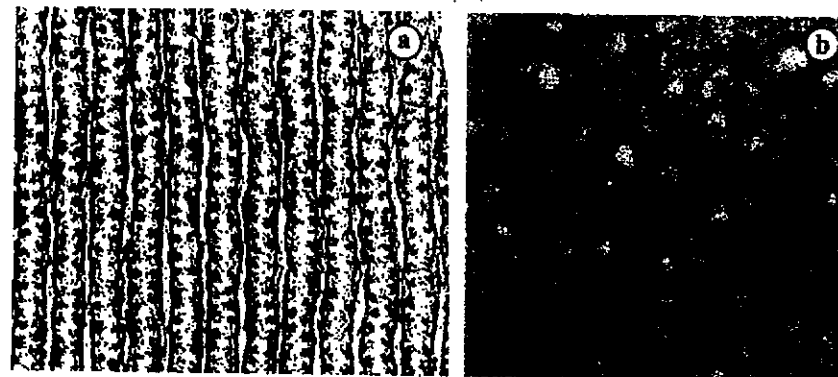
ENDOPLAZMATSKI RETIKULUM

Endoplazmatski retikulum predstavlja sistem membrana koji mrežasto prožima citoplazmu. Mreža je građena od kanala u obliku cisterni ili razgranatih cjevčica i mjehurića. Kanalići su više-manje međusobno povezani i anastomoziraju. Ovaj kompleksan membranski sistem je lipoproteinske građe. Broj, dužina i priroda ovih membrana se mijenja u raznim stanjima aktivnosti, a time se mijenja i dijamentar prostora vezikula i cisterni koje ograničavaju kanaliće ER. Endoplazmatski retikulum je redovno prisutan u ćelijama biljaka i životinja. Nema ga samo u eritrocitima sisara, a potpuno je odsutan u ćelijama prokariota. Kanalići ER su povezani sa spoljašnjom plazminom membranom. Po izgledu spoljašnje strane membrane ER razlikuju se dvije vrste; granulirani i agranulirani ER.

Granulirani ER je sistem membrana (sl. 2.21a) koje po površini imaju granule ribosoma. Zbog prisustva ribosoma na svojoj površini učestvuju u procesu sinteze proteina. GER je razvijen u svim ćelijama sposobnim za biosintezu ekskretivnih proteina, kao što su ćelije štitne žlijezde, ili u antitijelima u plazmocitima itd. GER je razvijen u eritroblastu tokom biosinteze hemoglobina, ali nestaje i ne uočava se u zrelom eritrocitu. U šupljinama kanalića ovog membranskog sistema nalaze se hidrolitički enzimi, različiti minerali i organske materije, proteini koji se sintetisaju u polisomima na membranama kanalića. Ispitivanja GER pomoću elektronske mikroskopije, autoradiografijom i biohemijskim analizama doprinijela su poznavanje mjesta i toka biosinteze polipeptidnih lanaca, dužine trajanja transporta do Goldžijeve zone i dalja sudbina proteina. GER je posebno zastupljen u žljezdanim ćelijama, kanalići se javljaju u velikom broju, postavljeni paralelno ili koncentrično, često se granaju i međusobno komuniciraju.

Agranulirani ER i lipidni sistem je uglavnom zastupljen u ćelijama endokrinih žlijezda čija je primarna funkcija produkcija steroidnih hormona, zatim u ćelijama jetre koje imaju ulogu u metabolizmu ugljenih hidrata, u pigmentnim ćelijama retine, limfocitima, u ćelijama koje imaju funkciju provođenja impulsa u organizmu. Nalazi se u svim ćelijama u kojima je strukturiran GER, znači, u svim ćelijama izuzev crvenih krvnih zrnaca.

Agranulirani ER (sl. 2.21b) ima specifične osobine u spolnim, embrionalnim i neoplastičnim-tumorskim ćelijama. Smatra se da ER nastaje kao rezultat invaginacije plazmine membrane i evaginacije spoljašnje membrane jedrovo omotača. Ostale membrane ovog retikuluma nastaju "degranulacijom", odnosno oslobađanjem poliribosoma (polisoma) sa površine GER. Membrane ovog retikuluma učestvuju u obrazovanju membrana i vezikula u Goldžijevoj zoni.



Slika 2.21 (a) Granulirani ER (b) Glatki (agranulirani) ER. Mikrografija prikazuje sistem membrana ER po čijoj se površini nalaze brojni ribosomi u kojima se vrši sinteza proteina. Glatki agranulirani ER nema ribosoma po površini membrana. Ove membrane participiraju u sintezi steroidnih hormona testosteron.

Sklapanje, obrada i sekrecija proteina u ER

Primarna uloga lumena ER je sklapanje i obrada novopristiglih proteina. Proteini pristižu kroz membranu ER u lumen kanalića kao slobodni polipeptidni lanci kod kojih je translacija još u toku. Ovi polipeptidi, prije svega, imaju trodimenzionalnu konfiguraciju. Formiranje disulfidnih veza (S-S) između bočnih lanaca je vrlo važan aspekt za sklapanje proteina u ER. Disulfidne veze formirane u ER imaju vrlo važnu ulogu u procesu sekrecije ćelijskih površinskih proteina. Disulfidnu formaciju održava proteindisulfidomeraza čija je lokacija u ER. Neki proteini su učvršćeni u plazma membrani sa glikolipidima, dok su drugi sparni sa membranskim polipeptidnim lancima. Membrane pričvršćuju glikolipide pomoću glikozilfosfatidilinositola (GPI) učvršćivača.

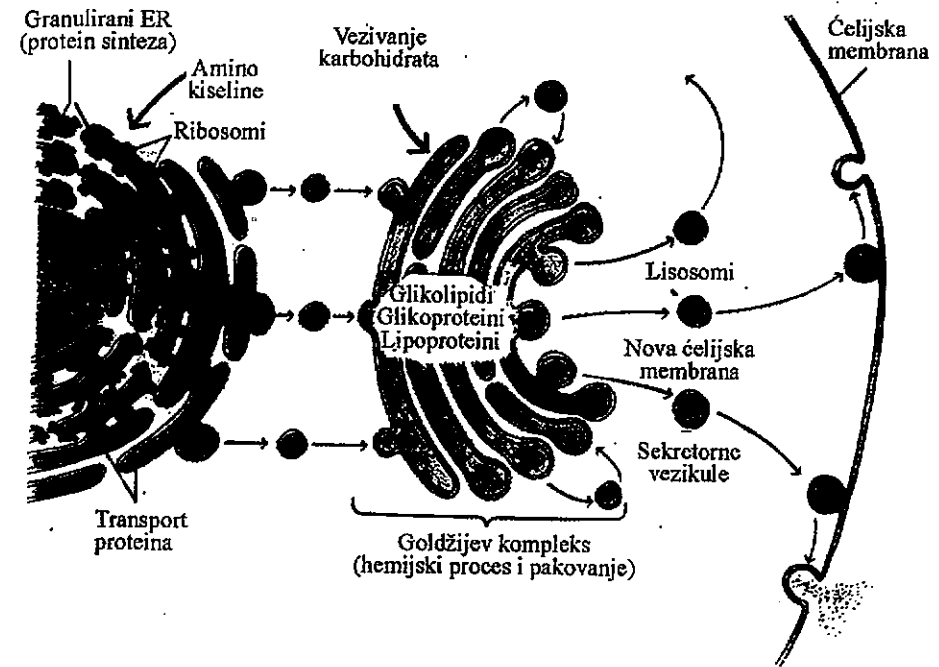
GPI učvršćivači se sklapaju u membrani ER. Transmembranski region proteina je izmijenjen za GDI učvršćivače, tako da ovi proteini ne dodiruju membranu, samo asociraju sa glikolipidima. Izlazeći na površinu ćelije posredstvom GPI-a, proteini se pričvršćuju za plazma membranu. Proteini određeni za sekreciju ili boravak unutar lumena ER, Goldžijevog kompleksa ili lisosoma translociraju se kroz membranu ER ili se otpuštaju u lumen ER. Različiti proteini se na različite načine transportuju duž transportnog puta.

Kako je ER prisutan u skoro svim živim ćelijama, to je njegova uloga veoma i značajna i mnogostruka. Smatra se da ER ima važnu ulogu u transportu elektrona i uopšte ima ulogu unutar ćelijskog transportnog sistema koji povezuje citoplazmu i jedro, a sa druge strane citoplazmu i jedro sa ekstracelularnim prostorom. Dalje, trodimenzionalna mrežasta struktura ER služi kao separator niza raznovrsnih često antagonističkih biohemijskih reakcija u toku procesa ćelijskog metabolizma. U šupljinama kanalića retikuluma nalaze se različite supstance, bilo da su porijeklom iz spoljašnje sredine iz hijaloplazme ili su produkt biosinteze u samim organelima. Mnoge supstance, kao kapljice lipida iz spoljašnje sredine, dopijevaju u kanaliće retikuluma procesom pinocitoze. U kanalićima se nalazi najveća količina proteina koji se sintetisaju u polisomima na površini membrane GER. Proteini sintetisani u poliribosomima GER se prvobitno transportuju u vezikule Goldžijevog kompleksa gdje se obrađuju i razdvajaju, a potom transportuju dalje u lisosome, vezikule i na kraju sekrecijom se ispuštaju kroz plazma membranu.

Ulogu ER u transportnom sistemu ćelije dobro ilustruje dijagram na slici 2.22. Dijagram ilustrira interakciju endoplazmatskog retikuluma sa ribosomima, Goldžijevim kompleksom, lisosomima i vezikulama. Ovi organeli funkcionišu zajedno u sintezi, hemijskim procesima, preradi i distribuciji makromolekula novog membranskog materijala. Proteini se pokreću specifičnom tranzitnom regijom od endoplazmatskog retikuluma i prebacuju u vezikule koje se fuzionišu sa kesicama Goldžijevog kompleksa. Vezikule formirane od membrana Goldžijevog kompleksa se sa obradenim proteinima ugrađuju u lipide novosintetisanih membrana. U Goldžijev kompleks pristižu i karbohidrati, te sa proteinima i lipidima produkuju glikoproteine i glikolipide. U nekim ćelijama se produkuju lipoproteini u Goldžijevom kompleksu. Ove makromolekule su zajedničke (opšte) komponente membrana. Molekule određene za eksport iz ćelije, također, prolaze kroz hemijske procese u Goldžijevom kompleksu. Vezikule prihvataju na kraju molekule i makromolekule, otpuštaju ih od Goldžijevog kompleksa i nose u druge lokacije unutar ćelije ili na spoljašnju površinu.

Dakle, osnovna uloga endoplazmatskog retikuluma je obrada proteina sintetisanih na njegovoj površini u polisomima, njihovo izdvajanje i sekrecija. Definitivni put sekrecije je; GER - Goldžijev kompleks - sekretorne vezikule -

van ćelije (sl. 2.22). i mnogi drugi proteini produ kroz prvi inicijalni korak sekretornog puta ali se potom zadrže i funkcionišu van jednog ili drugog organela ER ili Goldžijevog kompleksa. Proteini određeni za sekreciju ili ugrađivanje u ER, Goldžijev kompleks i lisosome ili plazma membranu se uglavnom sintetisaju u polisomima na površini membrana GER a transformišu se u lumen GER. Suprotno, proteini sadržani u citosolu ili ugrađeni u nukleus, mitohondrije, hloroplaste se sintetisaju u slobodnim polisomima u citoplazmi.



Slika 2.22 Sekretorni put proteina iz ER: GER-Goldžijev kompleks-sekretorne vezikule i van ćelije(Abejion C.1992.)

GOLDŽIJEV KOMPLEKS

Goldžijev kompleks je redovan sastojak ćelije. Ovaj kompleks predstavlja predio citoplazme u kojem se nalazi sistem citoplazminih membrana za koje nisu vezani poliribosomi. Obično je u životinjskim ćelijama koncentrisan oko jedra. Dobro je izražen u sekretornim ćelijama koje učestvuju u sekreciji. Naročito je nakupljen na mjestima najveće sekretorne aktivnosti npr. u bubrežnim ćelijama. Nije razvijen u ćelijama prokariota.

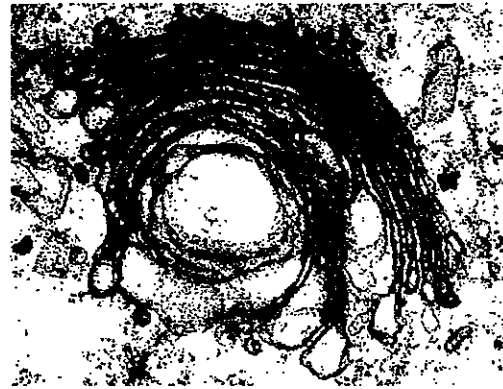
U biljnim ćelijama je opisan kao diktiosom. Ako se pod diktiosomom podrazumijeva 4-6 sekulusa, Goldžijev kompleks se sastoji od grupe diktiosoma, vezikula i cisterni.

Organizacija Goldžijevog kompleksa

Osnovnu komponentu čini grupa 4-5 većih spljoštenih vezikula u obliku tanjirastih tvorevina međusobno priljubljenih. Vezikule su potpuno zatvorene, obavijene dvostrukom lipoproteinskom membranom.

Druga komponenta Goldžijeve zone sastavljena je od znatno sitnijih kesica, mikrovezikula smještenih po obodu ovog organela (sl. 2.23). Ovaj sistem membrana vodi porijeklo od agranuliranog endoplazmatskog retikuluma.

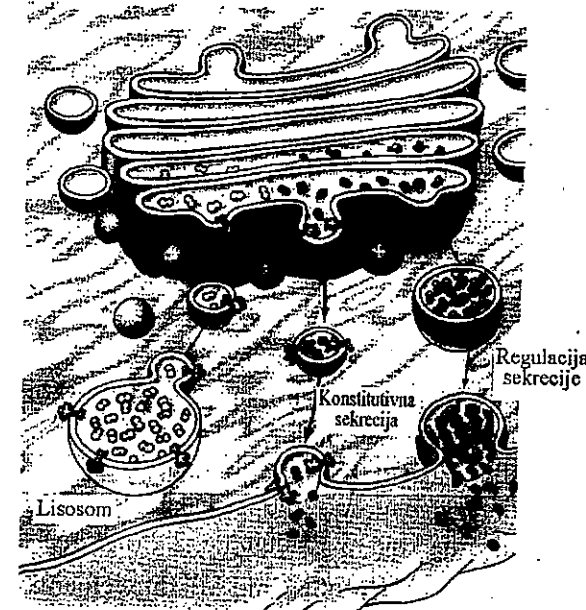
Razvijenost, međusobni odnos membrana, stvaranje novih vezikula ili njihovo spajanje u krupnije zavisi od inteziteta i prirode metaboličkih procesa, vezanih za akumulaciju i sekreciju proizvoda aktivnosti. Za strukturiranje Goldžijeve zone neophodna je energija, a važan izvor je oksidativna fosforilizacija koja se odvija u mitohondrijama. Broj vezikula jako varira, pa se mogu sastojati od samo nekoliko sitnih vezikula. Sadržaj u vezikulama je, također, različite gustine, i mogu se naći sve faze akumulacije sekreta u granulama, vezikulama i prolisomima. Struktura Goldžijevog kompleksa je prikazani na slici (2.23).



Slika 2.23 Goldžijev kompleks. Elektronska mikrofografija Goldžijevog kompleksa građenog od makrovezikula koje završavaju mikrovezikulama. (Prema Keeton, W.T.1986.)

Goldžijev kompleks je i mjesto sinteze glikolipida, sfingomijelina i kompleksa polisaharida ćelijskog zida biljaka. Izdvajanje proteina preko G.kompleksa za transport u vezikule je priprema za sekreciju preko plazma membrane, lisosoma ili vakuola u biljaka ili ćelijama kvasca. Proteini se specifično i ciljano polarizuju bazolateralno i apikalno od plazma membrane. Isto tako, proteini se dobro, kao i lipidi i polisaharidi, transportuju kroz G.kompleks u krajnje destinacije putem sekrecije. Transportuju se različite vrste proteina preko vezikula, što počinje od mreže Goldžijevog kompleksa, ispuštanjem i oslobađanjem sadržaja u ćelijski prostor (sl. 2.24). Neki proteini se prenose od G.kompleksa do ćelijske membrane sekretornim putem, čiji se sadržaj proteina i lipida ugrađuje u nove plazma membrane. Drugi proteini se transportuju sa površine ćelije posebnim putem regulacijske sekrecije ili specifičnim putem drugih intracelularnih destinacija, kao lisosoma u animalnim ćelijama ili u vakuole kod kvasca. Ovaj

organel ima osnovnu funkciju u akumulaciji i transportu lipoproteinskih kompleksa i proizvoda biosinteze specifičnih proteina (hormona, enzima itd.). Također, ima ulogu u koncentraciji, transformaciji i transportu proteinskih sekreta u mnogim žljezdanim ćelijama (lojne, mliječne žlijezde, neurosekretorne ćelije, ćelije pankrasa, prednjeg režnja hipofize i tireoideje). U vezikulama diktiosoma se nalaze metabolički sekreti različitog porijekla. Ovi sekreti (hormoni, pigmenti i dr.) se kondezuju i odvajaju od diktiozoma u obliku napunjenih vakuola i migriranjem na periferiju ćelije transportuju sekrete i omogućavaju njihovo izlučivanje putem pinocitoze. Također, vrši se koncentracija lipida koji se izlučuju iz ćelije. Prisustvo kisele fosfataze u organelu govori o njihovoj mogućnosti uključivanja u produkciju primarnih lizosoma ili se preko ovog vrši samo transport ovih enzima do lizosoma. Na osnovu niza eksperimenata došlo se do saznanja da se enzimi pankrasa, hormoni nekih endokrinih žlijezda i razne makromolekule sintetišu na poliribosomima koji su vezani za GER i potom se transportuju kroz šupljinu ovog retikuluma do Goldžijeve zone, akumuliraju u vidu specifičnih granula, a odatle transportuju prema plazminoj membrani i izlučuju izvan ćelije egzocitozom (Keeton, W.T.1986) Na kraju, cisterne Goldžijevog kompleksa skupljaju karbohidrate sa proteinima (formiraju glikoproteine), a sa lipidima formiraju glikolipide.



Slika 2.24 Transport od Goldžijevog kompleksa. Proteini se sortiraju u Goldžijevoj mreži i transportuju u vezikule do finalne destinacije. U odsustvu specifičnih ciljanih signala proteini se prenose do plazma membrane konstitutivnim sekretom. Alternativno, proteini mogu biti odvojeni od konstitutivnog sekretornog puta i krenuti u druge destinacije, kao lisosome ili u regulaciju ćelijske sekrecije. (Prema Dr.L.Andrew.1998.)

Na kraju, formiranje vezikula Goldžijevog kompleksa moguće je pratiti u toku preobrazaja spermata u spermatozoideid (spermiogeneza). U toku spermiogeneze dilatacijom šupljina obrazuju se krupne vezikule. U jednoj ili više vezikula dolazi do koncentracije enzima (hialuronidaze). Ova vezikula se postavlja ispred jedra spermatozoidea, povezuje se sa jedrovom membranom, stvara se akrosom. Citohemijske reakcije pokazuju da se akrosom sastoji uglavnom od mukopolisaharida, što potvrđuje mišljenje da Goldžijev kompleks učestvuje u funkciji sekrecije polisaharida. Citohemijskom analizom utvrđeno je da se u ovim organelama, pored polisaharida, nalaze i mukopolisaharidi, hidrolitički enzimi, fosfataze, peroksidaze, razne hidrolaze i glikoproteini.

Mehanizam vezikularnog transporta PROČITO

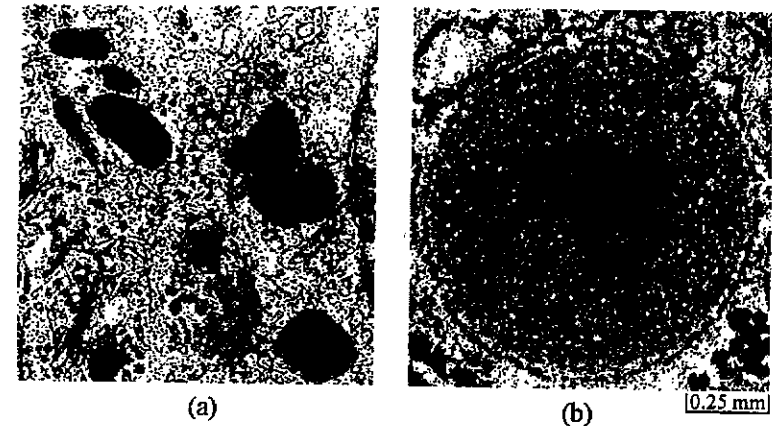
Vezikularni transport ima centralnu ulogu u procesu sekrecije i transporta molekula na putu između sadržaja zatvorenih membranama. Vezikule su uključene i u površinski transport materija. Vezikularni transport je odgovoran uglavnom za transport molekula između organela. Takav transport je selektivan i predstavlja ključ za organizaciju i funkciju ćelije. Naprimjer, specifični lisosomalni enzimi se transportuju od Goldžijevog kompleksa do lisosoma, ali ne i do plazma membrane i ER. Postoje signali koji transportuju ciljano specifične proteine za određene organele, transport se bazira na fuziji membrana i formiranju vezikula. Vezikularni transport ima važnu ulogu u organizaciji eukariotskih ćelija, u objašnjenju formiranja vezikula, objašnjenju molekularnog mehanizma kontrole vezikularnog punjenja kao i u fuziji vezikula, čemu je posvećen veći prostor u izučavanju biologije ćelije.

LISOSOMI

Lisosomi su organele obavijene jednostrukom lipoproteinskom membranom. Sadrže sve vrste polimeraza, kisele hidrolaze, karbohidrate lipide i proteine. Funkcionišu kao digestivni sistem ćelije, razgrađujući materije unijete u ćeliju i komponente same ćelije. Izgledaju kao sferične vakuole, ali mogu se razlikovati po veličini i po vrsti materija koje razgrađuju (sl. 2.25).

Lisosomi se nalaze u svim životinjskim i biljnim ćelijama. Lako se mogu identifikovati citohemijskim metodama koristeći se svjetlosnom ili elektronskom mikroskopijom. Ove organele karakteriše niz osobina kao: osmofilija, afinitet prema jonima teških metala (srebro, gvožđe itd.). U njima se nakupljaju produkti biosinteze i materije unijete iz međucelijskih prostora, odnosno okolne sredine. Membrana lisosoma je trilamelarna lipoproteinske

prirode i ona odvaja sadržaj lisosoma iz okolne citoplazme. Selektivna je propustljiva ili nepropustljiva za niz supstanci. Nakon razaranja membrane lisosoma djelovanjem fizičkih ili hemijskih faktora, hidrolitički enzimi se oslobadaju i postaju digestivno aktivni. U vezi s tim poznato je da ima supstanci koje su sposobne da membranu lisosoma "labilizuju" i učine je propustljivom za vitamine A, E, C, D, progesteron, testosteron i druge hormone, kao i takvih koje membranu "stabiliziraju" salicilati, kortizon, hidrokinin i dr. Membrana lisosoma ima svojstvo spajanja sa vezikulama koje se obrazuju, ali se ne spajaju sa membranama, npr. jedra ili mitohondrija ili drugih ćelijskih organela.



Slika 2.25 Lisosomi i peroksisomi vezikule unutar kojih se razgrađuju različite vrste molekula. (a) U ovom dijelu ćelije bubrežne žlijezde tamna ovalna tjelesa su lisosomi. Oni mogu sadržavati više od 50 različitih hidrolitičkih enzima. (b) Peroksisom. Kristalići materije u centru su peroksid-producioni enzimi obuhvaćeni u razgradnji purina. Drugi enzimi razgrađuju peroxide, sprečavajući njihov prolazak u citoplazmu. (Prema Kornfeld, S. and I. Mellman. 1999.)

Lisosomi i kisele hidrolaze

Lisosomi su bogati kiselom fosfatazom. Njihovi kiseli enzimi izazivaju lizu molekula proteina, ugljenih hidrata, nukleinskih kiselina, polisaharida i lipida. Otuda i ime lisosomes (smrtonosna tjelesa). Poznato je oko 50 različitih enzima iz grupe hidrolaza. Aktivnost ovih enzima je u vezi sa razgradnjom materija, ali sve dok je jednoslojna lipoproteinska membrana lisosoma neoštećena, enzimi su neaktivni u autolizi ćelije. Kad membrana lisosoma bude razorena djelovanjem fizičkih ili hemijskih faktora, enzimi se oslobadaju i postaju digestivno aktivni. Od enzima najviše su zastupljeni: kisele fosfataze, katepsin, kolagenaze, fosfoproteinske fosfataze, kisele ribonukleaze, kisele deoksiribonukleaze, esteraze itd.

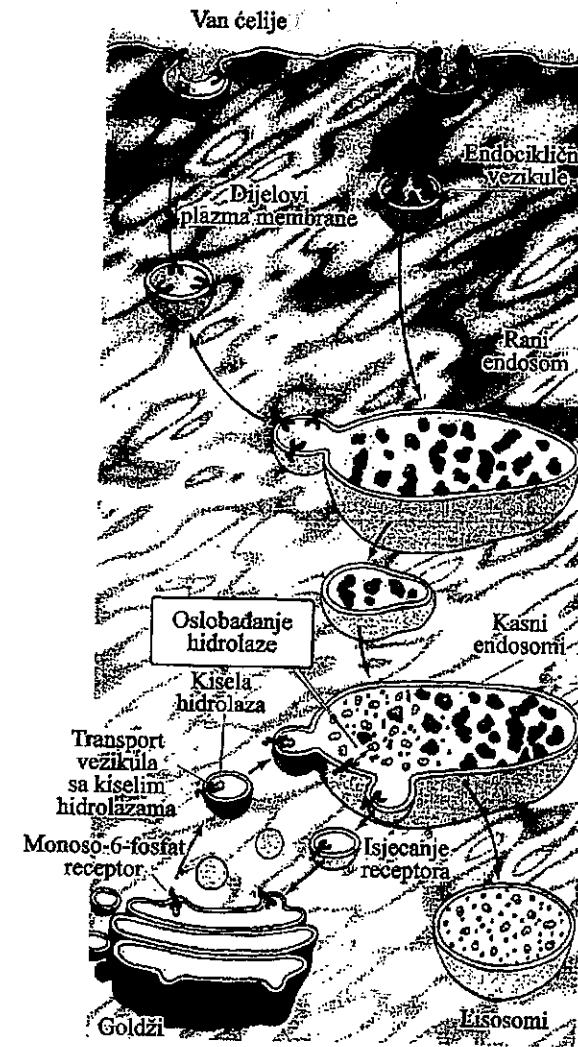
Svi lisosomalni enzimi su kisele hidrolaze aktivni pri pH (oko 5) i održavaju se unutar lisosoma ali ne i pri neutralnoj pH (oko 7.3), što je karakteristika ostatka citoplazme. **Potreba lisosomalnih hidrolaza za kiselim pH sredinom se obezbjeđuje zaštitom i kontrolom digestije sadržaja citosola čak i ako je lisosomalna membrana oštećena, otpuštene kisele hidrolaze su inaktivne u neutralnoj pH citosola.** Lisosomi mogu održavati kiselu pH sredinu u unutrašnjosti aktiviranjem koncentracije H⁺ jona (protona). Ovo se postiže protonskom pumpom u lisosomalnoj membrani čiji je aktivni transport u lisosome iz citosola.

Endocitoza (formiranje lisosoma)

Jedna od najznačajnijih funkcija lisosoma je razgradnja materija unijetih iz spoljašnje sredine procesom endocitoze. Međutim, uloga lisosoma u digestiji materija unijetih iz vanjske sredine je usko vezana i sa formiranjem lisosoma. Djelimično se lisosomi formiraju fuzijom transportnih vezikula, a djelimično pupanjem membrana Goldžijeve mreže ili ER i fuzijom sa endosomima koji sadrže male molekule unijete preko plazma membrane endocitozom.

Zapravo, kasni endosomi prelaze u zrele lisosome kao slobodne komplemente kiselih hidrolaza u kojima se odvija digestija molekula. U odnosu na genezu razlikuje se više vrsta lisosoma: primarni, sekundarni, fagosomi i rezidualna gusta tjelašca. **Primarni lisosomi** sadrže hidrolitičke enzime koji ne učestvuju u digestiji. Nastaju izvraćanjem i izdvajanjem od granularnog endoplazmatskog retikuluma ili se odvajaju od Goldžijevog kompleksa. **Sekundarni lisosomi** su organele koje nastaju spajanjem ranih i kasnih endosoma sa primarnim lisosomom. **Fagosomi** su lisosomi u kojima se odvija hidroliza sadržaja. U odnosu na porijeklo dijele se u: autofagosome- lisosome u kojima se razlaže materijal endogene prirode i heterofagosome- lisosome u kojima se razlaže materijal unijet u citoplazmu iz okolne sredine endocitozom ili fagocitozom. Ali, pošto materijal unijet endocitozom iz okolne sredine ne sadrži hidrolaze već razne vrste proteina, lipida itd., heterofagosomi nastaju tek nakon spajanja endocitnih vezikula, odnosno fagosoma sa primarnim lisosomom. **Rezidualna gusta tjelašca** su materije koje nisu razložene predhodnim procesima hidrolize, sadrže kisele fosfataze i kiselu DNK-kazu i druge enzime. Osmofilna su, slabo su hidratizirana, a makromolekuli lipoproteinskog kompleksa su tijesno zbijeni. Ova tjelašca imaju karakter lisosoma, ali sadržaj ima izgled amorfne mase.

Lisosomi se formiraju u toku procesa sekrecije i endocitoze (sl.2.26) Materije unijete endocitozom unose se preko vezikula koje se formiraju od plazma membrane, a potom se fuzionišu sa ranim endosomima. Membranske komponente se odvoje od plazma membrane i sa ranim endosomima grade kasne endosome koji predstavljaju prekursore lisosoma u kojima se nalazi sadržaj.



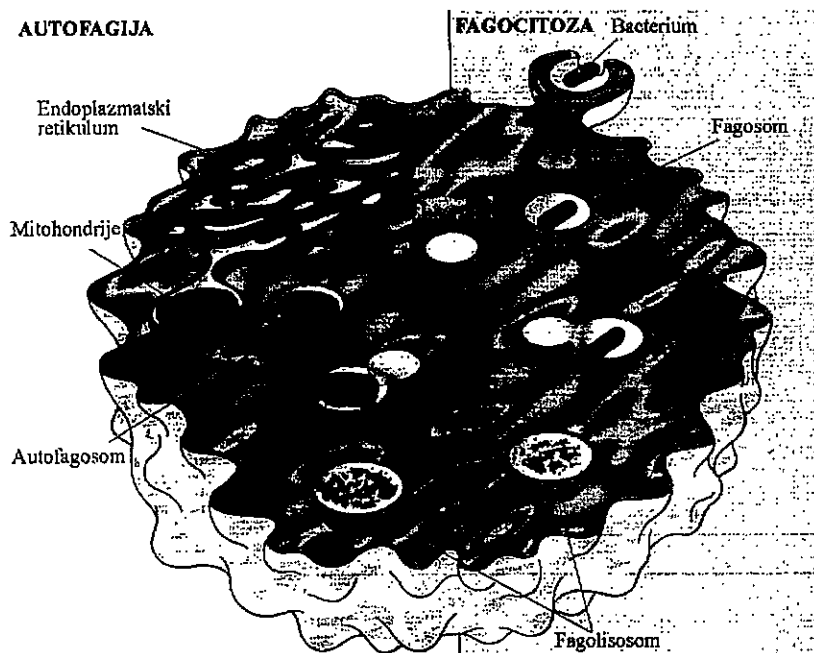
Slika 2.26 Endocitoza i formiranje lisosoma Molekule se unose endocitozom. Unose se preko vezikula formiranih od plazma membrane. Vezikule se fuzionišu sa ranim endosomima, potom se membranski dijelovi odvoje, a rani endosomi se prevode u kasne endosome koji predstavljaju prekursore lisosoma. (Prema Gruenberg, J. 1989.)

Fagocitoza i autofagija

Digestija ili razgradnja molekula u lisosomu endocitozom ima dva puta: fagocitoza i autofagija. U procesu fagocitoze specijalizirane ćelije kao makrofage obuhvataju razgradene partikule ili, naprimjer, bakterije, koje trebaju biti eliminisane iz ćelije. Bakterije formiraju fagocitne vakuole-fagosome koji se potom fuzionišu sa lisosomima. Rezultat je digestija sadržaja. Osnovna funkcija zasniva se na tome da fagosomi apsorbuju sitne molekule stranih tijela, pa i samih ćelija i vare ih učešćem hidrolaza. Proizvodi digestije difunduju kroz lisosomalnu membranu u citoplazmu i zatim stupaju u metaboličke procese.

Neke materije ulaze u ćeliju putem fagocitoze i pinocitoze. Na mjestu kontakta strane makromolekule sa plazminom membranom formira se invaginacijom vezikula koja obavlja makromolekulu, nakon čega se formira fagosom. U datom trenutku fagosom dolazi u kontakt sa membranom primarnog lisosoma, njihove se membrane spoje i formira se sekundarni lisosom. U fuzionisanom fagosomu aktiviraju se hidrolitički enzimi i počinje varenje, a razloženi proizvodi stupaju u metaboličke procese. S obzirom na litičku sposobnost da razlažu dijelove ćelija, lisosomi imaju ogromnu ulogu u fertilizaciji, diferencijaciji, metamorfozi, regeneraciji, imunološkim i zaštitnim procesima (njihova velika koncentracija u leukocitima) i drugim procesima. Aktivnost lisosoma se povećava djelovanjem raznih agensa kao što su hormoni, estrogen, aktinomycin D, metabolički inhibitori, X i UV zraci, kancerogeni. Ovi organeli imaju sposobnost da nagomilavaju neke lijekove, kao što su kinini, hlorkinini i drugi.

Lisosomi su, također, odgovorni za autofagiju. Prvi korak u procesu autofagije je obuhvatanje organela (naprimjer mitohondrija) u membranu nastalu od ER. Rezultat je formiranje vezikule (autofagosom) koja se fuzioniše sa lisosomom nakon čega se sadržaj razgradi (vidi sliku 2.27).



Slika 2.27 Lisosomi, fagocitoza i autofagija U fagocitozi velike partikule (kao bakterije) unose se fagocitnim vakuolama ili fagosomima. U autofagiji unutrašnje organele (kao mitohondriji) obuhvataju se fragmentima membrana ER, formirajući autofagosome. Oba fagosoma i autofagosomi se fuzionišu sa lisosomima formirajući veliki fagolisosom u kojem se vrši digestija sadržaja. (Prema Dunn, W.A. 1994.)

LISOSOMI I BOLESTI

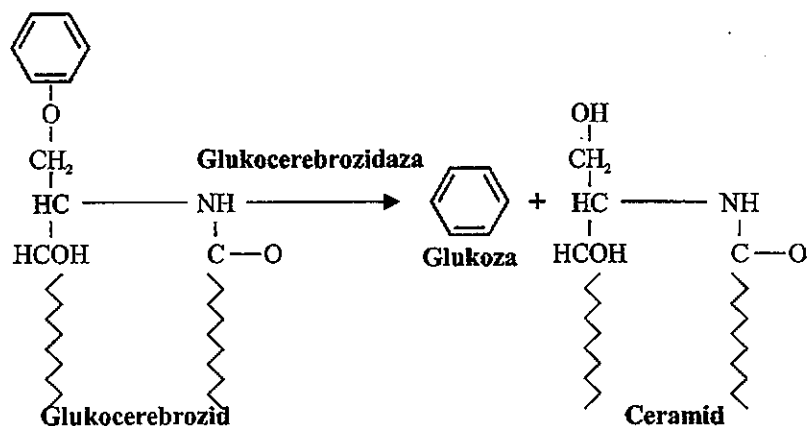
Različita patološka stanja su praćena povećanjem "lisosomskog" rada ili čak uočljivim promjenama u samoj biologiji lisosoma. Različiti nepovoljni uslovi, kao izraženi nedostatak kiseonika, ozračavanje X-zracima, primjena antibiotika koji smanjuju sintezu proteina, kao i pojačana koncentracija nekih hormona izazivaju uočljive promjene u lisosomskoj aktivnosti. Mutacije gena koji kodiraju sintezu hidrolitičkih enzima lisosoma uzrokuju više od 30 različitih humanih genetskih bolesti. Najviše ovih bolesti rezultira deficijencijom lisosomalnih enzima, i sam proces starenja je u nekim ćelijama jako izražen i uočljiv po prisustvu lisosoma. Tako se u nervnim ćelijama u rezidualnim tijelima nagomilava pigment lipofuksin. Smatra se da do nagomilavanja ove supstance u ćelijama koje stare dolazi usljed toga što je smanjena količina hidrolitičkih enzima. U nekim slučajevima ćelija nema sposobnost da razloži ni bakteriju koju je unijela procesom fagocitoze. Tako je otkriveno da se fagozom u kojem se nalazi bakterija koja izaziva tuberkulozno oboljenje spaja sa sekundarnim lisosomom, ali se u njemu ne nalaze enzime koji mogu da razore bakterijski zid. To znači da će jedna tuberkulozna bakterija nekoliko puta biti zahvatana procesom bolesti i da će se ponovo naći u okoloćelijskom prostoru neoštećena i spremna da izazove infektivne procese u organizmu. U formi prašine dospjevaju u pluća radnika koji se bave proizvodnjom pomenutih materijala. Naprijed pomenute materije bivaju zahvaćene fagocitozom, zapažaju se u sekundarnim lisosomima, ali u njima ne postoje enzimi koji mogu da ih razlože. Poslije izvjesnog vremena ćelije umiru, njihov razložen produkt biva zahvaćen od drugih makrofaga, ali se identična sudbina unijetih materijala ponavlja. Ovo neodstranjivanje kako azbestnih tako i silikonskih partikula izaziva pojačanu aktivnost ćelija. Interesantan je slučaj i sa silikonskim partikulama i azbestnim nitima koje povećavaju aktivnost vezivnog tkiva - fibroblasta koji počinju da sintetišu kolagena vlakna u većoj količini nego što je to predviđeno za dati organ. Ukoliko se pomenuti proces odvija u plućima, pojačana sinteza kolagena izaziva neelastičnost pluća i smanjivanje funkcije čitavog organa. Neke prirodne materije organizma u nekim slučajevima ne mogu da budu razložene u lisosomima, te se bolesti koje su rezultat ovog procesa nazivaju "bolesti uskladištenja". Ukoliko se masne materije nagomilavaju u lisosomima, onda se takva bolest naziva Tay-Sachsova bolest i, po svemu sudeći, prenosi se određenim hromosomima. Bolest se javlja kod šestomjesečnih beba, a već oko druge, odnosno četvrte godine života dovodi i do smrti djeteta.

U lisosomima pomenute djece zapaža se velika količina nerazloženih glikolipida. Ono što se sintetiše ne razlaže se određenim ritmom, jer nedostaju odgovarajući lisosomski enzimi. Usljed nedostatka lisosomskih enzima koji razlažu mukopolisaharide, javlja se Hanterova bolest (Huanter) nasljedno uslovljena i niz drugih bolesti.

Molekularna medicina

Gaučeva (Gauchers) bolest i lisosomi

Gaučeva bolest je jedna od najčešćih lisosomalnih bolesti uskladištenja koja je uzrokovana nedostatkom lisosomalnih enzima za normalnu razgradnju. Gaučeva bolest je prvobitno otkrivena u jevrejskoj populaciji. Javlja se u tri oblika: tip I, II i III. Molekularna i ćelijska osnova ove bolesti je deficit enzima glukocerebrozida koji katalizuje hidrolizu glikocerebrozida u glukozu i ceramid. Gen za ovaj enzim je kloniran 1985. Potom je identifikovano oko 30 mutacija odgovornih za ovu bolest. Gaučeva bolest je primjer bolesti za čiju se prevenciju i terapiju upotrebljava enzimatski tretman.



Prema Beutler, E.A. Adv. Genet. 1996

ULTRASTRUKTURA I SASTAV ĆELIJSKE MEMBRANE

Ćelijska membrana je posebna diferencijacija spoljašnjeg dijela citoplazme. Debljina membrane varira od 50 do 300 Å i ona nije ravna, napeta opna, nego duž površine sadrži brojne nabore i ispupčenja, a povezana je membranama unutar citoplazme, s endoplazmatskim retikulom. Zapravo, membrana predstavlja dio tog membranskog sistema koji postoji unutar ćelije i koji osigurava vezu i izmjenu materija između sadržaja jezgre, citoplazme i vanjske okoline. Postoji u svim ćelijama jednoćelijskih i višćelijskih organizama. Lako mijenja oblik u raznim fiziološkim stanjima, a promjenom konfiguracije objezbjeđuje pokretanje ćelije i mijenja odnose ćelije i sredine.

Ćelijska membrana predstavlja složen fiziološki sistem, koji ima svoju karakterističnu gradnju i funkciju. Osmotski je aktivna, selektivna usporava brzinu kretanja molekula u ćeliji i van ćelije, određuje koje molekule mogu ući, a koje ne, koje materije treba zadržati u ćeliji, sadrži katalitički aktivna područja, posjeduje mehanizam kojim se upotrebljava energija za osmotski rad. Plazmina membrana, kao i sve biološke membrane, nastaje u toku interakcije molekula lipida i proteina.

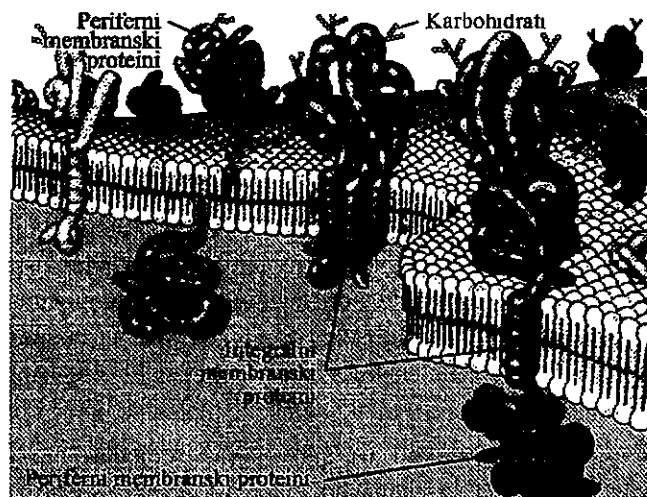
Membrana je sastavljena od tri sloja koji se međusobno razlikuju po elektronskoj gustini i privlačnosti prema bojama. Postoji velika sličnost u strukturi ne samo plazmine membrane raznih vrsta ćelija već i između plazmine, jedrove, ER, Goldžijevih membrana i raznih vezikula, zatim membrana mitohondrija i hloroplasta. Većina membrana ima troslojnu strukturu kao "jedinicu membrane" (unit membrana). Mnoge ćelije imaju ćelijsku stjenku. Ćelijska stjenka je višeslojna tvorba koja obavija ćelijsku membranu. Taj sloj ili stjenka može biti jednostavna ovojnica od mukopolisaharida. Stjenka bakterija i biljnih ćelija je čvrsta i elastična. Gradi je ćelija pomoću posebnih enzima. Kod viših biljaka sastojci stjenke su polisaharidi, a kod bakterija jednostavni šećeri.

Ćelija povećava svoju površinu formiranjem nabora ili izdanaka mikrovila na ćelijskoj membrani. Ćelijska membrana je usko povezana posebnim strukturama preko kojih se vezuje u viša ćelijska tkiva. Te strukture su dezmoze koje predstavljaju zadebljanja ćelijske membrane.

Na kraju, eukariotska ćelija je prožeta sistemom membrana koje povezuju jedro sa ER, Goldžijevim kompleksom, a preko ovih organela povezuje se sa okolinom ćelije. Membranski sistem je bogat lipidima i relativno labilne strukturne organizacije. Tako je ćelijski sistem sastavljen od dvije faze koje se međusobno ne miješaju: vodena faza čija se gustina mijenja od tečnog do čvrstog stanja-citoplazma, membranski sistem -relativno tečna lipoproteinska faza kojom je prožet citoplazmatski matriks (Anderson, R.G.W.1998.)

Struktura plazma membrane

Prema Danijel-Davsonovom modelu, ćelijska membrana je građena od tamnih graničnih slojeva od proteina i unutrašnjeg rjedeg sloja lipida. Iako je ovaj model osporen savremenim modelom "tekućeg mozaika proteina i lipida" od strane Singera i Nicolsona (1972.), i reviziju ovog modela 1995. (Jacobson, K.E.D.) suština oba modela je u osnovi ista. Naime, sve ćelijske membrane u osnovi imaju istu strukturu: dvosloj lipida, uklopljen među proteine (sl. 2.28).



Slika 2.28 Model tekućeg-mozaika plazma membrane. Integralni proteini prodiru kroz periferne proteinske slojeve i lipidne slojeve. S obzirom na to da se periferni proteini nalaze na površini membrane indirektno učestvuju u protein-protein interakciji. Od integralnih proteina najviše su zastupljeni trans-membranski proteini sa obje strane lipidnih slojeva. Od ekstracelularnih proteina najviše su zastupljeni enzimi glikolizacije na površi ćelijske membrane. (Prema Singer, S.J. and Nicolson, G.L. 1972.)

Srednji sloj čine lipidi međusobno povezani hidrofobnim vezama. Spoljni slojevi su molekule proteina za koje su lipidi povezani hidrofilnim vezama. Proteini koji prekrivaju lipidni sloj razlikuju se od proteina prema citoplazmi. Većina proteina membrane su enzimi. Neki proteini su specifični za membranu jedne vrste ćelije. U plazminoj membrani se obično nalazi oko 50% proteina, jedan molekul proteina na 50 molekula lipida, tako da masu čini 50% proteina. Proteini koji strukturiraju plazminu membranu grupisani su u: integralne, periferne i globularne proteine.

Integralni proteini su duboko uronjeni u membranu ili je sasvim probijaju i predstavljaju čvrsti integralni dio membranske strukture, povezani sa lipidnim dvoslojem, kako hidrofobnim tako i hidrofilnim interakcijama. Integralni proteini su važni konstitutivni dijelovi membrane, oni "plivaju" unutar dvosloja lipida koji

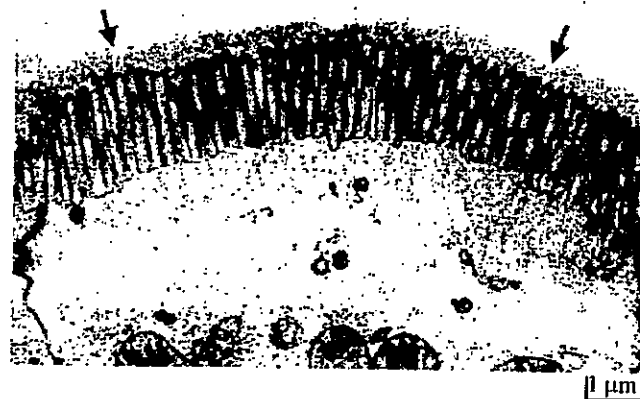
zapravo predstavlja jedan dinamični sistem unutar kojeg se lagano pokreću i daju membrani svojstvo viskoznosti laganog ulja. Periferni proteini vezani su za membranu slabijim silama hidrofilnog karaktera i mogu se od membrane odvojiti bez oštećenja osnovne membranske strukture. Ekstracelularni proteini plazma membrane su uopšteno proteini glikolize. Isto tako, proteini karbohidrata su glikolipidi smješteni na vanjskoj plazma membrani. Otuda je površina ćelije pokrivena karbohidratima poznata kao glikokaliks, formiran od oligosaharida, glikolipida i transmembranskih glikoproteina (sl. 2.29). Uloga glikokaliksa je da zaštiti ćelijsku površinu. Neki oligosaharidi glikokaliksa su markeri za različite međućelijske interakcije. Dobro su

ispitane interakcije athezije bijelih krvnih zrnaca (leukocita) cirkulatornog sistema i endotelnih ćelija koje štite od proccsa upala povrijeđenih tkiva. Prvi korak u atheziji između leukocita i endotelnih ćelija je prepoznavanje transmembranskih proteina nazvanih selectins koji prepoznaju specifične karbohidrate na površini ćelije.

Globularni proteini se nalaze u unutrašnjem citoplazmatskom sloju ćelijske membrane i obavljaju specifične enzimske funkcije. Oni regulišu fiksaciju jona za membranu i njihov transport u citoplazmu. Jedan takav enzim je adenil ciklaza koji

se nalazi na unutrašnjem licu ćelijske membrane, a sposoban je svojom aktivnošću reagovati na razne molekulske stimulse koji do ćelije dopiru između ćelijskog prostora. U tim slučajevima i određeni hormoni receptori ili neurotransmiteri vežu se na vanjskom licu ćelijske membrane uz specifične proteinske receptore koji uspostavljaju kontakt i pobuđuju katalitički dio enzima na unutrašnjem licu ćelije da ubrza metabolizam. Membranskim receptorima potreban je još jedan, treći regulacijski protein, nosilac GTP-a, kao treći činilac u toj hormonalnoj indukciji.

Medu lipidima plazmine mebrane neobično je važna skupina fosfolipida ili fosfoglicerida (lecitin i kefalin) i steroidi, fosfatidilholin, fosfatidilserin, fosfoetanolamin i svingomijelin. Takvi lipidi pokazuju izrazito polarnu hidrofilnu glavu na jednom kraju svoje molekule i dugačka dva nepolarna ugljikovodonikova lanca viših masnih kiselina, na drugom kraju molekule koji je izrazito hidrofoban. Fosfolipidi u plazma membrani životinjskih ćelija sadrže glikolipide i holesterol.



Slika 2.29 Glikokaliks. Elektronska mikrografija intestinalnog epitela ilustrira glikokaliks (Uslužnošću Don Fawcett/Viscons).

FUNKCIJA ĆELIJSKE MEMBRANE**Permeabilitet**

Ćelija je potopljena u tečnu vodenu sredinu, kao što je tjelesna tečnost beskičmenjaka, krv i limfa kičmenjaka. Spoljašnja sredina je od bitne važnosti za život ćelije, jer iz nje uzima za život neophodne materije. Između ćelije i njene spoljašnje sredine nalazi se protoplazmatična membrana koja predstavlja živi dio ćelije i njenu aktivnu komponentu. Preko protoplazmatične membrane ćelija prima iz spoljašnje sredine neophodne materije, a izlučuje produkte metabolizma nepotrebne ili štetne materije. Promet materija preko protoplazmatične membrane naziva se permeabilitet.

Permeabilitet je veoma složen proces koji zavisi od niza još nedovoljno proučenih faktora, ali na osnovu mnogobrojnih posmatranja i eksperimenata utvrđena je izvjesna pravilnost koja određuje prolaz pojedinih neorganskih materija kroz ćelijsku membranu. Utvrđeno je da kroz membranu lako prolaze sve materije koje se rastvaraju u lipidima, zatim sitni molekuli, kao i nenaelektrisani molekuli, što ukazuje da je membrana naelektrisana. Na osnovu brojnih činilaca zaključeno je da ćelijska membrana posjeduje visokoselektivni permeabilitet. Kroz ćelijsku membranu prolaze

relativno krupni molekuli dok manji molekuli ne prolaze; aktivna mišićna ćelija propušta aminokiseline, glikozu i druge molekule većih dimenzija, dok se u neaktivnom mišićnom vlaknu to ne zapaža. Molekuli glikoze, fruktoze i galaktoze, mada istih dimenzija, ne prolaze istom brzinom i lakoćom kroz membranu. Također, ni svi joni ne prolaze na isti način kroz membranu. Žljezdane ćelije su, također, visokoselektivno propustljive. Svaka vrsta žljezdanih ćelija je specijalizovana za izlučivanje jedne ili više vrsta određenih supstanci. Permeabilitet varira u raznim ćelijama, pa i u jednoj istoj ćeliji u toku života i u različitim funkcionalnim stanjima. Permeabilitet predstavlja kompleksan fenomen u kojem simultano ili sukcesivno učestvuju prosti fizički zakoni i aktivni fiziološki procesi kojima se ostvaruje dinamička ravnoteža između ćelija i spoljašnje sredine. Prema tome, permeabilitet se može svrstati istovremeno kako u kategoriju pasivne propustljivosti koja podliježe zakonima difuzije i osmoze, tako i u kategoriju aktivne propustljivosti koja je uslovljena energetskim pojavama i rezultat je fizioloških procesa.

**Transport molekula kroz ćelijsku membranu
(transport malih molekula)**

Preko plazma membrane vrši se konstantna razmjena materija sa okolinom. Plazma membrana je visokoselektivna i održava različitu koncentraciju jona u ćeliji i van nje, propušta hranljive molekule u ćeliju, a ispušta produkte metabolizma, nepotrebne i štetne materije. Zahvaljujući selektivnom permeabilitetu tj. propustljivosti, plazma membrane održava se konstantnost unutarćelijske sredine.

Kako su lipidni slojevi membrane nepropustljivi za većinu polarnih molekula, to onemogućava izlazak ćelijskog sadržaja (koji je najvećim dijelom rastvorljiv u vodi) iz ćelije. Otuda su u ćelijama razvijeni specifični načini za prenos molekula sa polaritetom kroz membrane, jer moraju unositi hranljive materije, a izlučivati nepotrebne i štetne produkte metabolizma. Također, moraju regulisati unutarćelijsku koncentraciju jona, što znači transportovati određene specifične jone u ćeliju ili iz nje. Transport ovakvih molekula kroz lipidne slojeve postiže se specifičnim transmembranskim proteinima. U ćelijama je, također, razvijen mehanizam za transport makromolekula (kao što su proteini) i velikih čestica kroz plazma-membranu koji se razlikuju od mehanizama za prenos malih molekula.

Procesom osmoze kroz ćelijsku membranu prolaze mnogobrojne, neobično važne materije kao što su: voda, gasovi, neelektroliti i dr. Kretanje ovih materija je uslovljeno razlikom u koncentraciji materija van ćelije i u ćeliji. Voda prolazi kroz membranu, u većini slučajeva, osmozom u oba smjera. Naprimjer, kada se ćelija nade u rastvoru niže koncentracije (hipotoničnom), ona bubri, jer voda iz rastvora niže koncentracije (okoline) prelazi u rastvor veće koncentracije (u ćeliju). U tom momentu u ćeliji vlada veći osmotski pritisak na membranu u odnosu na vanjsku sredinu. Ukoliko ćelija i dalje prima vodu iz hipotoničnog rastvora (endoosmoza), ona bubri i u jednom momentu dolazi do citolize (prskanja ćelije). Međutim, ako se ćelija nalazi u rastvoru veće koncentracije (hipertoničnom), dolazi do izlaska vode iz ćelije (egzoosmoze) tj. do plazmolize (smežuranja ćelije). U ovom slučaju je veći osmotski pritisak u rastvoru, van ćelije, nego u ćeliji. Ako se ćelija nalazi u izotoničnom rastvoru u kojem je koncentracija ista kao u ćeliji, neće doći do promjene ćelije. U izotoničnim rastvorima osmotski pritisak je potpuno isti van kao i u ćeliji.

Difuzijom materije iz sredine sa većom koncentracijom prolaze u sredinu sa manjom koncentracijom. Svi gasovi, posebno kiseonik i ugljen-dioksid, s obzirom na to da se dobro rastvaraju u vodi i lipidima, lako difunduju kroz membranu. Inače, i druge materije koje se rastvaraju u lipidima lako difunduju kroz membranu. Brzina difuzije ovih materija kroz membranu uslovljena je razlikom parcijalnih pritisaka koji vladaju na membranu, odnosno zavisi od gradijenta koncentracije. Uopšte, što su molekule manje i rastvorljivije u ulju (što su hidrofobnije i nepolarnije), brže se difunduju kroz dvosloj. Voda difunduje veoma brzo kroz lipidni dvosloj iako su molekule vode relativno nerastvorljive u vodi. To se objašnjava činjenicom da su molekule vode male i bez naboja, a osim toga su dipolarne strukture što im omogućava prolaz kroz regione lipida koji sadrže polarne (hidrofilne) grupe.

Međutim, suprotno prethodnom, lipidni dvosloj je nepropustljiv za sve jone, bez obzira na to koliko su male, kao i za većinu molekula rastvorljivih u vodi (kao molekule glukoze, ATP-a, nukleotidi, aminokiseline i proteini).

Dokazano je da prenos ovakvih molekula kroz ćelijsku membranu omogućavaju specifični proteini membrane. Proteini su označeni kao

transportni proteini ili permeaze, javljaju se u više oblika i u svim tipovima bioloških membrana. Svaki od ovih specifičnih proteina je takve strukture da transportuje samo određenu klasu molekula (kao što su joni, šećeri i aminokiseline) ili samo određenu vrstu molekula unutar jedne klase.

Transport kroz ćelijsku membranu može biti aktivan ili pasivan. U pasivnom transportu molekule bez naboja difunduju zahvaljujući gradijentu koncentracije, tako da se kreću iz područja veće koncentracije u područje manje koncentracije. Ako se transportuju molekule sa nabojem, na transport utiču i gradijenti koncentracije i ukupni *električni gradijent* membrane. Oba gradijenta zajedno čine elektrohemijski gradijent. Zapravo, sve plazma membrane imaju električni potencijal koji je negativan u unutrašnjosti u odnosu na spoljašnost. Ovaj potencijal olakšava ulazak jona sa pozitivnim nabojem, ali se suprotstavlja ulasku jona sa negativnim nabojem. U pasivni transport spada i prosta difuzija kojom ulaze gasovi kao što su kiseonik i ugljen-dioksid, voda i male relativno hidrofobne, ali rastvorljive u vodi, molekule kao što je etanol.

Olakšana difuzija i aktivni transport

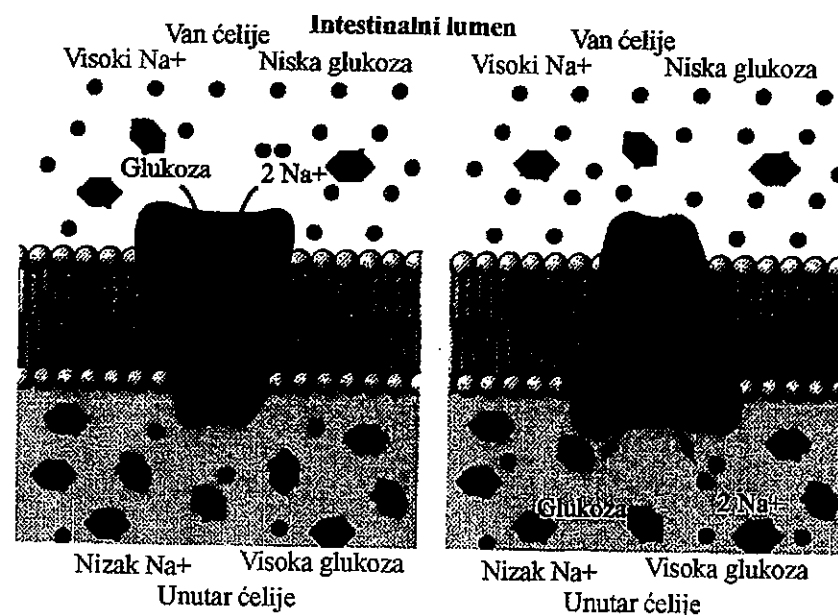
Većina materija koje imaju nešto veće molekule kao šećeri, bjelančevine i druge, a slabo se rastvaraju u lipidima, prolaze posebnim mehanizmom pasivnog transporta koji se naziva *olakšana difuzija*, jer se odvija uz pomoć transportnih proteina. Neki od ovih proteina formiraju kanale, dok drugi, proteini nosači, vezuju specifične molekule (npr. glukozu) i prenose ih kroz membranu u ćeliju. Proces podsjeća na enzimsku reakciju otuda se ovi proteini nazivaju još i permeaze. Međutim, za razliku od enzima, permeaze ne dovode do promjena u molekulama sa kojima se privremeno vezuju. Molekule ovih materija se vezuju hemijski za molekule-nosače koji se nalaze na spoljašnjoj strani membrane. Nosači su slični enzimima, na njima se nalaze aktivna mjesta za koja se vezuju molekule, koje treba da budu unijete u ćeliju. Aktivno mjesto sa molekulom formira jedno kompleksno jedinjenje. Ovako formirano jedinjenje je rastvorljivo u lipidima membrane, što olakšava dalji prolaz do unutrašnje površine gdje se molekul odvaja od nosača i ulazi u unutrašnjost ćelije. Oslobođeni nosači difunduju nazad na površinu membrane i prihvataju nove molekule. Olakšanom difuzijom krupniji molekuli uvijek prolaze iz područja više koncentracije u područje niže koncentracije bez utroška energije.

Prolazak jona kroz membranu zavisi od vrste ćelije. Elektroni prolaze veoma sporo kroz membranu, slabi elektroliti prolaze brže od jakih.

Negativno naelektrisani joni transportuju se brže od pozitivnih anijona. Krvne ćelije su visoko selektivne, imaju veliki afinitet za anijone, dok kationi slabo ili uopšte ne prolaze kroz njihovu membranu. Mišićne ćelije

lako propuštaju katijone kalijuma i natrijuma. Nervne ćelije su propustljive za katione, a ne propuštaju anijone.

Transport nekih materija kroz ćelijsku membranu vrši se protivno gradijentu koncentracije. Na sličan način transportuju se joni natrija i kalija, materija neophodnih za život ćelije. Ukoliko se joni N ili K nalaze u većoj ili manjoj koncentraciji van ćelije ili obrnuto, transport ovih materija odvija se aktivnim radom ćelije uz utrošak energije. Pretpostavlja se da je mehanizam *aktivnog transporta* (sl. 2.30) sličan kao i kod transporta olakšanom difuzijom. Osnovna razlika između olakšane difuzije i aktivnog transporta je u mehanizmu aktivnog transporta kojim se omogućuje transport materija iz područja sa nižom u područje sa višom koncentracijom, uz utrošak energije. Dakle, proces aktivnog transporta zahtijeva utrošak izvjesne količine energije, kako za potrebe hemijske reakcije između molekula nosača i molekula koji se prenose, tako i za potrebe savladivanja dejstva gradijenta koncentracije. Potrebna energija dobija se preko univerzalnog izvora energije u ćeliji ATP-a



Slika 2.30 Aktivni transport glukoze U procesu aktivnog transporta za prenos glukoze do intestinalnog lumena odgovoran N⁺ gradijent (nosač). Na nosaču N⁺ je aktivno mjesto-transporter koji vezuje i transportuje i glukozu i N⁺ u ćeliju. (Prema MacLennan, D. and Green, N. 1997.)

U sastavu membrane nalazi se specifičan enzim lipoproteinske prirode, ATP-aza koji razgrađuje ATP, zašto je potrebno prisustvo jona K van ćelije i jona Na u ćeliji. Aktivnim transportom se odstranjuju joni Na iz ćelije, unose joni K u ćeliju. ~~vrši se resorpcija vode u bubrežnim kanalčićima i propuštaju elektroliti.~~ Ostvaruje se konstantan i optimalan sastav hemijskih materija i održava normalan metabolizam time što omogućuje da u ćeliju uđu materije koje se nalaze u malim količinama u ekstracelularnoj tečnosti.

Jedan od najvažnijih i najbolje objašnjenih sistema aktivnog transporta je upravo natrijum-kalijum pumpa koja ima glavnu ulogu u stvaranju membranskog potencijala kroz plazma-membranu životinjskih ćelija. Ulazak pozitivnih jona kroz membranu žljezdanih ćelija može se objasniti pojavom elektroosmoze. Naime, kada se ćelija nalazi u rastvoru koji sadrži i pozitivne i negativne naelektrisane jone, na površini membrane formira se sloj apsorbiranih jona. Prvi sloj apsorbiranih jona je negativno naelektrisan, što ukazuje da je površina membrane pozitivno naelektrisana. Negativno naelektrisani joni čvrsto privučeni uz membranu, privlače pozitivno naelektrisane jone, koji se raspoređuju u drugom sloju. Kao posljedica ovih pojava u porama membrane se stvara dvostruki jonski sloj: negativni sloj, čvrsto fiksiran uz membranu i pozitivni sloj koji je slabije vezan i kreće se pod uticajem električnog polja stvorenog pojavom razlika u koncentraciji rastvora sa obje strane membrane (*električni gradijent*).

Molekularna medicina

Cistična fibroza

Cistična fibroza je recesivna genetska bolest i ispoljava se kod djece i mladih individua. To je najčešća letalna nasljedna bolest. Karakteristična disfunkcija cistične fibroze je u produkciji abnormalnog gustog, ljepljivog mukusa u nekoliko tipova epitelnih ćelija uključujući i ćelijsku liniju respiratornog i gastrointestinalnog trakta. Primarna klinička manifestacija respiratorne bolesti rezultira obstrukcijom pulmonalnog vazdušnog puta začepljenjem mukusom, što je praćeno groznicom i bakterijskom infekcijom. Znojne žlijezde, također, ne funkcionišu normalno. Cistična fibroza se javlja kao posljedica defekta Cl-transporta u oboljelom epitelu uključujući znojne kanale i ćelijsku liniju respiratornog trakta. Molekularna analiza dala je objašnjenje ove bolesti. 1989. izoliran je gen za cističnu fibrozu procesom molekularnog kloniranja. Sekvenciranjem gena otkriven je kodirajući protein (nazvan CFTR za cističnu fibrozu transmembranski provodni regulator) koji pripada ABC transportnim proteinima.

Kao i kod drugih nasljednih bolesti, izolacija gena za cističnu fibrozu otvara mogućnost genetskog skrininga u otkrivanju pojedinačnih mutiranih alela. Otkrivena je nova mogućnost u tretmanu. Jedna mogućnost je upotreba lijekova za stimulaciju Cl-kanala u oboljelom epitelu. Alternativno, genetska terapija obzbeđuje potencijal za vraćanje normalnog CFTR gena u respiratorni epitel pacijenata sa cističnom fibrozom i ponovnog uspostavljanja Cl-transportne funkcije. Prva genska terapija za cističnu fibrozu bila je inicirana 1993. Probe su pokazale da se transmembranski provodni regulator (CFTR) oslobada u bronhijalnom epitelu. Efikasnost transfer gena je velika i ekspresija prenosa CFTRc DNA ima perzistenciju za manje od mjesec dana.

Welsh, M.J.1999.

LITERATURA**Ključne reference**

- Barnes, C.: *Biology of cell*. New York, 1989.
 Cooper, G.M.: *The Cell a Molecular approach*. Boston University, 2000.
 Đuričić, E.: *Biologija sa humanom genetikom*. "Svjetlost" Sarajevo, 1996.

- Abeijon, C and Hirschberg, C.B.: *Topography of glycosylations reactions in the endoplasmic reticulum*. *Tends Biochemi*. 1992.
 Aebi, V, Cohn, J.: *Nature*, 1989.
 Anderson, R.G.W.: *Th caveolae membrane system*. *Ann.Rev.Biochem*. 67:199-225, 1998.
 Clayton, D.A.: *Replication transcription of vertebrate mitochondrial*. *Cell Biol*.1991.
 Campbell, K.: *Tree muscular distrophies*. *Cell*, 1995.
 Cruenberg, J. and K. E. Howell. *Ann. Rev .Biolo*.1989.
 Dunn, W.A.: *Trends Cell Biol*.1994.
 Don Fawcett.: *Cytographies, Photo Researchers*.1998.
 Ferquhar, M.G. and Palade, G.E.: *The Golgy apparatus*. *Cell Biol*.1998.
 Gilbert, W.: *The RNA word*. *Nature*, 1986.
 Gray, M.W.and Lang, B.F.: *Mitochondrial evolution* .*Science*, 1999.
 Jacobson, K.E.D.: *Revisiting the fluid mosaic modell of membranes*. *Science*, 1995.
 Knoll, A.H.: *The early evolution of eucaryotes*. *Science*, 1992.
 Keeton, W.T.and Could, J.L.: *Biological Science*. New York-London, 1986.
 Kornfeld, S.and Helluman, J.: *J. Biol*. 1999.
 Lodisch, H. et al.: *Molecular cell biology*. New York, 2001.
 Menge and Wurdz.: *University of Basel*.1995.
 Mac Lenan, and Green, N.: *Biolog. Chem*. 1997.
 Porter, H.R.: *Cell.Univ.Colorado*.1998.
 Rieder, C.L.and Bowers, S.S.: *Histochem Citochem*.1985.
 Russel, J.P.: *Genetics*. New York, 1992.
 Singer, S.J.and Nicolson, G.L.: *Science*.1972.
 Wood and Revel.: *Bacteriological revive*, 1987.
 Welsh, M.J.: *Gene transfer for Cystic fibrosis J. Clin. Invest*.1999.

II**Osnovi molekularne biologije**

- 3 Prenos genetske informacije
- 4 Rekombinacija genoma DNA
- 5 Sinteza i obrada RNA
- 6 Sinteza proteina, obrada i regulacija
- 7 Geni
- 8 Hromosomi

PRENOS GENETSKE INFORMACIJE

Nukleinske kiseline otkrivene su u 19. vijeku (tačnije 1881. godine izolovao ih je švajcarski ljekar F. Miescher). Sve do kraja 40-tih godina ovog vijeka smatralo se da su proteini niosoci genetske upute i da se geni sastoje od proteina. Casperson (1941.) je otkrio ulogu nukleinskih kiselina u sintezi proteina. Međutim, da nukleinske kiseline prenose gensku uputu opšte je prihvaćeno tek nakon eksperimenata trojice naučnika (Averi, MacLeod, McCarty). Ovi naučnici su visokoprečišćenu DNA jednog soja bakterija izazivača pneumonije (*Pneumococcus*) unosili u nepatogeni soj bakterija. Pod djelovanjem strane DNA nepatogene bakterije su se genetski izmijenile (transformisale) i postale patogene (dobijeno svojstvo se prenosilo na sljedeće generacije). Primjenom ekstrakta RNA ili proteina nije došlo do genetske izmjene (transformacije) nepatogenog soja.

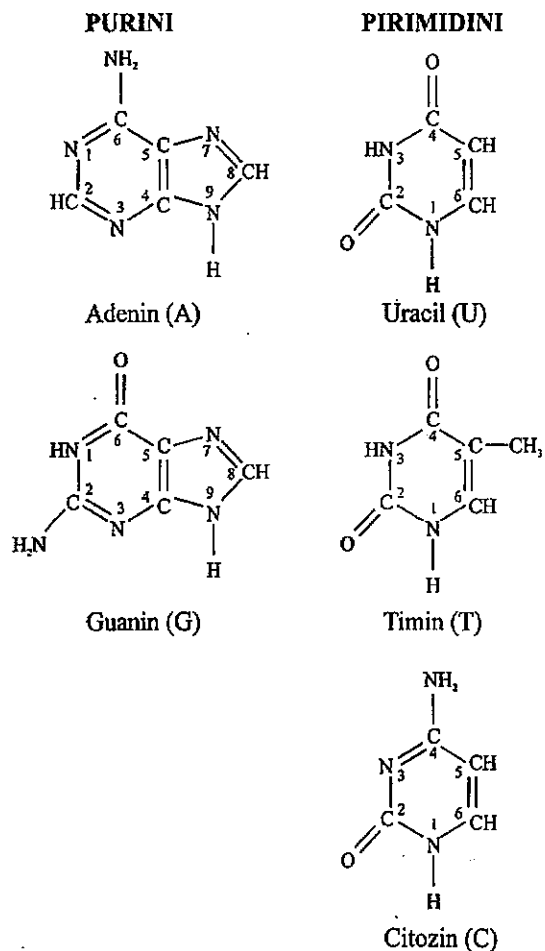
Nakon ovih istraživanja, slijedi serija novih eksperimenata u različitim laboratorijima u svijetu. Tako su 1950. godine Hershey i Chase koristeći se radioaktivnim izotopima ^{35}S i ^{32}P dokazali da je DNA genetski materijal određenih bakteriofaga. U toku ovog eksperimenta oni su proteine omotača markirali ^{35}S izotopom i unijeli ih u bakteriju *E. coli*. Zapazili su da markirani proteini ostaju izvan ćelije. Kada se infekcija *E. coli* izvrši sa fagom čija je DNA markirana sa ^{32}P , tada se ovaj radioaktivni izotop otkriva u ćeliji domaćina. Tokom 50-ih i 60-tih godina prikupljen je čitav niz dokaza o genetskim karakteristikama DNA.

Nukleinske kiseline su visokomolekulski polinukleotidi koji se hidrolizom razgrađuju u heterociklične organske baze, ugljikohidrate i fosforu kiselinu.

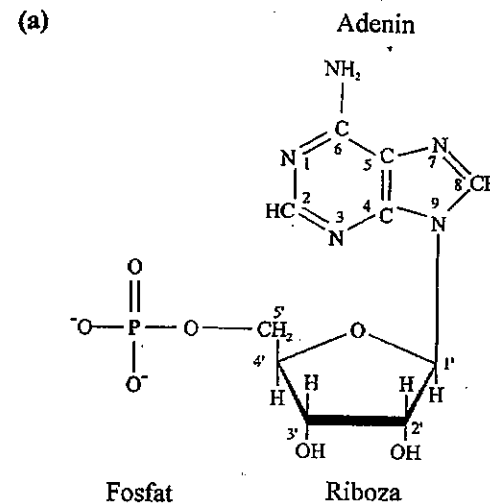
Prema vrsti ugljiko-hidrata, dijele se na deoksiribonukleinsku kiselinu i ribonukleinsku kiselinu koja sadrži deoksiriboza i ribonukleinsku kiselinu s ribozom kao ugljikohidratom. Genetski materijal je po pravilu DNA, dok RNA sudjeluje u sintezi proteina.

STRUKTURA DNA

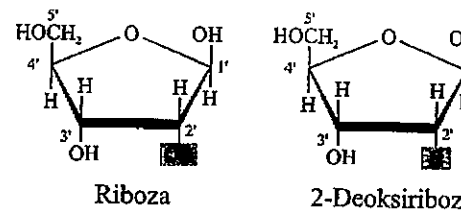
DNA se sastoji od dva različita tipa organskih baza, purina i pirimidina. Od purina najčešće se pojavljuju purini adenin (A) i guanin (G), a od pirimidina timin (T) i citozin (C) u RNA molekulama timin se zamjenjuje uracilom (U) slika 3.1. U DNA šećer pentoza je deoksiriboza, a u RNA je riboza. Purini i pirimidini vezuju se sa ribozom u nukleozide. Prije nego što nukleozidi postanu sastavni dio molekula DNA ili RNA molekula, vežu se esterski sa fosfornom kiselinom. Novonastali spojevi zovu se nukleotidi (sl. 3.2).



Slika 3.1 Hemijska struktura osnovnih baza u nukleinskim kiselinama U nukleotidima nukleinske kiseline, purini i pirimidini su najčešće vezani za 1' karbon riboze ili deoksiriboze. Od purinskih baza navedene su: adenin i guanin od pirimidinskih citozin, timin i uracil.



(b) Adenozin 5' - monofosfat (AMP)



Slika 3.2 Svi nukleotidi imaju zajedničku strukturu (a) Hemijska struktura adenozin 5 -monofosfata (AMP) nukleotida u RNA. Svi nukleotidi su sastavljeni od fosfatne skupine koja sadrži tri fosfatne grupe, vezane u 5 hidroksilu šećera pentoze čiji je broj 1 vezan za organsku bazu. Ustvari, u nukleotidu 1 karbon je vezan vezom za bazu. (b) Slika riboze i deoksiriboze u nukleinskim kiselinama.

Hemijske analize pokazuju da su DNA i RNA polinukleotidi (sl. 3.3) sastavljeni od velikog broja nukleozida povezanih s fosfornom kiselinom fosfodieterskim vezama. Fosforna kiselina povezuje 5 prim i 3 prim hidroksile. Ta je povezanost vrlo važna, jer pokazuje smjer molekule koji je neposredno povezan sa genetskom funkcijom. Hemijskom neposredno analizom otkrivena su tri osnovna svojstva nukleinskih kiselina: bez obzira na porijeklo nukleinske kiseline sadrže jednak broj purinskih i pirimidinskih baza, tj. A-G/T-C=1 (Čargafovo pravilo) količina adenina i timina, odnosno guanina i citozina, također, su jednake (G=C/A=T=1), i kod nukleinskih kiselina izoliranih iz različitih izvora omjer baza (A-T/C-G=1 vrlo je različit iako za određenu vrstu ostaje stalan). Uspostavljanjem ovih odnosa prokličn je put saznanju da se genetska specifičnost jedne vrste zasniva na redosljedu nukleotida, tj. na primarnoj strukturi DNA. Niže biljke i životinje u prosjeku imaju tzv. A=T DNA, jer se kod njih procenat C=G parova kreće u granicama 35- 50%. Dokazano je da što je niži evolucionni status, to je veća varijabilnost u nukleotidnom sastavu (25-75% opšteg variranja C=G parova), vidi tabelu 3.1. (Rendgenske analize (difrakcija X-zraka) prostorne strukture nukleinskih kiselina (Wilkins i saradnici) pokazale su sljedeće: purinske i pirimidinske baze dvodimenzionalne strukture DNA poredane su pod pravim uglom duž osi polinukleotidnog lanca jedna iznad druge sa međusobnom udaljenošću od 0,34 nm. Polinukleotidni lanac nije ravan već sastavljen u obliku uzvojnice pri čemu jedan zavoj uzvojnice iznosi 3,4 nm, izmjerena i izračunata

gustoća DNA pokazuje da DNA sadrži više od jednog polinukleotidnog lanca u obliku uzvojnice i DNA iz različitih ćelija ima istu prostornu orijentaciju (spiralna struktura dva lanca spiralizovanih jedan oko drugog). Godine 1953. Watson i Crick predložili su trodimenzionalni model strukture molekule DNA (sl. 3.4) prema kojem se molekul DNA sastoji od dva komplementarna polinukleotidna lanca koji se međusobno uvijaju u vidu dvostruke uzvojnice (spirale), povezani vodoničnim vezama. Svaki od spiralizovanih lanaca sastoji se od niza nukleotida postavljenih naspramno jedan prema drugome. Lanci su uvijeni jedan oko drugog tako da se duž dvolančane zavojnice prostiru dva spiralno uvijena žlijeba od kojih jedan ima veću debljinu i širinu (veliki žlijeb) od drugog (mali žlijeb). Purinske i pirimidinske baze nalaze se unutar zavojnice (unutrašnji dio skeleta molekule

Slika 3.3 Prikazani alternativni putevi nukleinskih kiselina u ovom slučaju samo jednog lanca nukleinskih kiselina sastavljenog od tri baze: citozin (C), adenin (A) i guanin (G).

(a) Hemijska struktura nukleotida CAG. Obilježena je slobodna hidroksilna grupa na 3 i slobodna fosfatna grupa na 5 kraju.

(b) Dvije metode prikazuju polinukleotide. U "stick" dijagramu (lijevo) šećer je prikazan vertikalnom linijom, a fosfordiesterske veze kosom linijom, baze su obilježene jednim slovom - skraćeno. U više primjera (desno) baze su obilježene jednim slovom (po međunarodnoj konvenciji). Po konvenciji polinukleotidne sekvence se uvijek navode u 5' → 3' pravcu (lijevo na desno)

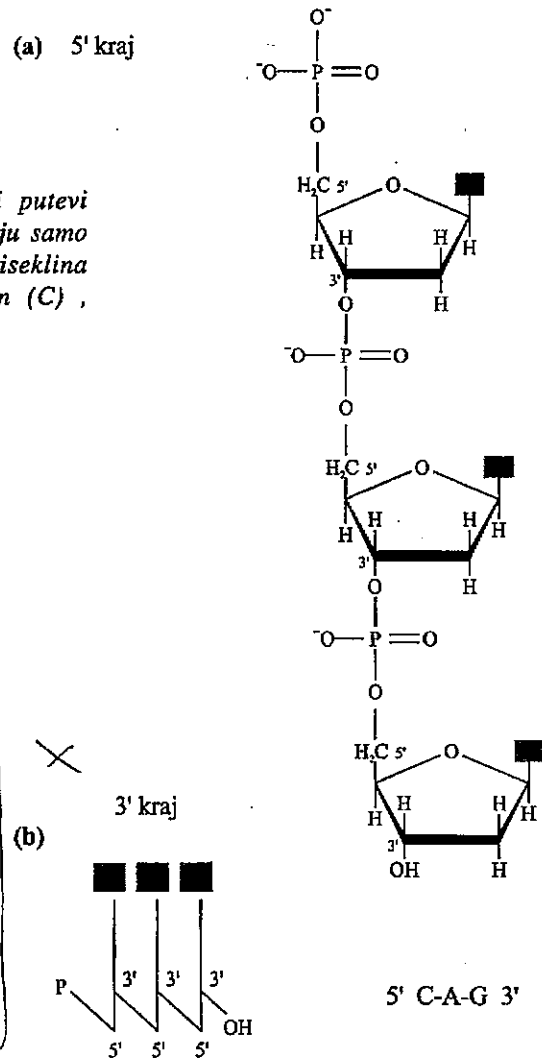
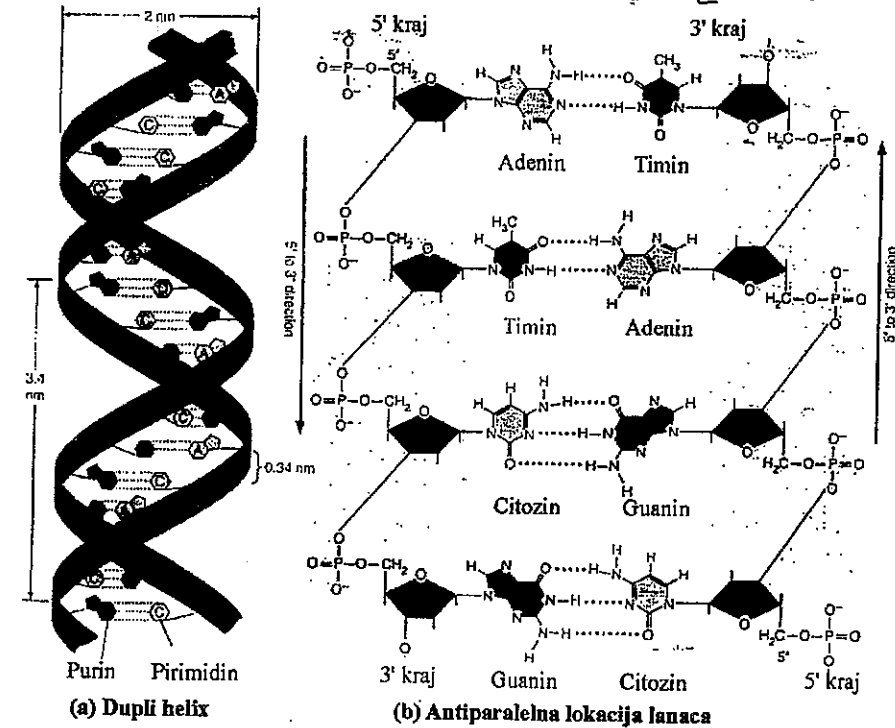


Tabela 3.1 Primjeri raširenosti odnosa A+T/G+C u molekulama različitih organizama

Porijeklo DNA	A+T
	G+C
Pseudomonas aeruginosa (bakterija)	0,51
Escherichia coli	0,97
Bacillus megaterium (bakterija)	1,66
Saccharomyces cerevisiae (kvasac)	1,80
Aspergillus niger (gljiva)	0,57
Pšenica	1,22
Locusta migratoria (insakt) Konj	1,41
Čovjek	1,40
Fag T ₂	1,84

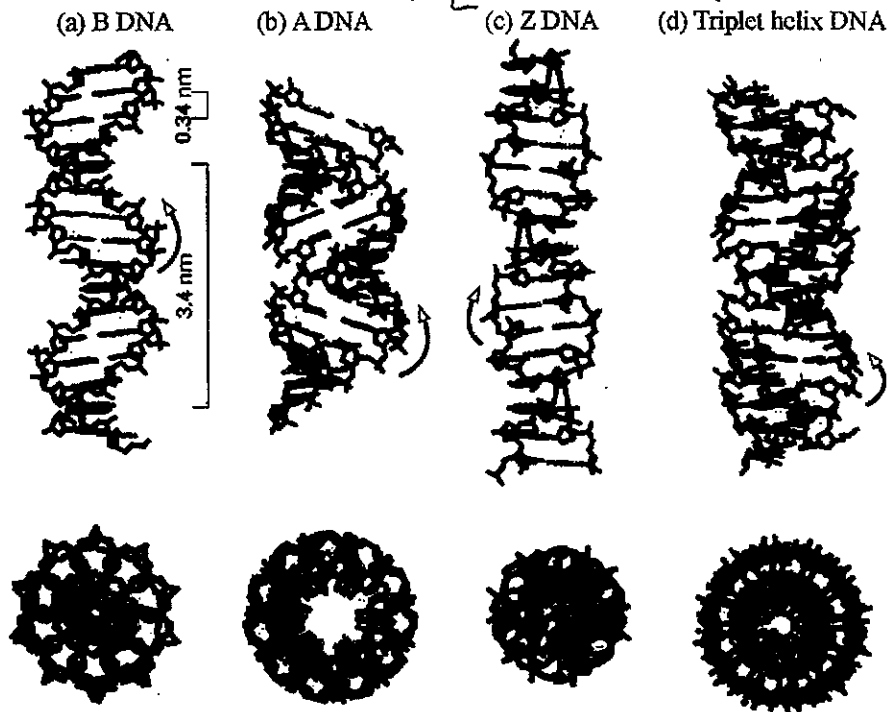
DNA) dok su fosfatne grupe okrenute prema spoljnoj strani i zajedno sa pentozom sa kojom grade 3prim-5prim fosfordiesterske veze čine okosnicu zavoja (spoljašnja strana lanca molekule DNA-skeletni dio). [Hod zavojnice ima



Slika 3.4 Dupli helix DNA (a) Šema ilustrira lanac DNA sa komplementarno vezanim bazama. A=adenin, G=guanin, C=citozin i T=timin. P=fosfati i S=šećer (deoksiriboza). (b) Jedan lanac DNA duplexa (raspletenog helixa) orijentisan je u smjeru 5-3, a komplementarni lanac orijentisan u suprotnom pravcu 3-5. Dijagram pokazuje, također, hidrogen veze između parova baza AT i GC. (Prema Lodish, Hetal. 2001.)

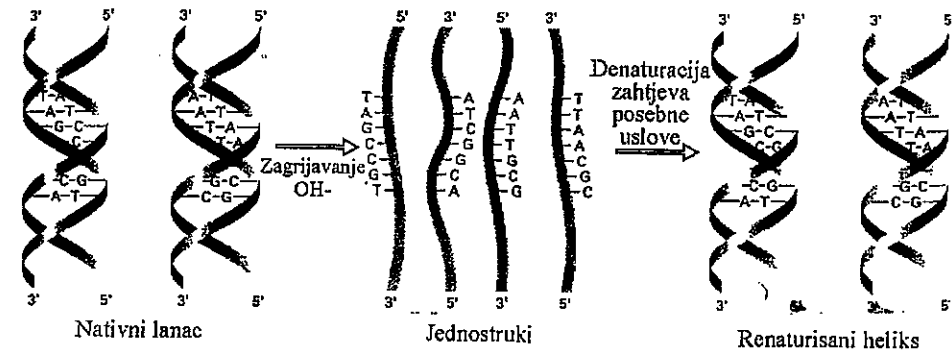
MOD ZAVOJNICE

IMA dužinu 3,4 nm i sadrži 10 nukleotida. Osnovni princip na kojem se zasniva ovakav model je princip komplementarnosti između adenina i timina (međusobno povezane sa dvije H-veze), odnosno guanina i citozina (povezanih sa tri H-veze), što doprinosi maksimalnoj stabilnosti molekule DNA. Specifično sparivanje baza određuje međusobnu komplementarnost dvaju lanaca DNA purinskih i pirimidinskih baza. Ne samo da se uvijek veže purin s pirimidinom već se adenin uvijek veže sa timinom (A=T) a guanin s citozinom (G=C). Na taj način se održava stalno rastojanje između komplementarnih baza dva polinukleotidna lanca koji iznose 0,29 nm, a cijeli prečnik dvojnog heliksa 2 nm. Razlika među pojedinim molekulama DNA zasniva se na razlikama u broju i redoslijedu nukleotida (četiri tipa nukleotida). Veličina molekule DNA mjeri se brojem parova nukleotida u njegovom lancu, npr. veličina molekula kod bakterija E. coli sadrži nekoliko miliona parova nukleotida dok je taj broj kod sisara hiljadu puta veći. Modeli različitih struktura DNA poznati kao egzist (axist) prikazani su na slici 3.5.



Slika 3.5 Modeli različitih struktura DNA poznati kao egzist (axist) (a) B forma DNA nalazi se u ćelijama čija je struktura heliks od 10 p.b. (3.4 nm). Vidljivi su veliki i mali lanci. (b) A je više kompaktna forma DNA sa 11 p.b. na zavoju, ima veliki nagib parova baza sa tendencijom u helix axist. Ova forma helixa adaptirana od RNA-DNA i RNA-RNA heliksa. (c) Z DNA ili zig-zag forma (otuda "Z") je "ljevoruki" heliks. (d) Triplet-heliks struktura, rastegnuta DNA gdje su svi purini (A, G) u jednom lancu komplementarni svim pirimidinima (T, C) u drugom lancu. (Prema, C. Kielkopf and P.B. Dervan 1988.)

Grijanjem supstrata u kojem se nalazi izolovana DNA moguće je da dođe do njegovog razlaganja (denaturacije) (sl. 3.6), odnosno do razdvajanja dva polinukleotidna lanca na dijelove. Na temperaturi su C=G veze otpornije. Proces je reverzibilan i postepenim hlađenjem može se uspostaviti normalna struktura molekula DNA (renaturacija). U uslovima in vitro može se izvesti spajanje dijelova rastavljenog lanca molekula DNA koji vodi porijeklo od različitih organizama (nastaje hibridna molekula DNA) čime se koristi kod utvrđivanja stepena evolucione sličnosti. Tako je dokazano da je procenat hibridizacije DNA čovjeka i miša 13%, a čovjeka i šimpanze 95%. Metodima denaturacije koristilo se i pri klasifikaciji humanog genoma tj. određivanju repetitivnih i nerekativnih sekvenci DNA (Murray, 1998.)



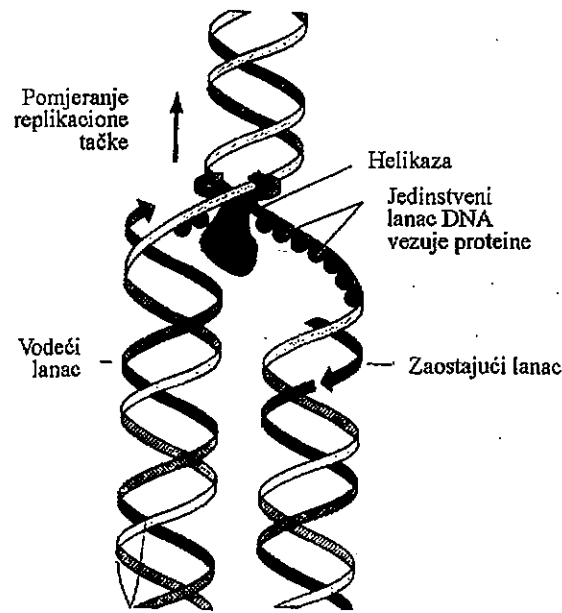
Slika 3.6 Denaturisani jednostruki lanac DNA se može renaturisati i dati duplu formu DNA -dupli heliks.

REPLIKACIJA DEOKSIRIBONUKLEINSKE KISELINE (DNA)

Replikacija (udvajanje) DNA vrši se kod eukariota u interfazi ćelijskog ciklusa. Pod replikacijom se podrazumijeva proces pri kojem iz jednog molekula DNA nastaju dva identična molekula DNA. Deoksiribonukleinska kiselina predstavlja jedine pozante molekule sposobne za autoreprodukciju. Prve eksperimentalne dokaze o tzv semikonzervativnom načinu replikacije DNA dali su Messelsen i Stahl (1958.). Oni su uzgajali bakterije E. coli na podlozi koja je sadržavala teški azot (N^{15}), sve dok sav azot nije bio zamijenjen sa N^{14} . Nakon toga su ove bakterije prebacili na podlogu koja je sadržavala tzv. laki azot (N^{14}). Nakon prve diobe ekstrahovali su DNA iz ovih ćelija i analizom njegovog sastava utvrdili da ona sadrži N^{15} i N^{14} u jednakim količinama. Time je pokazano da su pri posljednoj diobi formirani hibridni molekuli DNA u čijim je dvojnim lancima jedna od niti ("stara") sa N^{15} azotom, dok je druga (novonastala) nit sa N^{14} azotom. Uz pomoć elektronskog mikroskopa moguće je tačno vidjeti mjesto gdje započinje replikacija. Replikacija DNA u prokariota i eukariota starta

jedinstvenim sekvencama nazvane "porijeklo replikacije" (origin of replication) koje služe kao specifična mjesta za vezivanje proteina inicijacije replikacionog procesa. Utvrđeno je da replikacija ne započinje od krajeva DNA lanca, već na udaljenosti od oko 17% od jednog kraja lanca. Nakon završetka replikacije uočava se formacija u obliku slova Y (sl. 3.7).

Slika 3.7 Djelovanje heliksa i jednostrukog-lanca DNA vezanog sa proteinima Helix se odvaja na dva roditeljska lanca ispred replikacione tačke. Razmotavanje DNA lanaca omogućavaju proteini koji se vezuju za jedan lanac DNA, tako da oni mogu služiti kao matrica za novu DNA sintezu (Prema Cooper, G.M. 2001.)



Na osnovu niza sličnih eksperimenata zaključeno je da udvajanju molekula DNA prethodi rasplitanje

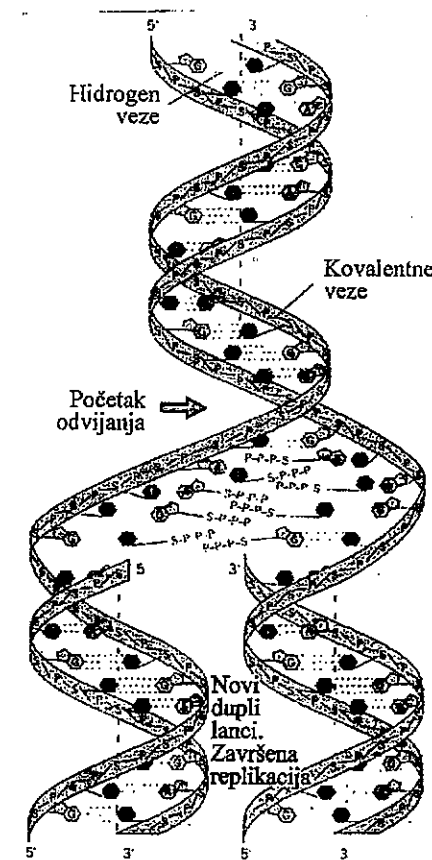
dvojnog spiralizovanog lanca DNA od jednog od krajeva lanca. Dokazano je (Albert i Frey) da ta nukleoidna mjesta zauzimaju proteini. Za nukleotidna mjesta vezuju se proteini (vidi sliku 3.7) koji aktivno učestvuju u rasplitanju roditeljskih lanaca. Ti proteini se vezuju specifično za jedan lanac DNA i kada su prisutni u većem broju -teže da raspletu dvostruku spiralu DNA na pojedinačne lance. Svaki od tih proteina vezuje se za 8-10 nukleotida, a ukupno na svakom kraku raspletanog DNA-lanca je nađeno oko 200 molekula proteina, što znači da se ispred mjesta sinteze novog lanca nalazi oko 2000 nesparenih baza

Takoder, smatra se da dolazi do razdvajanja vodoničnih veza između baza, nakon čega dvostruki lanac počinje da se replicira. Svaki jednostruki lanac djeluje kao model za formiranje novog komplementarnog lanca, tako da se obrazuje novi dvostruki lanac DNA koji se sastoji od jednog starog i jednog novog lanca (semikonzervativan model replikacije molekula DNA) sl. 3.8.

Unutar žive ćelije uključen je niz biohemijskih procesa u sintezu DNA. Većina podataka iz tog područja dali su Kornberg i saradnici, 1974. Autor je dokazao

da se molekule DNA mogu sintetisati in vitro u podlozi koja je pripremljena ekstrakcijom ćelija bakterije E.coli. Fosfodietersko povezivanje nukleotida u smjeru 5prim-3prim katalizuje enzim DNA-polimeraza (Kornbergov enzim). Ovaj enzim je aktivan isključivo u prisustvu DNA. Do sada su poznata tri različita tipa DNA- polimeraza: Pol I, Pol II i Pol III. Sva tri enzima više

polimerizaciju novog lanca isključivo u 5-3 pravcu i, što izgleda čudno, imaju egzonukleaznu aktivnost. Ova sposobnost svih DNA-polimeraza omogućuje da se pogrešno vezan nukleotid "isječe" u isto vrijeme kada se doda novi, čime se postiže izvanredno visok stepen tačnosti replikacije (greška se dešava na jednom od 10^8 do 10^9 nukleotida).



Slika 3.8 Semikonzervativni model DNA replikacije bazira na komplementarnosti parova baza što je prijedlog Watson i Cricka. Svaki roditeljski lanac je matrica za sintezu novog komplementarnog lanca. Sekvence baza u novom lancu vezane su hidrogen vezama sa komplementarnim bazama roditeljskog lanca nukleotida u novosintetiziranom lancu.

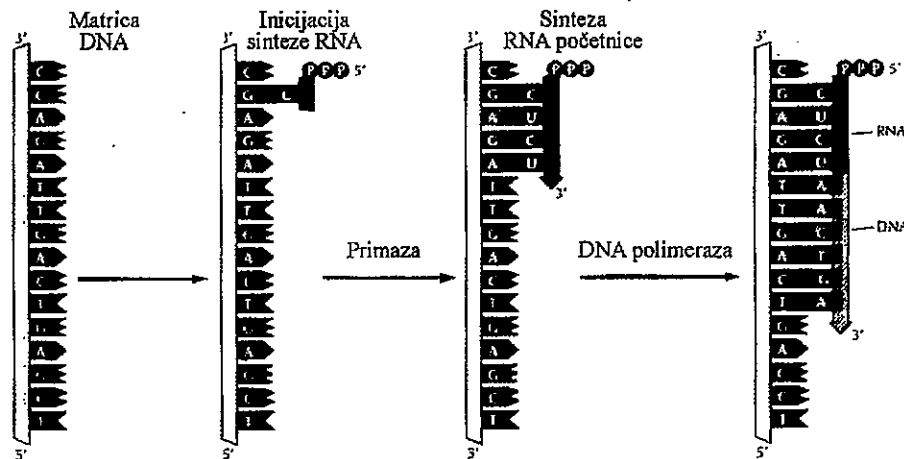
Osim toga, DNA polimeraza I ima egzonukleaznu aktivnost u 5prim-3prim pravcu. Smatra se da najvažniju ulogu u procesu replikacije DNA -lanca ima DNA-Polimeraza III, a da DNA Polimeraza I ima značajnu ulogu

u polimerizaciji samo manjih fragmenata DNA-lanca koji se normalno javlja prilikom replikacije DNA. Također, smatra se da je DNA-Pol I uključena i u procese reparacije sinteze DNA poslije UV- ili jonizujućeg zračenja. Specifična uloga Pol II još nije u potpunosti utvrđena. DNA Polimeraza III je replikacioni enzim, jer katalizuje povezivanje nukleotida u novi lanac a izgleda da je uključen i u selekciju baza nukleotida za novi lanac komplementarnih bazama starog lanca (matrica). Međutim, DNA polimeraza ne može započeti replikaciju DNA. Dalje, u proces je uključena grupa nukleaza. Naprimjer, enzim endonukleaza siječe jednostruki lanac DNA i tako pravi prekid na jednom lancu

heliksa raskidajući fosfodiesterske veze u položaju 3prim. Prekidi na jednom lancu heliksa obezbjeđuju dva slobodna kraja na ovom lancu i despiralizaciju na drugom. Despiralizacija se vrši još i uz učesće (kako smo prethodno naveli) proteina u etapama i pretpostavlja se da tada dolazi do raskidanja veza između baza. Na taj način svaki od ovih jednostrukih lanaca DNA, nastao razdvajanje vodoničnih veza, služi kao model za sopstvenu replikaciju.

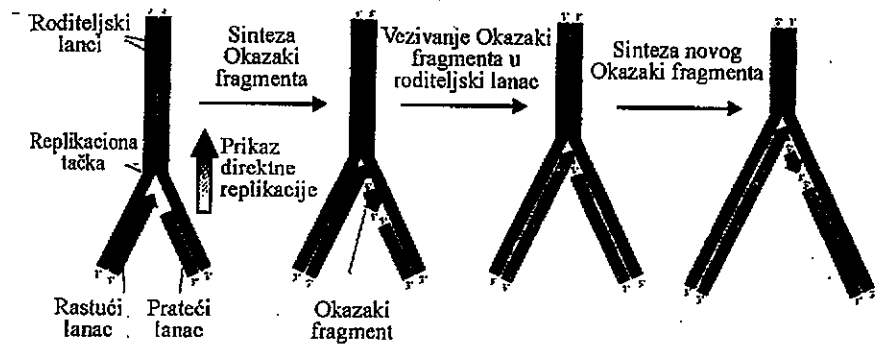
Kako DNA-polimeraza nije u stanju da otpočne sintezu novog lanca DNA, već samo da dodaje nove nukleotide na već postojeći polinukleotidni lanac, taj problem "riješilo" je otkriće Komberga, Okazakija i drugih. Dokazali su da novosintetisani lanac DNA ima na svom 5prim kraju kratke segmente RNA-koji predstavljaju oko 10% ukupne veličine replikacionog fragmenta. Znači, mjesto početka replikacije DNA ne prepoznaje DNA-polimeraza već specifična forma RNA-polimeraze tzv. primaza.

RNA-polimeraza vezuje za sebe ribonukleotide i taj proces ide sve do mjesta kada enzim naiđe na "stop" signal. Tada se enzim odvaja, a kratak lanac RNA ostaje vezan za DNA matricu. Kratki lanac RNA-polimeraze služi kao osnova na koju sada DNA-polimeraza dodaje deoksiribonukleotide (sl. 3.9) Dakle, pod uticajem RNA-polimeraze sintetiše se prvo jedan oligonukleotidni molekul RNA, nazvan RNA-početnica (eng. RNA primer) koji, zapravo, započinje proces sinteze, a zatim DNA-polimeraza nastavlja replikaciju DNA molekula. Potom se uključuje enzim endonukleaza koja specifično prepoznaje region gdje je RNA-početnica u položaju 3prim kovalentnom vezom povezana za 5prim položaj deoksiribonukleotida. Ovaj enzim isjeca RNA-početnicu. Nakon uklanjanja RNA-početnice gepovi (praznine) se popunjavaju deoksiribonukleotidima. Ovaj proces rasta lanca DNA u pravcu 5prim-3prim odvija se pod kontrolom DNA-polimeraze. Na kraju, enzim DNA-ligaza ima funkciju povezivanja dva novosintetisana fragmenta (Okazaki fragmenti 1968.), vidi sliku 3.10.



Slika 3.9 Inicijacija Okazaki fragmenata sa RNA početnicom. Kratki fragmenti RNA služe kao početnice za djelovanja DNA polimeraze.

Replikacija DNA molekula se uvijek vrši u 5prim-3prim pravcu, što znači da se deoksiribonukleotidni fosfat u kojem je fosforna grupa vezana za deoksiribozu u položaju 5C, spoji OH grupom deoksiriboze koja je u položaju 3C zadnjeg nukleotida u novoformiranom lancu DNA. Dakle, kovalentne veze se ostvaruju između fosfatne grupe jednog nukleotida u položaju 5prim sa OH grupom u položaju 3prim deoksiriboze susjednog nukleotida. Dvostruki lanac DNA molekula je suprotnog polariteta, tj. ako u jednom lancu C atomi deoksiriboze idu od 5prim prema 3prim, onda u drugom redoslijedu C atoma u tom istom smjeru će biti od 3prim prema 5prim, te će se replikacija u obje niti odvijati u suprotnom smjeru, čime se obezbjeđuje kontinuitet DNA molekula. Polazeći od činjenice da DNA-polimeraza vrši svoju funkciju u 5prim-3prim pravcu, kao i od toga da je dokazano da se sinteza DNA odvija u fragmentima (Okazaki fragmenti), Komberg (1974.) i Watson (1976.) objašnjavaju kako se na oba raspletana lanca "stare" DNA, od kojih jedan ima pravac 5prim-3prim a drugi 3prim-5prim vrši sintezu novih lanaca DNA.



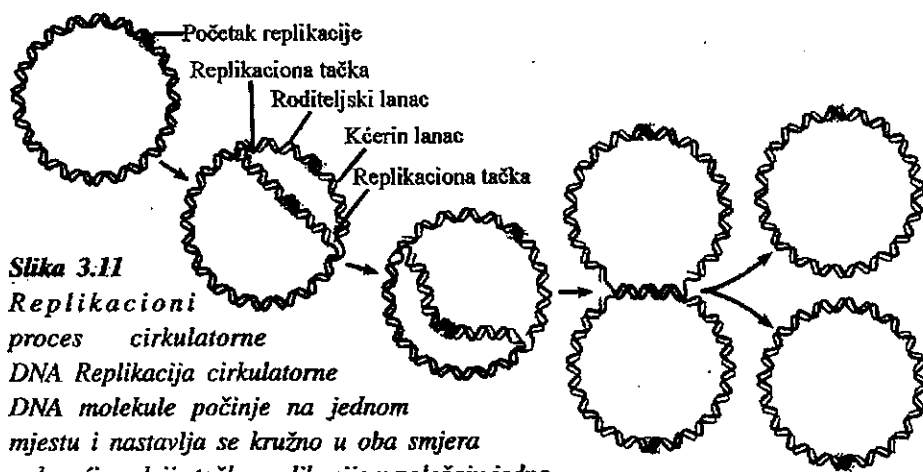
Slika 3.10 Sinteza vodećeg i pratećeg lanca DNA Sinteza vodećeg lanca je kontinuirana i ide direktno iz replikacione tačke. Zaostali lanac se sintetiše u malim fragmentima (Okazaki fragmenti), suprotno od tačke replikacije. Okazaki fragmenti se vezuju DNA ligazom. (prema Cooper, G, M. 2000.)

Osnovna ideja je da na oba lanca sinteza novih polinukleotidnih lanaca ide u sekvencama od po oko 1000 nukleotida koji se potom vezuju uz pomoć enzima DNA-ligaze u sve veće jedinice, do potpunog formiranja novog lanca DNA. To znači da ispod stvarne tačke rasta novih lanaca DNA postoje raspletani "roditeljski" lanci za koje se novi nukleotidi ne vezuju. Danas je poznato da ta nukleotidna mjesta zauzimaju (kako smo već naveli) proteini koji učestvuju u rasplitanju roditeljskih lanaca. U ćelijama eukariotskih organizama DNA ima više inicijalnih mjesta replikacije ili replikona tako da istovremeno dolazi do replikacije na više mjesta DNA. Tako se replikacija odvija mnogo brže u fazi brazdanja u toku embriogeneze kada su ćelijske diobe intezivne. Tada se na hromosomima zapaža veći broj replikona međusobno udaljenih 300-400 baza, a replikacija se završava samo za

nekoliko minuta. U ćelijama odrasle individue replikacija je sporija, a postoji i razlika između euhromatinskog i heterohromatinskog regiona. Euhromatinski regioni repliciraju se ranije i brže, razdaljina između replikona na jednom hromosomu iznosi oko 30.000, a replikacija traje oko 1 sat. Heterohromatinski region hromosoma se replicira kasnije i sporije, razdaljina između regiona je 300.000 baza, a replikacija traje 10 sati.

REPLIKACIJA CIRKULATORNOG HROMOSOMA BAKTERIJE *E.coli*

Početak replikacije je prvi puta proučen i definisan kod bakterije *E.coli*. Genetskom analizom je dokazano da replikacija počinje uvijek na jedinstvenom mjestu bakterijskog hromosoma. Početak replikacije je detaljno studiran i proučavan i nađeno je da oko stotinu p.b. DNA elemenata služi kao mjesto za vezivanje proteina inicijacije DNA replikacije (sl. 3.11). Dakle, ključni korak za početak se odigrava na mjestu vezivanja inicijalnih proteina. Inicijalni proteini započinju odmotavanje DNA pri čemu se uključuju i drugi proteini za DNA sintezu. Sintezu vodećeg lanca inicira enzim primaza. DNA bakterije *E.coli* u toku replikacije izgleda kao zatvorena kružna linija sa unutrašnjom petljom pri čemu podsjeća na grčko slovo zeta (Θ). Roditeljski lanci DNA razdvojeni su samo u regionu u kojem se trenutno vrši sinteza novog lanca. Proces replikacije koji započinje na mjestu-replikativni početak (engl. origin of replication) simultano se odvija u oba pravca istom brzinom. U svakom trenutku postoje dvije replikativne viljuške (oblik slova Y) od kojih se jedna kreće u smjeru kretanja kazaljke na satu, a druga u suprotnom pravcu.



Slika 3.11
Replikacioni proces cirkulatorne DNA. Replikacija cirkulatorne DNA molekule počinje na jednom mjestu i nastavlja se kružno u oba smjera polazeći sa dvije tačke replikacije u položaju jedna naspram druge. Novi lanac je prikazan plavom bojom. Replikacioni proces proizvodi lanac DNA u obliku Grčkog slova zeta (Θ) po kojem je ovaj tip replikacije dobio ime.

Dvije replikativne viljuške se susreću u terminacionom regionu koji se nalazi nasuprot mjestu replikacije. Zaustavljanje replikacionih viljuški u terminacionom regionu odvija se uz učešće specifičnih proteina (tus proteina) koji direktnom reakcijom sa helikazom sprečavaju dalje razdvajanje lanca DNA. Posljedni korak u terminaciji replikacije DNA kod bakterija katalizuje enzim DNA topoiomeraza II koji odvaja dva novonastala kružna molekula DNA. Za replikaciju cijelog bakterijskog hromosoma potrebno je oko 40 minuta (prema, Matić 1997., Lewin 1997.)

REPLIKACIJA JEDNOLANČANIH DNA i RNA-virusa

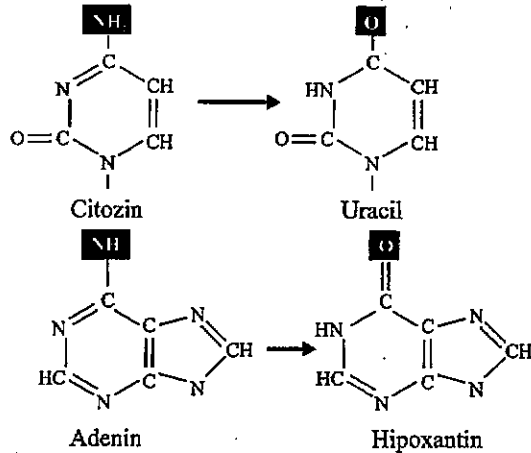
U procesu replikacije jednolančane DNA i RNA-virusa lanac koji inficira ćeliju označen je kao plus-lanac, nosivši sintezu kao minus-lanac, a prstenasta tvorevina, dvolančana, cirkularna DNA, replikativnom formom (RF) virusa. Normalno je da je matrica za sintezu virusnog genoma minus-lanac, jer DNA koja bi se sintetisala na plus-lancu nije identična virusnoj DNA, već je komplementarna virusnom genomu. U tom lancu bi, npr. genetski kod genoma virusa ATG (adenin, timin, guanin) bio prepisan kao TAC (timin, adenin, citozin). Prema tome, nasljedni materijal ovih virusa, jednolančana DNA predstavlja istovremeno i iRNA za sintezu proteina koji omogućavaju replikaciju virusa i obrazovanje proteina -kapsida.

U ovu grupu virusa ubraja se i virus koji izaziva poliomijelitis. U ćelijama oboljelih osoba se nalaze plus- i minus RNA-lanci i RNA-replikaza specifična za Poliovirus, vezana za membranu ćelije. Jednolančani RNA-virusi mogu u citoplazmi ćelije domaćina da na RNA-lancu sintetišu komplementaran DNA-lanac. U ovu grupu virusa ubraja se i HIV-virus, uzročnik SIDA-e. Iako se prema centralnoj dogmi molekulske biologije uvijek na molekulu DNA prepisuje RNA, specifičan enzim virusa, reverzna transkriptaza omogućava sintezu DNA-lanca na molekulama RNA-lanca, vezuje komplementarne DNA-nukleotide i obrazuje dvolančani molekul DNA. Slobodni krajevi DNA se spajaju u prstenastu tvorevinu. Prsten se procesom rekombinacije ugradi u DNA hromosom ćelije domaćina. Uključena u hromosom DNA virusa može da se prepisuje i da daje različite informacije. Prepis kompletne DNA virusa je jednolančana RNA (iRNA), a to je genom virusa. Ove RNA se uključuju u protejske kapside, dolaze do površine ćelijske membrane domaćina obrazuju još jedan omotač. Odvajajući se od membrane, virusi ostavljaju veća ili manja oštećenja na membrani. Ukoliko ne može da popravi ova oštećenja, ćelija umire (Lewin, B.1997.)

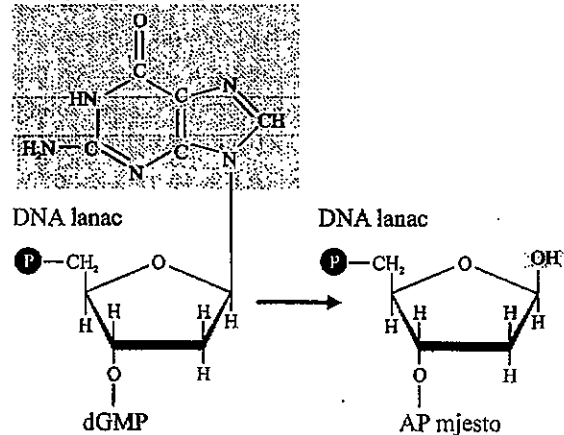
REPARACIJA DNA

Mutacije mogu rezultirati ugrađivanjem nekorektnih baza u toku replikacije DNA (vidi sl.3.12). Isti rezultat je pri izlaganju hemijskim mutagenima ili radijaciji (vidi sl.3.13). Takve promjene mogu blokirati replikaciju DNA ili transkripciju RNA i mogu rezultirati visokom frekvencijom mutacija. Tako, genom tipične sisarske ćelije u toku sata pretrpi više hiljada oštećenja uzrokovanih navedenim agensima. Prije svega, u ćelijama je razvijen mehanizam za reparaciju (popravak) oštećenja genetskog materijala. Postoji nekoliko različitih tipova sistema popravka, koji djeluju u normalnoj ćeliji prije nego se oštećenja ispolje u fenotipu. Mehanizam popravka je podijeljen u dvije opšte grupe: (1) direktnih prekida hemijskih reakcija odgo vornih za DNA promjene, što se dešava prije replikacije DNA (prereplikativna repareplikacija) i (2) uklanjanja poromijenjenih baza i nukleotida zamjenom novosintetisane DNA (što se dešava nakon replikacije DNA).

(A) Deaminacija

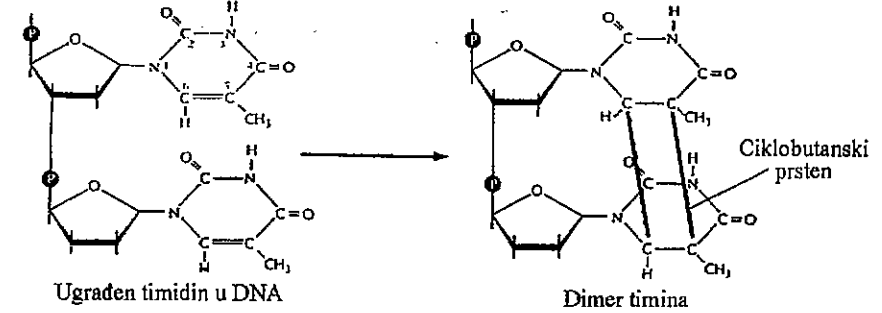


(B) Depurinacija

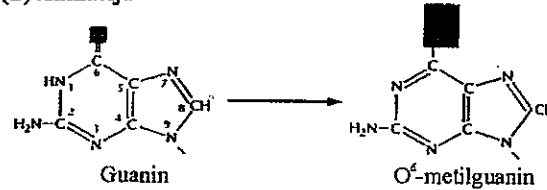


Slika 3.12 Spontane promjene DNA Postoje dva načina spontanih DNA promjena: (A) deaminacija adenina, citozina i guanina i (B) depurinacija (gubitak purinskih baza) što rezultira prekidom veza između baza i deoksiriboze proizvodeći apurinik (AP) mjesto u DNA.

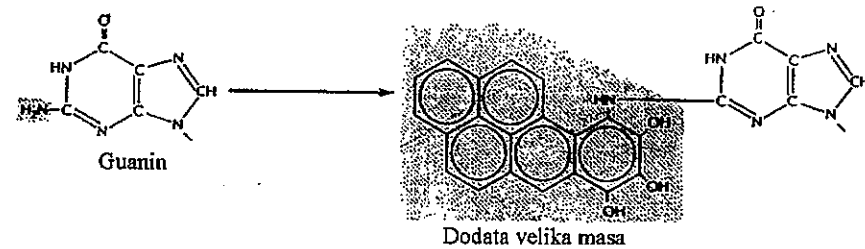
(A) Djelovanje UV zraka



(B) Alkilacija



(C) Reakcija sa karcinogenom



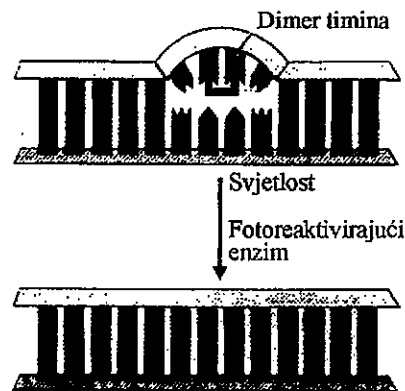
Slika 3.13 Primjeri DNA promjena induciranih radijacijom i hemikalijama (A) UV zračenje indukuje formiranje pirimidin dimera kod kojih se dva susjedna ciklobutanska prstena povezuju preko ugljika u položaju 5 i 6. (B) Alkilacijom se dodaje metil ili etil grupa na različita mjesta u DNA baze. U ovom primjeru guanine rezultira u formaciju O⁶-metilguanin. (C) Mnoge kancerogene reakcije sa DNA bazama rezultiraju dodavanjem velikih bulki-hemijskih grupa DNA molekula

Direktno otklanjanje DNA promjena
Reparacija putem fotoreaktivacije

Od svih promjena koje UV zraci indukuju u molekulama DNA najbolje su proučeni dimeri pirimidina (sl. 3.14). U slučaju dimera spajaju se dva pirimidinska prstena u položaju 5C i 6C. Dimeri dovode do deformacije strukture DNA.

Istraživanja na bakterijama E.coli dokazala su da svaki dimer u bakteriji smanjuje brzinu replikacije DNA za 10 sekundi što ima letalan efekat. Upravo je proučavanje mehanizma za eliminaciju pirimidinskih dimera iz genoma bakterije

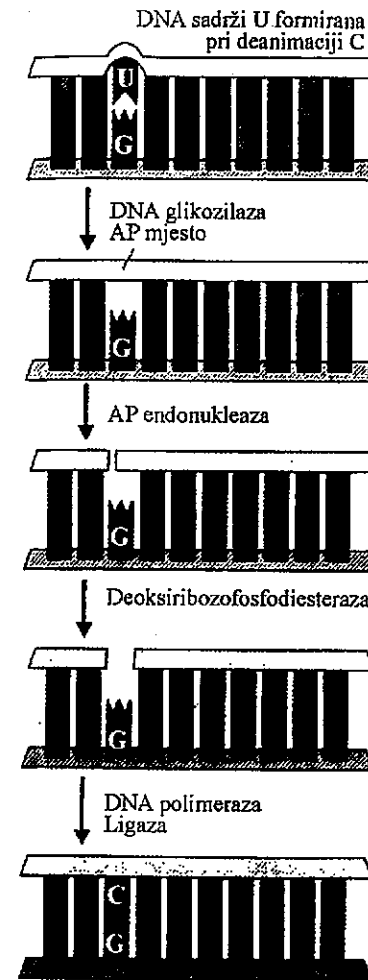
E.coli omogućilo definisanje pojma "popravka DNA". Oštećenja tipa dimera nastaju djelovanjem UV-zračenja, tako što se ozračene susjedne molekule timina fuzionišu obrazujući strukturu prikazanu na slici 3.13A. Ako lanac sa dimerama ostane neispravljen, on neće djelovati kao matrica za obrazovanje novog komplementarnog lanca već samo onda kada se dimer odstrani. Reparacija oštećenog lanca dimerima je moguća procesom *fotoreaktivacije* (sl. 3.14). To je jedan od rijetkih primjera popravka za koji nije potrebna genetska uputa sa drugog neoštećenog lanca DNA (nije potrebna matrica DNA). Suština procesa se sastoji u monomerizaciji dimera pirimidinskih baza (raskidanjem kovalentnih veza koje obrazuju dimeri), uz učešće svetlosne energije. Fotoreaktivacija je enzimski proces, odvija se uz učešće fotoreaktivirajućeg enzima koji prepoznaje mjesto oštećenja. Za ovaj tip popravka potrebni su još i UV zraci veće talasne dužine (od 3.500 do 5.000 Å). Prema tome, karakteristične faze fotoreaktivacije su: prepoznavanje mjesta gdje je oštećenje tipa dimera od strane fotoreaktivirajućeg enzima i njegovo vezivanje za dimer, apsorpcija fotoreaktivirajuće svjetlosti visoke energije i katalitičko cijepanje dimera (C-C veza) u monomere, nakon čega se uspostavlja normalna struktura DNA. Ovaj proces je karakterističan samo za popravak dimera pirimidinskih baza indukovanih UV-zračenjem (Alberts et. al. 1997.)



Slika 3.14 Direktni popravak dimera timina UV inducira dimere timina koji se otklanjaju procesom fotoreaktivacije uz učešće svetlosne energije i fotoreaktivirajućeg enzima, pri čemu se dimeri razgrađuju u monomere.

Druga forma direktnog popravka se odnosi na promjene koje su rezultat reakcija između alkilirajućih agensa i DNA. Alkilirajući agensi u složenoj reakciji mogu premjestiti metil ili etil grupu u drugu bazu DNA i time modificirati bazu.

Važan tip promjena je i metilacija O6 položaja guanina, jer produkt, O6-metilguanin formira komplementarni par baza sa timinom umjesto citozina (sl. 3.13B). Ove lezije mogu biti obnovljene enzimom (nazvan O6-metilguanin metiltransferaza) prenoseći metil grupu od O6-metilguanin u aktivno mjesto citozin rezidue.



Slika 3.15 Popravak isjecanjem -baza U ovom primjeru baza uracil (U) se formira deaminacijom od citozina (C) u komplementarnom lancu DNA. Veza između uracila i deoksiriboze prekida DNA glikozilaza ostavljajući šav bez baze (AP mjesto). Ovo mjesto prepoznaje AP endonukleaza koja presjeca lanac. Preostalu deoksiribozu pomjera deoksiribozofosfodiesteraza. Rezultat je praznina koju popunjava DNA polimeraza, a vezuje ligaza vodeći ka ugrađivanju korektnne baze citozina naspram guanina. (Uslužnoću, Sançar, A.1996.)

Reparacija isjecanjem

Direktan popravak je i popravak isjecanjem. To je efikasan proces popravka različitih oštećenja u kariotskim i eukariotskim ćelijama. Popravak isjecanjem podrazumijeva prepoznavanje i udaljavanje pogrešno sparenih ili nesparenih baza ili nukleotida. Rezultirajuća praznina se potom popunjava nosintetisanim lancem DNA koristeći se neporomijenjenim komplementarnim lancem DNA kao matricom. Razlikuju se tri tipa popravka isjecanjem: popravak isjecanjem-baza, popravak isjecanjem-nukleotida i sistem za popravak i zamjenu pogrešno sparenih odnosno nesparenih nukleotida. Popravak isjecanjem-baze je proces koji se sastoji u izrezivanju i zamjeni lezija i drugih oštećenja indukovanih UV-zračenjem ili drugim agensima. Poznato je da je tip sparivanja A-T i G-C osnova za replikaciju DNA. Ovo karakteristično sparivanje komplementarnih baza ima esencijelnu ulogu u popravci DNA.

Popravak DNA koja sadrži bazu uracil je dobar primjer popravka isjecanjem- baze, gdje se promijenjena baza prepoznaje i udaljava (sl. 3.15) Uracil se može pojaviti u DNA na dva načina. (1) Uracil (kao dUTP deoksiuridin trifosfat) se povremeno može ugraditi na mjesto timina u toku DNA sinteze i (2) uracil može biti formiran u DNA pri deaminaciji citozina. Isjecanje uracila u DNA katalizuje enzim DNA glikozilaza, prekidajući veze između baze (uracila) i deoksiriboze. Uracilska N-glikozilaza prepoznaje to oštećenje i eliminiše ga iz lanca DNA. Naime, enzim endonukleaza cijepa fosfordiesterske veze u lancu DNA, što omogućava enzimu egzonukleazi da odstrani (isječe) oštećeni dio.

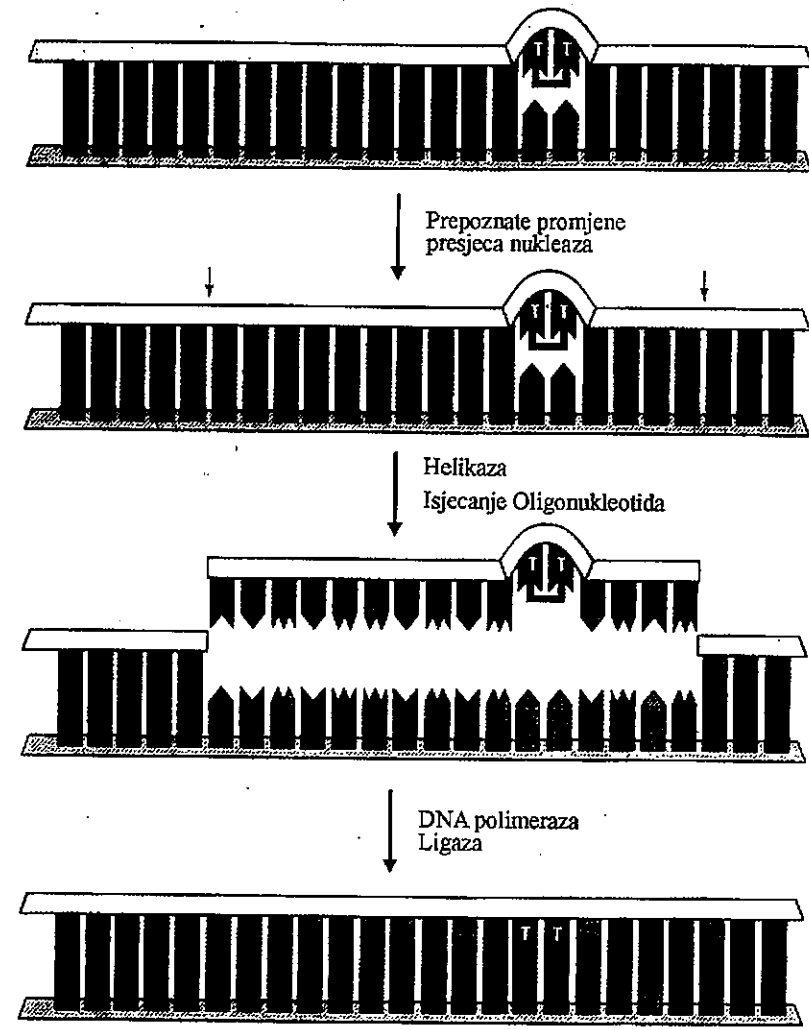
Nakon isjecanja i degradacije oštećenog dijela nastavlja se faza reparacije. Ovaj dio procesa popravka odvija se na osnovu genetske upute neoštećenog lancata. Na osnovu komplementarnog sparivanja purinskih i pirimidinskih baza. Za popunjavanje praznine (nakon isjecanja uracila) odgovoran je enzim DNA polimeraza koji u DNA ugrađuje normalnu pirimidinsku bazu citozin. To je i ujedno najvažniji mehanizam popravka DNA u procesu reparacije. Novosintetisani fragment se kovalentno vezuje sa komplementarnim dijelovima neoštećenog lanca (citozin za guanin). Povezivanje novosintetisanog fragmenta sa dijelovima starog lanca katalizuje enzim ligaza. DNA glikozilaza, također, prepoznaje i otklanja druge abnormalne baze uključujući hipoksantin formiran pri deaminaciji adenina, pirimidin dimere, alkilirajuće purine kao O6-alkilguanin i baze izmijenjene pri oksidaciji ili jonizujućoj radijaciji. Rezultat aktivnosti DNA glikozilaze je formiranje apirimidinik ili apurinik mjesta (nazvanih AP mjesta) u DNA. AP mjesta se formiraju kao rezultat spontanog gubitka purinske ili pirimidinske baze, što je značajan procenat u normalnim ćelijama. Ova mjesta se repariraju AP endonukleazom koja, inače, hidrolizuje fosfordiesterske veze u blizini AP mjesta (vidi sliku). Gepove ili praznine popunjava DNA polimeraza a ligaza uspostavlja fosfordiesterske veze. (S obzirom na to da DNA glikozilaza prepoznaje samo specifične forme izmijenjenih baza, to drugi sistemi popravka ekscizijom-isjecanjem prepoznaju šire varijante promjena baza promijenjenih molekula DNA uključujući UV-indukciju pirimidin dimera, većku-grupu dodatnih baza što je posljedica djelovanja mnogih kancerogena na DNA. Ova rasprostranjena forma popravka DNA je poznata kao popravak isjecanjem-nukleotida.

ISJECANJE
NUKLEOTIDA
+ S. 3.16

Popravak isjecanjem-nukleotida je katalizovan kod bakterije E.coli produktima tri gena (uvrA, B, C). Produkti ovih gena specifični proteini prepoznaju mjesta lezija. Kompleks tri gena (uvrA, B, C) nazvan *eksinukleaza* ima sposobnost direktnog isjecanja oligonukleotida koji sadrži oštećenje (Sl. 3.16). Helikaza odstranjuje izmijenjeni oligonukleotid iz dvostrukog heliksa DNA molekule što rezultira prazninom (gep), koju ispunjava DNA polimeraza i, a povezuje DNA ligaza.

Mismač popravak (engl. Mismatch repair) je treći sistem popravka isjecanjem koji prepoznaje pogrešno sparane baze i nukleotide ugrađenih u novosintetisanom lancu DNA u procesu replikacije. Mnoge pogrešno spojene baze se ispravljaju djelovanjem DNA polimeraze. Međutim, propuštene pogreške se ispravljaju kasnije mismač popravkom. Aktivnošću mismač enzima sistema za reparaciju identificiraju se mismač baze i isjeku, zamjenjuju se pogrešni nukleotidi dijelom novosintetisanog lanca koji je komplementaran nukleotidu u lancu matrici. Na taj način se restauriraju original sekvence DNA.

Kod bakterije E.coli ključnu ulogu u ovom procesu imaju proteini: Mut S koji prepoznaju nesparane parove, vezuju se za njih i iniciraju mismač reparaciju a formiraju i kompleks sa druga dva proteina nazvana Mut H i Mut L. Mut H je specifična endonukleaza koja se vezuje za nizove u smjeru 5'-GATC-3 i prekida

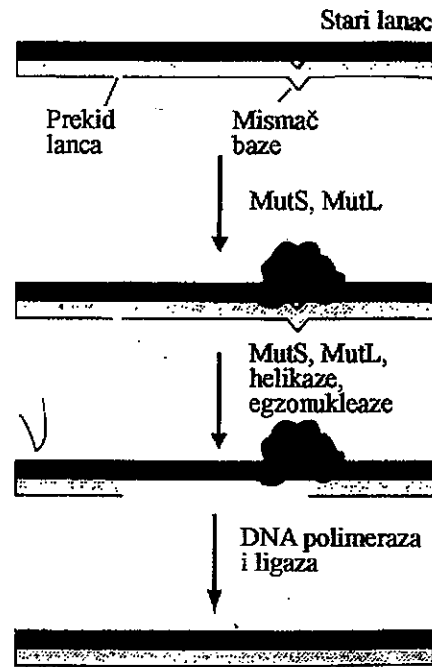


Slika 3.16 Popravak isjecanjem-nukleotida dimera timina Nakon prepoznavanja dimeri timina se isjecaju nukleazom prekidima na oba kraja 3 i 5. Odmotavanje helikazom rezultira u isjecanju oligonukleotida koji sadrži promjene. Praznine se popunjavaju DNA polimerazom, a povezuju ligazom. (Uslužnošću Wood, R.D. 1997.)

ovu sekvencu. Mut L i Mut S djeluju zajedno sa egzokleazom i helikazom isjecajući DNA na mjestu prekida lanca i mismač nukleotida rezultirajući prazninom koju popunjava DNA polimeraza III, a povezuje DNA ligaza. Potrebne su znatne količine energije (da bi se zamijenio samo jedan pogrešno ugrađen nukleotid mora da se degradira i ponovo sintetiše segment DNA dužine do 1000 nukleotida; Matic, 1997.)

Eukarioti imaju sličan mismač sistem popravka identičan bakterijskom. Vezivanje MutS i MutL za mismač baze potom njihovo isjecanje i zamjena je kao kod E.coli. (sl. 3.17). Značaj ovog repaer sistema je ilustriran ispitivanjem mutacija MutS i MutL gena odgovornih za nasljedni tip kolon kancera (nasljedni nepolipozni kolorektal kancer, ili HNPCC). Veza između HNPCC i defekta u mismač repaeru bila je ustanovljena 1993. kada su dvije grupe naučnika klonirale humani MutS gen i našli da su mutacije ovog gena vezane za oko polovinu svih HNPCC slučajeva. Kasnije studije su potvrdile da najviše slučajeva HNPCC su uzrokovani mutacijom u jednom od tri humana gena MutL.

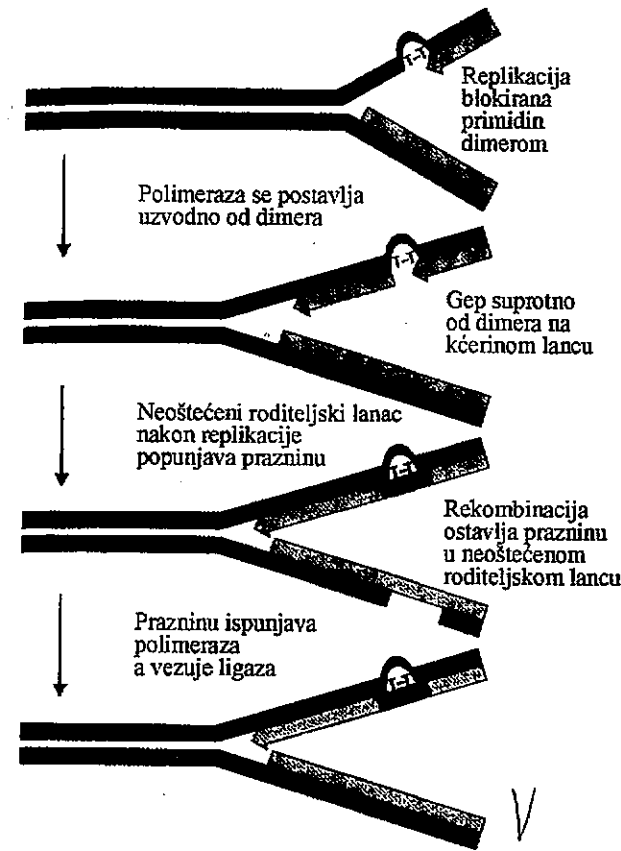
Slika 3.17 Mismač popravak u sisarskim ćelijama Mismač popravak u sisarskim ćelijama je sličan E.coli, osim što se novoreplicirani lanac razlikuje od parentalnog lanca, jer sadrži prekide. MutS i MutL se vezuju za mismač baze i direktno isjecaju DNA između prekida lanaca i mismač baza. (Uslužnošću Modrich, P.1997.)



Postreplikativna reparacija

Direktan popravak isjecanjem je sistem koji djeluje i ispravlja prije replikacije, tako da se replikacija DNA može produžiti koristeći se neizmijenjenim DNA lancem kao matricom. Međutim, ovaj sistem nije potpun, ćelije imaju alternativne mehanizme da promijene DNA replikacioni početak. Pirimidin dimeri i mnogi drugi tipovi lezija ne mogu biti kopirani pri normalnom djelovanju DNA polimeraze, pa se replikacija blokira na mjestu oštećenja. Nizvodno od mjesta oštećenja, međutim, replikacija se može ponovo inicirati Okazaki fragmentima i nastaviti dalje duž promijenjene matrice lanca (sl. 3.18). Rezultat je praznina u kćerkinom lancu naspram oštećenja (dimer) u roditeljskom lancu. Pri popravku šupljine u nosintetisanom lancu DNA uključuje se jedan od dva mehanizma: rekombinativni popravak ili greška-ležeći popravak (error-prone repair). U slučaju rekombinativnog popravka neizmijenjeni roditeljski lanac služi za popunjavanje gepova u kćerkinom lancu nakon replikacije, procesom rekombinacije genetskog materijala u kojem se nedostajući segment novog lanca DNA zamjenjuje odgovarajućim segmentom homolognog lanca iz drugog DNA lanca (vidi sliku) Postreplikativna tj. rekombinativna

reparacija je proces kao i homologna rekombinacija genetskog materijala u ćeliji E.coli. Započinje učestvom proteina RecA (enzim iz grupe nukleaza) koji omogućava razmjenu segmenata slične primarne strukture.



Slika 3.18 Postreplikativna reparacija U primjeru dimer timina blokira replikaciju, ali DNA polimeraza može zaobići leziju i reinicirati replikaciju na novom mjestu nizvodno od dimera. Rezultat je gap nasuprot dimeru i novo-sintetisanom DNA lancu. U rekombinativnom popravku praznina (gap) se puni nakon rekombinacije sa neizmijenjenim roditeljskim lancem. Prethodno formirana naspramna praznina u roditeljskom lancu se popunjava aktivnošću polimeraze i ligaze, koristeći se neoštećenim kćerkinim lancem kao matricom.

Rekombinativna reparacija je jedini reparativni mehanizam koji je moguć i onda kada su oba lanca DNA oštećena. Zato se ovim mehanizmom ispravlja ne samo greške koje su u jednom lancu DNA zaostale poslije replikacije već i oštećenja DNA u vidu dvolančanih prekida ili interlančanih pirimidinskih dimera.

Greška "ležeći"-popravak ispunjava prazninu (gap) dijelom nosintetisane DNA koja je nasuprot praznini. Nosintetisana DNA se sintetiše sa matricama lanca koji je izmijenjen, tako je ovaj oblik DNA sinteze nepouzdan i često vodi mutacijama. Nakon svakog tretmana bakterija UV zračenjem inducira se reakcija SOS, kao odgovor, što može dovesti i do jakog stresa. SOS geni mogu djelovati inhibitory na ćelijsku diobu i inducirati repaer sistem koji će dati kopije koje će imati visoki nivo promjena DNA.

GENETSKA REGULACIJA MEHANIZMA REPARACIJE

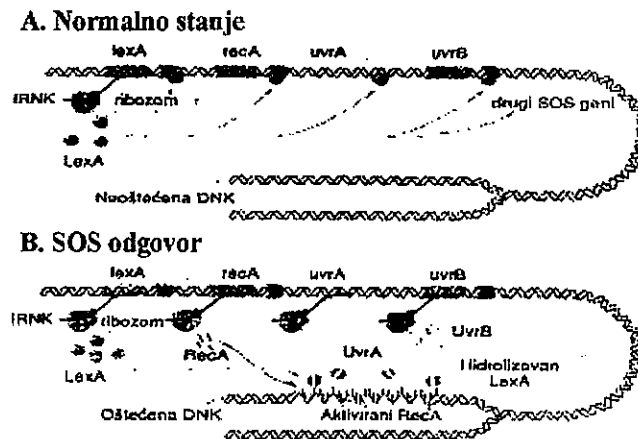
Navedeni mehanizmi reparacije su biološki regulisani i stoje pod kontrolom određenih gena.

SOS odgovor

Kada su lezije koje su izmakle reparaciji prije replikacije većeg obima, tada se replikacija DNA trajno zaustavlja, a u bakterijskoj ćeliji se zapaža indukcija sinteze većeg broja proteina. Ova pojava je poznata pod imenom SOS odgovor, a proteini čija je sinteza ubrzana pod imenom SOS proteini. Za popravak bakterijske DNA potrebni su produkti gena (*SOS-geni*). Ovi geni su obično smješteni na različitim mjestima bakterijskog hromosoma. Njihova aktivnost represirana je prisustvom proteina represora. Usljed toga se u ćeliji nalazi mala količina produkta "SOS" gena, iako je to mala količina ima važnu ulogu u aktivaciji "SOS" gena. Oštećenje DNA predstavlja signal koji aktivira tu malu količinu produkta. Produkt tada postaje proteaza koji razgrađuje represor. Nakon toga dolazi do aktiviranja svih "SOS" gena i do povećanja sinteze njihovih produkata tj. reparatnih enzima (npr. UvrA, UvrB).

Postepenim popravkom oštećenih mjesta DNA nestaje i signal koji je aktivirao minimalne produkte. "SOS" geni su sve više represirani, a sinteza njihovih produkata ponovo se vraća na normalnu minimalnu količinu (sl. 3.19).

Na osnovu istraživanja zaključeno je da ključnu ulogu u SOS odgovoru imaju proteini LexA (uloga represora u SOS gena u bakterijskoj ćeliji) i RecA (stimuliše autoproteolizu proteina LexA i veže se za jednolančane dijelove DNA u replikacionoj viljušci). Suština ovog modela regulacije SOS odgovora je u tome da u slučaju većih oštećenja molekule DNA protein RecA stimuliše autoproteolizu proteina LexA i smanjuje njegovu koncentraciju čime započinje depresija odnosno transkripcija SOS gena. Po završetku reparacije oštećenja DNA protein LexA ponovo preuzima ulogu represora SOS gena, a ćelija se vraća u normalno stanje (prema, Matić 1997., Becker et al 2000.)



Slika 3.19 Regulacija SOS odgovora

BOLESTI USLOVLJENE POREMEĆAJEM MEHANIZMA ZA REPARACIJU

U 60-tim godinama prošlog vijeka razrađen je model koji govori o diferencijalnoj reparaciji. Po ovom modelu, popravak se može vršiti samo u aktivnim sekvencama DNA, koje sadrže informaciju za sintezu proteina i gene za regulaciju njihove aktivnosti i zato su ove sekvence dostupne i enzimima za popravak. Kako se reparacija vrši u momentu replikacije, to nakupljanje oštećenja DNA ostaje do sljedeće replikacije što dovodi do poremećaja replikacije, diobe ćelije i pojave hromosomskih aberacija.

Dokazano je eksperimentalno u ćelijskoj kulturi da se sa starošću kulture smanjuje sposobnost isjecanja timidin dimera u diploidnim ćelijama čovjeka. Niz eksperimentalnih podataka ukazuje na to da je efekat sistema popravka DNA u vezi sa dužinom života vrste što predstavlja jedan od uzroka starenja organizma. Dokazano je postojanje veze između genetske nestabilnosti i starenja. Nakupljanje promjena hromatina, somatske genske i hromosomske mutacije, prekidi lanaca DNA i druge promjene su u pozitivnoj korelaciji sa dužinom života: mutacije su mnogo češće u ćelijama starih osoba, a ćelije u kulturi uzete od pacijenata sa različitim poremećajima sistema popravka DNA, kao što su Blumov sindrom, Fankonijeva anemija i druge bolesti, imaju smanjen potencijal rasta u poređenju sa kontrolnim kulturama. Iako postoje skoro savršeni mehanizmi za reparaciju oštećenja DNA kod skoro svih živih organizama, ipak postoje defekti u ovom mehanizmu. Defekti mehanizma za reparaciju su najčešće uslovljeni mutacijama. Takvi defekti se manifestiraju i kod nekih rijetkih i teških nasljednih bolesti (tabela 3.2). Među tim bolestima najbolje je proučena bolest *Xeroderma pigmentozum*. Ova bolest se nasljeđuje recesivno preko autosoma. Ljudi oboljeli od ove bolesti pokazuju visoki stepen osjetljivosti na sunčevu svjetlost (na ultraljubičasti dio spektra). Kod ovih bolesnika na koži se javljaju velike pjege, atrofija i keratoza kože. Bolesnici pate od fotofobije i konjuktivitisa. Postoji i sklonost ka karcinomu kože. Genetskim istraživanjima je utvrđeno da bolest nastaje usljed mutacije u jednom od sedam različitih genskih lokusa, koji su odgovorni za sintezu enzima endonukleaze. U nedostatku ovog enzima ne može započeti proces "isjecanja" dimera u oštećenoj DNA ultraljubičastom svjetlosti kod bolesnika. Znači, poremećen je sistem popravka DNA. Eksperimentalno (in vitro) je dokazano da se defekt može kompenzirati dodatkom enzima endonukleaze koji, inače, stvara bakterijski virus T4 u inficiranim bakterija, a koji normalno služi za odstranjivanje dimera pirimidina. Smatra se da je kod osoba koje imaju *Fankonijev sindrom* također, poremećen sistem za reparaciju DNA. Ovaj sindrom karakterizira anemija, a javljaju se i kongenitalne anomalije (mikrocefalija i prirodene srčane anomalije). Osobe su posebno osjetljive na fizičke i hemijske supstance koje dovode do unakrsnog povezivanja lanaca DNA. Zatim, *Bloomov sindrom* karakterizira eritem lica i patuljasti rast. Bolesnici su posebno osjetljivi na djelovanje ultraljubičastog

zračenja (fotosenzitivnost). Kod osoba je česta pojava leukemije. Pretpostavlja se da i progerija (Hutchinson-Gelfardov sindrom) je posljedica poremećaja mehanizma reparacije. Ovaj sindrom se karakteriše nizom simptoma: patuljasti rast, ćelavost. Vrlo brzi razvoj arterioskleroze ("djeca-starci"). Kako se bolest nasljeđuje još uvijek nije poznato (sl. 3.20).



Slika 3.20 Fotografija djece sa Hutchinson- Gelfardov sindromom pokazuje prijevremeno starenje karakteristično za ovu bolest. Djeca su stara osam (desno) i devet godina (lijevo). (preuzeto od Snusad et .al.)

Tabela 3.2 Nasljedne bolesti čovjeka kao posljedica defekta DNA-repaer

Bolesti	Osjetljivost	Kancer osjetljivost	Simptomi
Ataxia telangiectasia	γ zračenje	Linfomi	Ataxia, proširenje krvnih sudova u koži i očima, hromosomske aberacije, imune disfunkcije
Bloom's sindrom	Alkilirajući agensi	Karcinom, Leukemija, Limfomi	Fotosenzitivnost, facial telangiectases, hromosomalne promjene
Cockayne's sindrom	UV zračenje		Atrofija retine, fotosenzitivnost, progrijs, gluhoa trisomija 10
Fanconi anemija	Unakrsno-vezani agensi	Leukemija	Kongenitalne anomalije, hipoplastična panacytopenia
Hereditarni nepolipozni kolorektal kancer	UV zračenje hemijski mutageni	Crijeva, ovarija	Rani razvoj tumora
Xeroderma pigmentozum	UV zračenje, hemijski mutageni	Karcinom kože i melanomi	Fotoosjetljivost kože, keratoza

Uslužnoću, modificirano od A.Kornberg and T.Baker, 1992., DNA Replication, 2d ed., W.H.Freeman and Company, p.

4

REKOMBINACIJA GENOMA DNA

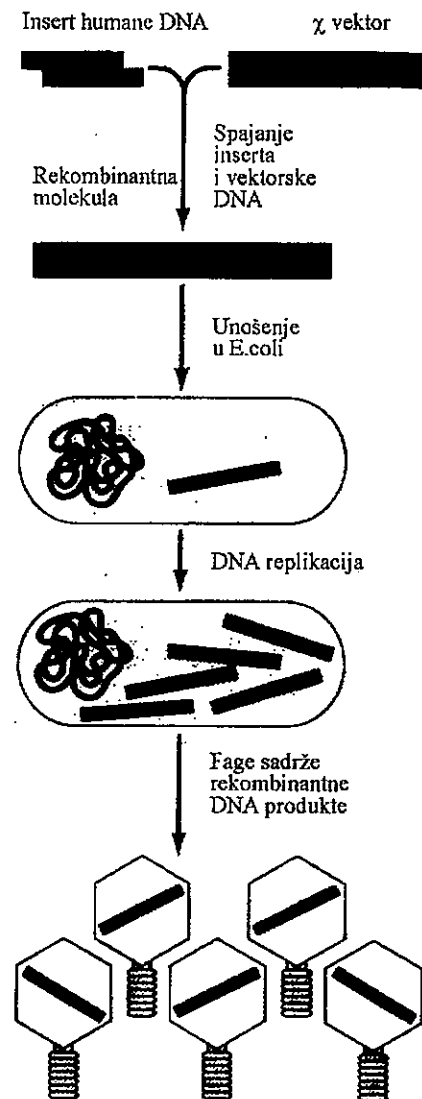
Klasični eksperimenti u području molekularne biologije imali su revolucionaran uspjeh i postavili temelj za razvoj fundamentalnog koncepta o prirodi i ekspresiji gena. Otuda su sve studije bazirane na primarnoj gentičkoj analizi imale velikog uspjeha, što je u velikoj mjeri zavisilo od izbora modela koji je trebao biti jednostavan, sa brzo replicirajućim genomom (kao bakterije, virusi). Međutim, do tada nije bilo jasno koji su fundamentalni principi koji bi mogli dovesti do razumijevanja kompleksnosti genoma eukariotskih ćelija (humano genoma) koji je hiljadu puta složeniji u odnosu na bakteriju E.coli. Ranih 1970. mogućnosti proučavanja takvih genoma na molekularnom nivou bile su ohrabrene pojavom novih metoda i puteva za izolaciju pojedinačnih gena. Prepreka za napredovanje molekularne biologije bila je savladana razvojem rekombinantne tehnologije koja je omogućila naučnicima izolaciju sekvencija i manipulaciju pojedinačnim genom izolovanog iz jednog tipa ćelije. Aplikacija rekombinantne DNA pruža mogućnosti za detaljne molekularne studije strukture i funkcije eukariotskog genoma, time i revolucionarno razumijevanje biologije ćelije.

Proizvođenje rekombinantnih DNA molekula PROČITATI

Osnovna strategija kloniranja molekula je u izdvajanju DNA interesantnog fragmenta (segment humane DNA) i fragmenta DNA nazvane vektor, sposoban da se replicira u ćeliji domaćinu. Rezultat je rekombinantna molekula ili molekula klon, sastavljena od fragmenta humane DNA vezane za fragment vektorske DNA sekvence (sl. 4.1). Veliki kvalitet rekombinantne DNA je u sposobnosti replikacije u ćeliji domaćinu in vitro. Naprimjer, fragment humane DNA može biti kloniran u bakteriofagu lambda (fag služi kao vektor-prenosnik). Rekombinantne molekule mogu biti unijete i u bakteriju E.coli, gdje se efikasno repliciraju dajući milione potomaka faga koji sadrže humane DNA

fragmente. DNA fage mogu da se izoluju zajedno sa rekombinantnim molekulama koje, opet, sadrže pojedinačne fragmenete humane DNA. Svi ovi procesi odvijaju se kroz niz visokosloženih i sofisticiranih metoda, kao što su: metoda fragmentiranja, hibridizacije ili vezivanja fragmenata, metoda kloniranja zatim identifikacije, izolacije i selekcije klonirane DNA i, na kraju, metoda sekvenciranja i mapiranja kloniranih gena. Ovi fragmenti reprezentiraju 100.000 dio humanog genoma. Prije svega, fragment može biti lako izdvojen od vektorske DNA pomoću enzima restriktivne endonukleaze procesom elektroforeze, nakon čega se dobiva čist fragment humane DNA što omogućava dalju analizu i manipulaciju.

Slika 4.1 Proizvođenje rekombinantnih DNA molekula. Fragment humane DNA se poveže sa fragmentom vektorske DNA (lambda vektor). Rezultat je rekombinovana molekula koja se unosi u *E.coli*, gdje se replicira i daje rekombinantno potomstvo faga koje sadrži insert humane DNA. (Prema Cooper, M.G.:*The Cell*. Boston, 2000.)



Fragmentiranje DNA i restriktivne endonukleaze

DNA fragmenti korišteni za dobijanje rekombinantnih molekula se obično dobivaju pomoću enzima restriktivnih endonukleaza. Ti enzimi se izoliraju iz različitih vrsta bakterija, oni prepoznaju određeni slijed parova bazua u dvolančanoj DNA i na tom mjestu cijepaju fosfordiesterske veze između nukleotida dajući fragmente različitih dužina. Postoji polimorfizam u dužini restriktivnih fragmenata. Neke restriktivne endonukleaze lome DNA lanac na istoj visini dajući fragmente ravnih krajeva. Druge lome jedan lanac na jednom,

a drugi lanac na drugom mjestu, nekoliko baza dalje dajući fragmente različitih dužina. Za fragmentiranje strane DNA (one koju želimo klonirati, naziva se strana DNA, jer nije srodna niti sa vektorskom DNA niti sa ćelijskom u kojoj će se reprodikovati) i vektorske DNA najprikladnija je restriktivna endonukleaza koja proizvodi jednolančane fragmente sa komplementarnim krajevima.

Tabela 4.1 Karakteristike nekih restriktivnih endonukleaza

Ime enzima	Izgovor	Organizam iz kojeg je izolovan	Prepoznavanje sekvenci i mjesto presjecanja	Broj presjeka	
				λ	pBR322
BamHI	"bam-H-jedan"	Bacillus amyloliquefaciens H	5'GGATCC3 3'CCTAGG'5	5	1
EcoRI	"eco-R-jedan"	E.coli RY13	GAATC CTTAAG	5	1
HindIII	"hin-D-tri"	Haemophilus influenza Rd	AAGCTT TTCGAA	6	1
PstI	"P-S-T-jedan"	Providencia stuartii	CTGCAG GACGTC	18	1
HaeIII	"hay-tri"	Haemophilus egyptius	GGCC CCGG	50	22

Prema Russel, P.J. Genetics.

Restriktivne endonukleaze se razlikuju ne samo po specifičnom slijedu baza koji prepoznaju i sijeku već i po broju lomova koje proizvode. Npr. restr. Endonukleaza HaeIII u DNA plazmidu pBR322 pravi 22 prekida, u DNA bakterijskog virusa lambda 50 prekida a u DNA onkogenog virusa SV40 19 prekida. U sva tri sličaja restriktivna endonukleaza HaeIII prepoznaje specifični slijed baza G-C tj. C-G kojeg presjeka.

Postoje dvije vrste restriktivnih endonukleaza. Jedne prepoznaju specifične nukleotide DNA, ali nakon toga sijeku nespecifične parove nukleotida, nešto dalje od specifične sekvence. Ove nukleaze nisu pogodne za konstrukciju i analizu rekombinantne DNA. Druge rest. nukleaze, također, prepoznaju specifične sekvence DNA i u ovom slučaju prave prekide tih sekvenci DNA.

Restriktivne endonukleaze su brojne (tabela 4.1), izoliraju se iz raznih vrsta bakterija, pa imaju svoje ime koje obuhvata: ime bakterije i soja iz kojeg se izoluju, oznaku slijeda baza kojeg prepoznaju u DNA i presjecaju, naprimjer:

Eco (vrsta) RI (rod) i GA (slijed baza) (tabela 4.1. Ne samo DNA, također, i RNA sekvence mogu biti klonirane. Prvi korak je sinteza DNA kopija RNA i upotrijebljeni enzim reverzna transkriptaza. DNA produkt (nazvan cDNA, jer je komplementaran sa RNA i upotrijebljen kao šablon) može biti vezan za vektorsku DNA, dobija se rekombinantna molekula koja služi za dalju manipulaciju.

VEKTORI ZA REKOMBINANTNU DNA VIRUSNI VEKTORI

Upotrebljavaju se dvije vrste vektora za rekombinantnu DNA u procesu kloniranja, to su viralni i plazmitski vektori. Vektori za prenos rekombinantne DNA u sisarske ćelije su isključivo viralnog porijekla. Svaki virus koji sadrži DNA može poslužiti kao osnova za konstrukciju vektora. Bakteriofag lambda, virus koji inficira bakterije E.coli, najčešće se upotrebljava za konstrukciju viralnih vektora.

Klonovi bakteriofaga lambda se dobiju tako što se suspenzija inficiranih bakterija zasadi zajedno sa neinficiranim bakterijama. Na površini čvrstog hranilišta pojavljuje se mutni sloj koji nastaje razmnožavanjem neinficiranih bakterija. Opet, plakovi nastaju razmnožavanjem inficiranih bakterija koje se liziraju i tako oslobadaju nove bakteriofage koje šire dalje infekciju.

Fragmenti humane DNA veličine oko 15kb mogu se uspješno ugraditi u izolovane fagne partikule tj. lambda vektor, potom pomiješati sa DNA i proteinima lambda faga (ugradeni ekstrakt) in vitro. Potom se fagne partikule upotrijebe za infekciju kulture E.coli. Svaka rekombinantna fagna forma je jedan plak i nosi insert humane DNA koji može biti izolovan. Rekombinantne fage nose partikule gena interesantne za identifikaciju hibridizacijom ili drugim skrining testovima, o čemu u sljedećem dijelu.

Od vektorske DNA se traži da se autonomno replicira, da se jednostavno može izolirati da se njezini klonovi lako mogu prepoznati. Virus lambda ispunjava ove uslove. Od virusa lambda može se konstruisati vještački vektor čiju osnovu čini majmunski virus SV40, građen još od plazmitske DNA, ćelijske DNA i fragmenata DNA ćelija kvasca.

Plazmitski vektori

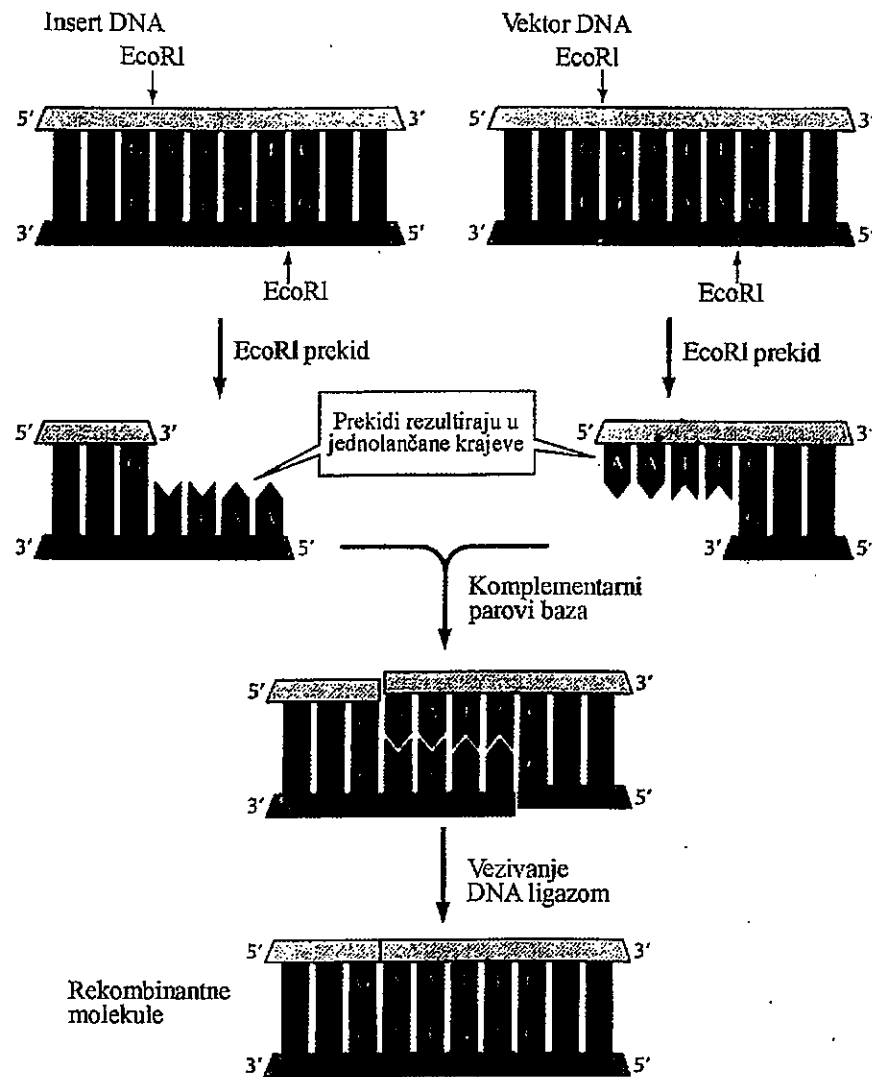
Plazmidi su dvolančane cirkulatorne molekule DNA. Po veličini su različiti, sadrže od 100 do 30.000 p.b. Bakterijskog su porijekla, ali se repliciraju nezavisno od bakterijske DNA. Pojedine vrste bakterija sadrže stotine njihovih primjeraka.

Nisu neophodni za život bakterija, ali im daju neka nova svojstva kao npr. gene za sintezu faktora koji povećavaju virulentnost bakterija, gene za sintezu novih površinskih antigena, gene za toksine i bakteriocine kao i gene koji bakterije čine otpornim na neke antibiotike.

Glavni razlozi zbog kojih se plazmidi koriste kao vektori u procesu kloniranja gena su: sposobnost da se autonomno repliciraju, pa mogu razmnožavati stranu DNA ako je u sebi nose, lako se u toku izolacije izdvajaju od fragmenata bakterijske DNA, jer se od nje razlikuju po obliku, veličini i homogenosti i otkrivaju u bakterijama, jer im daju neka nova svojstva prethodno nabrojana. Pored navedenih svojstava, plazmidi kao vektori moraju zadovoljiti još neka svojstva, kao npr. kada se spoje sa fragmentom strane DNA, moraju zadržati sposobnost autoreprodukcije i sposobnost da daju novo selektivno svojstvo bakteriji, moraju u svom hromosomu imati jedinstvena mjesta koja prepoznaje restriktivna endonukleaza i, na kraju, moraju imati svojstvo koje omogućava otkrivanje i selekciju rekombinantne DNA. Sva ova svojstva ne posjeduje ni jedan prirodni plazmid, zato se konstruišu vještački vektori. Konstruišu se od fragmenata različitih plazmida, viralne DNA i ćelijske DNA. Vještački konstruisani plazmitski vektor koji se najčešće upotrebljava je vektor pBR322. Konstruisan je od četiri fragmenta koji potiču od četiri prirodna plazmida. Odlikuje se time što posjeduje dva genska mjesta koja bakteriji daje sposobnost otpornosti na antibiotike amplimicin (Ap) i tetraciklin (Tc). Presjeca ga nekoliko restriktivnih nukleaza na specifičnim mjestima koja se mogu unaprijed izabrati. Kada se rekombinantna DNA ugradi na mjesto koje je prekinula restriktivna endonukleaza, gdje se inače nalazi gen za npr. tetraciklin, ta regija genoma, otporna na tetraciklin, bit će inaktivirana. Proces se naziva insercijska inaktivacija. Inače, to je i metoda za prepoznavanje rekombinantne DNA.

POVEZIVANJE FRAGMENTA I ODABIR FRAGMENTA DNA ZA KLONIRANJE

Povezivanje fragmenata strane DNA i vektorske DNA je enzimatski proces i moguć je samo ako obje DNA imaju komplementarne jednolančane krajeve, (sl. 4.2) koji se spontano spajaju. Enzimi kojim se koriste za spajanje fragmenata su iz grupe ligaza. Najčešće se koristi enzimom ligaza T4, izolovanom iz bakterije E.coli. Ovom ligazom moguće je pomoću kofaktora spojiti potpuno ravne krajeve fragmenata. Zato su najpogodnije endonukleaze koje sijeku jednolančane krajeve. Nakon fragmentiranja za kloniranje mogu se upotrijebiti ili cijeli fragmenti ili se fragmenti fracioniraju da bi se dobio smanjen broj klonova koje treba pretražiti i analizirati. Fragmenti DNA međusobno se razlikuju po fizičkim svojstvima. Ove se razlike koriste za fracioniranje. Najjednostavnije je fragment DNA fracionirati prema veličini metodom elektroforeze.



Slika 4.2 Povezivanje DNA molekula Vektor i insert humane DNA se presijekom restriktivnom endonukleazom (kao Eco RI-CT). Vektorska i DNA inserti se kovalentno povežu preko komplementarnih baza uz enzim DNA ligazu u rekombinantnu molekulu. (Prema Hames, B. D. and Glover, 1995.).

UNOŠENJE REKOMBINANTNE DNA I KLONIRANJE

Proces unošenja rekombinantne DNA u ćeliju domaćina da bi se u njoj reprodukovala, zavisi od toga da li se radi o prokariotskoj ili eukariotskoj ćeliji kao domaćinu. Ukoliko se rekombinantna DNA unosi u bakterijsku ćeliju da bi se klonirala, koriste se, prije svega, plazmitski vektori za povezivanje fragmenata, a

za unošenje koristi se metodom transformacije. U drugom slučaju koriste se virusni vektori za povezivanje fragmenata, a unošenje rekombinovane DNA se odvija metodom transfekcije. U prvom slučaju ćelije se prebace iz pufera u tekuće hranilište, nakon izvjesnog vremena zasade se na čvrstu selektivnu podlogu da bi se otkrili transformisani klonovi. U slučaju transfekcije ćelije se direktno iz pufera zasade na čvrsto hranilište po metodi dobivanja plakova (prethodno opisana). Kloniranje rekombinantne DNA i njeno razmnožavanje moguće je kako u prokariotskim tako u eukariotskim ćelijama (sisara, kvasca itd.). Od početka razvoja tehnologije genetskog inženjeringa bakterije E.coli upotrebljavaju se kao organizmi za kloniranje rekombinantne DNA, jer su: apatogene, brzo se razmnožavaju na podlogama i najviše se zna o njihovom genomu i plazmidima. Membrane ćelija E.coli nisu propusne za molekule DNA, postupak za postizanje propustljivosti se postiže dodavanjem kalcijevih jona u pufer u kojem se ćelije drže 24 sata na 60C stepeni. Bolja propustljivost se postiže ireverzibilnim oštećenjem membrane bakterija. Neke bakterije su, kao, Bacillus subtilis propusne za rekombinantne molekule DNA, pa se često upotrebljavaju za kloniranje. Od eukariotskih ćelija najčešće se koriste za kloniranje DNA ćelije kvasca, brzo se uzgajaju, slične su ćelijama sisara po hromosomima, po regulaciji genske ekspresije, po postsintetskoj obradi iRNA i postsintetskoj obradi proteina. Ćelije sisara upotrebljavaju se u obliku trajnih kultura. Ćelije potiču od laboratorijskih životinja ili su humanog porijekla. Razvijene su tri metode za ugrađivanje gena stranog porijekla, tj. rekombinantne DNA u ćelije sisara. Dvije metode uključuju izlaganje velikog broja ćelija sisara nekoj infektivnoj (virusnoj) DNA i izdvajanje onih ćelija koje su ugradile rekombinantnu DNA sa željenim genom i aktiviralega. Treća metoda ugrađivanja rekombinantne DNA u ćelije sisara sastoji se u tome da se jedna ili nekoliko molekula rekombinantne DNA injicira direktno u jedro ćelija sisara, nakon čega se uzgaja populacija tih ćelija. Iz te populacije izdvajaju se one ćelije koje su ugradile rekombinantnu DNA za izolaciju i analizu kloniranog gena.

PREPOZNAVANJE, SELEKCIJA I IZOLACIJA KLONIRANOG GENA

Krajnji je cilj tehnologije genetskog inženjeringa ispitivanje, analiza strukture i funkcije nekog unaprijed izabranog gena ili njegovog proteina. Najjednostavnija metoda za pronalazenje, izoliranje klonova je metoda pozitivne genetske selekcije. Rekombinantna DNA se unosi u bakterije koje su, inače, mutanti za sintezu određenog proteina (nema sinteze tog proteina). Nakon što se bakterije mutanti zasade na podlogu, na podlogama izrastaju mutanti, ali jedan dio njih počinje da sintetiše deficitni protein. To su, zapravo, one bakterijske ćelije koje su ugradile rekombinantnu DNA koja je nadomjestila mutirani gen, što je istovremeno znak za prepoznavanje rekombinantne DNA i njenog prisustva. Jedna od često upotrebljivanih metoda za prepoznavanje i

selekciju klonirane DNA je pomoću vještački konstruisanog vektora pBR322, tj. metoda insercijske sekvencije, prethodno opisana. Danas se koristi čitavim nizom visokodiferenciranih metoda, ali svaka metoda za prepoznavanje i selekciju kloniranih gena zasniva se na upoređivanju fizičkih karakteristika fragmenata klonirane DNA i roditeljske DNA (veličina, gustoća i komplementarnost baza).

DNA SEKVENCIRANJE

Karakteriziranje kloniranih fragmenata strane DNA dovodi se do kraja sekvenciranjem. Pod sekvenciranjem podrazumijeva se slika rasporeda specifičnih lokacija sekvenci nukleotida u datom području gena. I upravo molekularno kloniranje podrazumijeva izolaciju pojedinačnih fragmenata DNA za detaljnu karakterizaciju uključujući determinaciju i sekvenciranje nukleotida. Zapravo, determinacija nukleotid sekvenci mnogih gena objašnjava ne samo strukturu proteinskih produkata, osobine DNA sekvenci već i regulaciju genske ekspresije.

Današnje metode DNA sekvenciranja su brze i precizne u najvećem broju molekularnih bioloških laboratorija. Daleko lakše se u kloniranoj DNA, tj. u njenim sekvencama određuju amino kiseline, tj. sekvence za proteine. Slično nukleotid sekvencama gena lako se prenose aminokiselinske sekvence za kodiranje proteina. Lakši je put determinacije sekvenci kloniranih gena, te prema tome i protein sekvenci. Najviše novih metoda se bazira na terminaciji DNA sinteze, što rezultira uključanjem lanac-terminacionih dideoksinukleotida (Sangerova "dideoksi"-metoda) koji nemaju hidroksilnu grupu na položaju 3 prim. Otuda DNA sinteza započinje time da jedan kraj može biti označen radioizotopom. Sintetišu se radioaktivni lanci različitih dužina. Fragmenti DNA se odvajaju po veličini gel-elektroforezom, a autoradiografskom metodom određuje se udaljenost pojedinih radioaktivnih lanaca od njihovog polazišta.

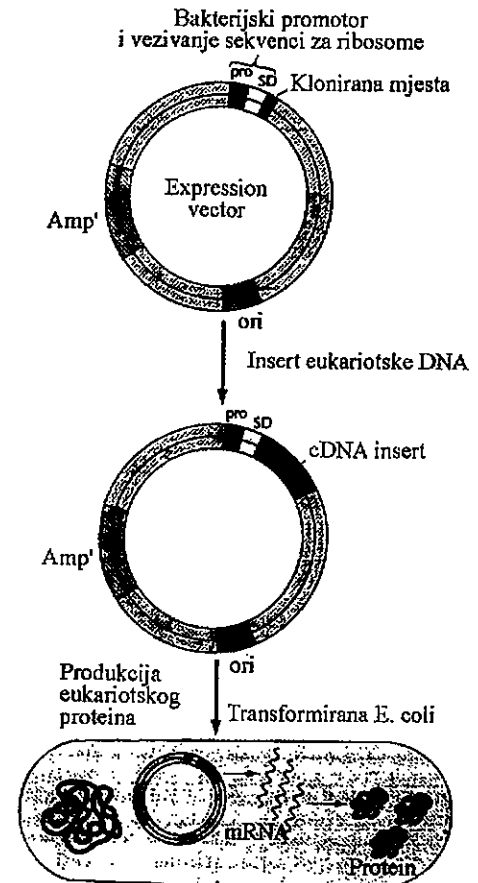
Veličina svakog lanca-fragmenta je određena terminalnim (krajnjim) dideoksinukleotidom. Sintaza novog lanca DNA izvodi se u četiri reakcijske mješavine. Svaka od njih sadrži kalup DNA, enzim polimerazu i sva četiri deoksinukleozidtrifosfata (A, T, G, C) od kojih jedan obilježen radioaktivnim fosforom na položaju alfa. Kako nema hidroksilne skupine na položaju 3 prim (hidroksilna skupina se upotrebljava za dodatak sljedećeg nukleotida), rast novog lanca će se prekinuti kada se na njega ugradi jedan od dideoksi-analoga. Dobija se velika skala DNA sekvenci različitih dužina upotrebom sistema koji se koristi fluorescentnim oznakama u dideoksinukleotid reakcijama sekvenciranja, što rezultira emitovanjem svjetlosti, potom detekcija fotomultiplerom što se skuplja kompjuterski, analizira i datira. Ovaj tip automatskog DNA sekvenciranja omogućava-daje veliku skalu analiza potrebnih za determinaciju kompletnog sekvenciranja bakterija, kvasca, Drosophile i kompletnog sekvenciranja humanog genoma.

EKSPRESIJA KLONIRANIH GENA

Mogućnost određivanja sekvenciranjem nukleotida kloniranih gena, kao i sekvenci amino kiselina za proteinske produkte molekularnim kloniranjem, pruža mogućnost da se dobije velika količina proteina za strukturnu i funkcionalnu karakterizaciju. Mnogi proteini su prezentirani samo u maloj količini u eukariotskim ćelijama i, prije svega, ne mogu biti prečišćeni u dovoljnoj količini konvencionalnim biohemijskim tehnikama. Međutim, kloniranjem gena pomoću konstruisanih vektora moguće je dobiti visoki nivo proteina (ekspresije gena) u jednoj ili drugoj bakterijskoj ćeliji ili eukariotskoj ćeliji. Ekspresija eukariotskih gena sa klonirane cDNA i viralnog vektora (nazvan ekspresioni vektor) dešava se transkripcijom i translacijom u bakterijskoj ćeliji, npr. E.coli (sl. 4.3). Količina proteina kloniranog gena koji je prenijet korespondira u više od 10% od ukupne količine bakterijskog proteina. Prečišćena količina kodiranog proteina od kloniranog gena je dovoljna za proučavanje biohemijskih i strukturnih svojstava proteina. Obično je veći nivo ekspresije kloniranih gena u eukariotskim nego u bakterijskim ćelijama.

Slika 4.3 Ekspresija kloniranih gena Ekspresorni vektor obuhvata promotor sekvence (pro) za direktnu transkripciju inserta DNA u bakteriji i sekvence potrebne za vezanje rRNA sa bakterijskim ribosomima. (Shine-Delgarno (SD) sekvence)

Za ekspresiju kloniranih gena tj. produkciju proteina u eukariotskim ćelijama često se koristi sistemom infekcije virusima, npr. ćelije insekata sa bakulovirusom koji služi inače kao vektor. Ispoljen je visoki nivo ekspresije gena ugrađenih na mjesto viralnih strukturalnih gena. Na taj način može biti postignut visoki nivo produkcije proteina kloniranih gena zavisno od upotrebe pogodnih viralnih vektora za sisarske ćelije.



AMPLIFIKACIJA KLONIRANE DNA UPOTREBOM PCR METODE

PROČITO

Molekularno kloniranje omogućava umnožavanje pojedinačnih fragmenata DNA u velikim količinama i njihovo izolovanje iz bakterija metodom PCR (reakcijom enzima polimeraze dobijaju se lanci DNA). Esencijelno za ovu metodu je upotreba enzima DNA polimeraze pomoću koje se postiže replikacija definitivnih segmenata DNA. Broj DNA molekula se povećava eksponencijalnom jednačinom udvajajući se u svakom krugu replikacije. Na ovaj način se dobija suštinska količina DNA od malog broja inicijalnih šablonskih kopija. Naprimjer, jednostruka DNA molekula ampificira 30 ciklusa replikacija, teoretski 230 (aproksimativno 1 bilion) potomaka molekula.

Ovom metodom moguća je detekcija malih količina (molekula) DNA i RNA polazeći od vrlo malih količina početnog ekstrakta pojedinačnih ćelija. Ovako izvanredna osjetljivost PCR metode je vrlo važna za različite aplikacije uključujući analizu genske ekspresije u ćelijama koristeći se samo malim količinama DNA.

Prije svega, metodom PCR moguće je selektivno umnožiti DNA molekule iz kompleksa mješavine DNA i RNA. Dakle, PCR metoda omogućava izolaciju i amplifikaciju specifičnih fragmenata DNA in vitro, a PCR amplifikacija može biti upotrijebljena i u detekciji specifičnih DNA i RNA molekula.

TEHNOLOGIJA REKOMBINANTNE DNA DOVELA JE DO REVOLUCIJE IZUČAVANJA ĆELIJA

PROČITO

Pomoću relativno standardne tehnologije genetskog inženjeringa moguće je uzgajati neograničeni broj rekombinanata u bakterijama koji proizvode bjelančevine nebakterijskog porijekla. Ako rekombinantni gen sadrži informaciju za sintezu bjelančevina koje su važne sa biohemijskog, ekonomskog i biomedicinskog gledišta (kao inzulin, interferoni i drugi), moguće je na ovaj način dobiti neograničene količine hemijski potpuno čiste odgovarajuće bjelančevine. Najbrži način umnožavanja (bilioni primjeraka) i ispitivanja malih količina DNA molekula je metodom PCR. Ove tehnologije daju neslućene mogućnosti od proučavanja gena do tehnologije transgena u životinje do kloniranja gena.

Zahvaljujući ovim tehnikama, moguće je industrijski proizvoditi proteine neophodne u liječenju bolesti, koji su se nekada mogli dobiti samo prečišćavanjem iz životinjskih tkiva. Tako je gen za somatostatin hemijski sintetisan, zatim kloniran u E.coli, te je iz njih dobiven funkcionalan hormon. Ovom tehnologijom klonirani su geni za humani inzulin, hormon rasta, interferone i drugi koji imaju veliki značaj za medicinu, prenatalnu dijagnostiku i terapiju genima u perspektivi. To je samo jedan pravac i mogućnost upotrebe tehnologije genetskog inženjeringa.

5

SINTEZA I OBRADA RNA

Lanac RNA kao i DNA sastavljen je od četiri nukleotida. Činjenica koja ukazuje da se genetska informacija sadržana u lancu DNA prenosi na komplementarne redoslijede nukleotida u RNA. Prema ovoj hipotezi, heliks DNA se u jednom ili više stadijuma u toku ćelijskog ciklusa razdvaja i služi kao matrica na koju se privlače komplementarni ribonukleotidi. Sparivanje je slično kao kod DNA (adenin sa timinom odnosno uracilom, a guanin sa citozinom). Ova činjenica ukazuje da mora da postoji neki mehanizam koji određuje koji će od razdvojenih lanaca DNA služiti kao matrica za transkripciju komplementarnog lanca RNA (sl. 5.1).

PROCES TRANSKRIPCIJE

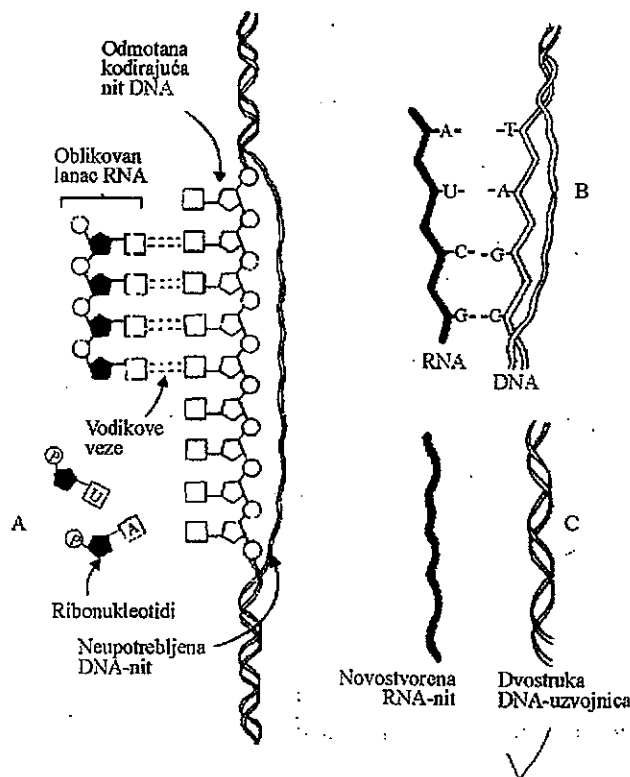
Osnovni i odgovorni enzim za RNA sintezu jeste RNA polimeraza koja katalizuje polimerizaciju ribonukleotida 5prim-trifosfata (NTPs) direktno sa DNA matrice. RNA polimeraza ima vrlo složenu strukturu. Aktivni oblik enzima ima pet različitih polipeptidnih lanaca koji čine tijelo enzima. Između lanaca ne postoje kovalentne veze. Faktor sigma ima ulogu da duž molekule DNA prepozna promotor i veže se za njega. Nakon što lanac RNA počne da raste sigma faktor se odvaja od tijela enzima i DNA. Svi normalni lanci RNA počinju bazama adenin ili guanin. To ukazuje da je prva baza koja se prepisuje sa DNA pirimidinska (timin ili citozin). Postoje i stop signali na RNA polimerazi, čija je uloga da završe sintezu RNA na specifičnom mjestu na DNA matrici. Prepoznavanje ovih signala vrši jedan specifičan protein ili omega faktor (sl. 5.1).

Sinteza RNA je slična sintezi DNA i RNA polimeraza je, također, slična DNA polimerazi i ona katalizuje rast RNA lanca, uvijek u smjeru 5prim-3prim.

Zapravo, faza inicijacije transkripcije započinje de-novo na specifičnim mjestima na DNA. Inicijalni proces je vrlo važan, jer to je prvi korak u regulaciji transkripcije sa DNA matrice, tada sigma faktor RNA polimeraze prepoznaje, a zatim se vezuje za određeni slijed sekvenci DNA -označen kao *promotor*. Time se

završava inicijalni proces i rast lanca može da započne. Promotor, kako smo naveli, čini slijed sekvenci prvobitno identificiranih upoređivanjem serije nukleotidnih sekvenci različitih gena izolovanih iz E.coli. Ova poredenja su otkrila da je region promotora uzvodno od inicijalnog mjesta transkripcije i da ga čine dva seta sličnih sekvenci u različitim genima. Ove grupe sekvenci uključuju po šest-sedam nukleotida sa 10-35 p.b. uzvodno od transkripcionog start mjesta. Označene su sa -10 i -35 elementi. Sekvence u poziciji -10 i -35 nisu identične u raznim promotorima, ali konzensusom sekvenci korenspondiraju u osnovi sa najfrekvencijama bazama nadenih u različitim promotorima. Ovi elementi označavaju i relativni položaj inicijalnog mjesta transkripcije, koje je definisano kao +1 pozicija. To su grupe sekvenci koje sigma faktor RNA polimeraze prepoznaje i za koje se vezuje (start mjesto ili +1 pozicija).

Tim momentom se inicira sinteza RNA lanca. Sigma faktor se odvaja, a tijelo enzima nastavlja da strukturiše lanac (faza elongacije ili rasta RNA lanca). U ovoj fazi tijelo enzima oslobođeno sigma faktora kreće se u pravcu rasta poliribosomalnog lanca (5prim-3prim) i to tako što se na položaju 5prim šećera riboze vezuje sa položajem 3prim svaki sljedeći nukleotid. Brzina vezivanja nukleotida je vrlo velika, oko 500-1500 baza u minuti.



Slika 5.1 Transkripcija RNA sa matrice DNA (A) Sinteza ribonukleinskog lanca sparivanjem sa komplementarnim bazama DNA. (B) Novosintetisana RNA. (C) Novosintetisani lanac RNA i ponovno vezivanje dvaju lanaca DNA u dvostruku uzvojnica.

Nakon što se sintetiše lanac RNA terminacioni signal RNA polimeraze, čija je tačka transkripcije stop označava odvajanje RNA polimeraze od matrice DNA. U ovoj fazi (terminacije) omega faktor RNA polimeraze se vezuje za specifične DNA sekvence i time direktno djeluje na DNA i na konfiguraciju enzima (disocira ga), čime se zaustavlja proces transkripcije RNA lanca određene dužine, ovisno o vrsti RNA. U svakoj ćeliji sintetišu se tri vrste RNA: informaciona ili iRNA (ili mesendžer RNA), transportna RNA ili tRNA (ili solubilna RNA) i ribosomalna RNA ili rRNA (Tijan, R.1994.)

EUKARIOTSKA RNA POLIMERAZA I OPŠTI TRANSKRIPCIONI FAKTORI

RNA polimeraza

Razlikuju se tri vrste nuklearnih RNA polimeraza koje transkribuju različite grupe gena (klase) (tabela 5.1). Polimeraza II transkribuje informacionu RNA (iRNA). Polimeraza I i III transkribuju ribosomalnu RNA (rRNA) i transportnu RNA (tRNA). Polimeraza I transkribuje RNA sa koeficijentima sedimentacije u toku centrifugiranja: 28S, 18S i 5, 8S. Polimeraza III uglavnom transkribuje tRNA i male ribosomalne kao 5S RNA ili male RNAs ugrađene u splajsing komplekse (snRNAs i scRNAs). Polimeraza III je nadena i u mitohondrijama i hloroplastima i slična je bakterijskoj RNA polimerazi. Sve tri nuklearne polimeraze su kompleks enzima koji sadrži od 8 do 14 različitih subjedinica. Također, prepisuju različite promotor grupe gena sa DNA.

X Opšti transkripcioni faktori i inicijacija transkripcije polimerazom II

Kako RNA polimeraza II transkribuje iRNA koja prenosi informaciju o redosljedu nukleotida sa DNA na redosljed amino kiselina u procesu sinteze polipeptidnog lanca, to je najviše proučavana (Buratowski, 1994.) grupa specifičnih proteina koja inicira transkripciju (faza inicijacije) označena je kao *transkripcioni faktori*. Definisana su dva opšta tipa transkripcionih faktora. Opšti transkripcioni faktori su uključeni u transkripciju polimerazom II Inicirajući promotor, a prije svega, čineći osnovni dio transkripcione "mašinjerije". Primjeri transkripcionih faktora i mjesta vezivanja za DNA prikazani su u tabelama 5.1 i 5.2. Transkripcioni faktori vezujući se za DNA sekvence kontrolišu ekspresiju pojedinačnih gena i odgovorni su za regulaciju genske ekspresije.

Za inicijaciju transkripcije polimerazom II potrebno je pet opštih transkripcionih faktora. Promotori mnogih gena DNA koje transkribuje polimeraza II sadrže sekvence slične TATAA (timin, adenin, timin, adenin, adenin) sa 25-30 nukleotida uzvodno prema transkripcionom start mjestu, nazvane *TATAA box*.

Prvi korak u formiranju transkripcionog kompleksa je vezivanje opšteg transkripcionog faktor TFIIID za TATAA box (TF označava transkripcioni faktor; II označava polimerazu II). TFIIID je sastavljen od multiplih subjedinica uključujući TATAA-boks i vezane proteine (TBP) čije je vezivanje specifično za TATAA konzensus sekvence i 10-12 drugih polipeptida označenih TBP-faktori (T-timin, B-vezani, P-proteini) vezivanja. TBP faktor se potom vezuje za opšti transkripcioni faktor (TFIIB) formirajući TBP-TFIIB kompleks. TFIIB faktor služi kao most za vezivanje promotora na DNA i enzima RNA polimeraze i za vezivanje kompleksa TBP-TFIIB sa trećim faktorom TFIIF. Ovaj faktor ima dvije važne uloge. Prvo, dvije subjedinice TFIIF su heliksi koji mogu odmotati DNA oko inicijalnog mjesta. Drugo, subjedinice TFIIF su protein kinaza koja fosforilizira ponovljene sekvence prisutne u C-terminalnom području. velike jedinice RNA polimeraze II. Fosforilizirane sekvence oslobođene-otpuštene od polimeraze vezuju se sa inicijacijskim kompleksom omogućavajući produžavanje-rast RNA lanca duž matrice DNA (faza elongacije). Djelimično transformisan kompleks RNA polimeraze II u TFIIB, TFIIE, TFIIF i TFIIF i drugi transkripcioni regulatorni proteini otkriveni su i u kvasca i u drugim sisarskim ćelijama.

Transkripcija polimerazom I i III

Prije svega, tri različite polimeraze u eukariotskim ćelijama prepoznaju posebne tipove promotora. Zajednički transkripcioni faktori TATAA, vezani proteini (TBP) potrebni su za inicijaciju transkripcije za sva tri enzima; RNA polimeraza I transkribuje ribosomalne gene u tandemima od 45S-pře rRNA do 28S, 18S i 5, 8S rRNAs. Promotor na DNA za rRNA sadrži oko 150 p.b. na transkripcionom mjestu. Promotor-sekvence DNA sadrže dva transkripciona faktora UBF (uzvodno vezani faktori) i SL1 (sekventni faktor) koji je kooperativan sa promotorom i polimerazom za inicijaciju transkripcije. SL1 transkripcioni faktor je sastavni dio protein subjedinice TBP. Promotor ribosomalnih gena ne sadrži TATA boks sekvence, pa se TBP kompleks ne vezuje u tom slučaju.

Polimeraza III je uključena u sintezu tRNAs, 5SrRNA i neke male RNAs uključujući i splajsing. TFIIF transkripcioni kompleks inicira i vezuje se za specifične sekvence DNA. U procesu transkripcije 5SrRNA za promotor DNA vezuju se faktori TFIIF, TFIIB i polimeraza III. Transkripcioni kompleks TFIIF se direktno vezuje za tRNA gene uključujući i TFIIB i polimerazu.

Tabela 5.1 Klase gena koje prepisuje RNA polimeraza

Tip sintetisane RNA	RNA polimeraza
Nuklearni geni	
i(m)RNA	II
tRNA	III
rRNA 5.8S, 18S, 28S	I
5S	III
snRNA i scRNA	II i III ^a
Mitohondrijalni geni	Mitohondrijalna ^b
Hloroplastni geni	Hloroplast ^b

^a - Neke male nuklearne (sn) i male citoplazmatske (sc) RNAs transkribuje polimeraza II a druge polimeraza III.

^b - Mitohondrijalna i hloroplasta RNA polimeraza je slična bakterijskom enzimu.

Tabela 5.2 Primjeri transkripcionih faktora i mjesta vezivanja za DNA

Transkripcioni faktor	Odgovarajuća mjesta vezivanja
Specifični protein 1 (Sp1)	GGGCGG
CCAAT/Enhancer vezani protein (C/EBP)	CCAAT
Aktivator protein 1 (AP1)	TGACTTCA
Oktamer vezanih proteina (OCT-1 i OCT-2)	ATGCCCAAAT
E-područje vezanih proteina (E12, E47, E2-2)	CANNTG _a

^aN mjesto za neke proteine

Cis-aktivnosti regulatornih sekvenci: Promotori i enhancers sekvence

Cis-aktivnost regulatornih sekvenci u eukariotskim genima je slična u bakterija. Transkripcioni geni uz RNA polimerazu imaju dvije jezgre promotor elemenata TATA box i iRNA sekvence služe za specifično vezivanje transkripcionih faktora. Drugo, cis-aktivne sekvence su mjesto za vezivanje različitih regulatornih pojedinačnih gena koji kontrolišu gensku ekspresiju. Ovi cis-regulatori su često, ne uvijek, lokalizovani u TATA box. U sisarskim ćelijama kontrolne regulatorne sekvence lokalizovane su van transkripcionog startnog mjesta. Ove sekvence su nazvane *enhancers*, prvi puta ih je identifikovao Walter Schaffner 1981. proučavanjem promotora virusa SV40. Enhancers sekvence, slično promotorima funkcionišu pri vezivanju transkripcionih faktora, a potom RNA polimeraze. Ovo je moguće, jer specifični transkripcioni faktori su na granici sa enhancer sekvencama i mogu biti u interakciji s opštim transkripcionim faktorima promotora. Specifični transkripcioni regulatorni proteini su odgovorni za kontrolu genske ekspresije u toku razvoja i rasta i diferencijacije kao, naprimjer, odgovorni faktori rasta ćelije su hormoni.

Struktura i funkcija transkripcionih aktivatora

Najviše su proučavani proteini kao transkripcioni aktivatori koji slično S_{nl} vezuju se za regulatorne DNA sekvence i stimulišu transkripciju. Uopšteno, ovi faktori su nađeni u dva područja (*domains*): jedno područje za vezivanje specifičnih proteina za DNA i drugo područje koje aktivira transkripciju pri interakciji sa drugim transkripciono komplementarnim elementima ove "mašinerije". Transkripcioni aktivatori mogu modulirati proteine primjenom rekombinantne DNA tehnike-dobija se hibridni transkripcioni faktor čija je aktivnost pri vezivanju za promotor ili enhancer sekvence u procesu transkripcije.

Helix-tur-helix protein prvobitno je prepoznat u promotoru prokariotske DNA vezujući za sabe katabolik aktivatore proteine (CAP). U eukariota *helix-tur-helix* proteini obuhvataju *homeodomajnu protejnu* čija je glavna uloga u regulaciji genske ekspresije u embrionalnom razvoju. Aktivacija *domains* proteina stimuliše transkripciju pri interakciji sa opštim transkripcionim faktorima, kao TFIIIB ili TFIIID, i olakšavaju povezivanje transkripcionih kompleksa za promotor u DNA.

Značaj ove interakcije je još u tome što različiti aktivatori mogu vezati različite opšte transkripcione faktore.

Represori u procesu transkripcije

Genska ekspresija u eukariotskim ćelijama je regulisana represorima kao i transkripcionim aktivatorima (proteini). Eukariotski represori su specifične DNA sekvence koje inhibiraju transkripciju. U nekim slučajevima represori ometaju vezivanje transkripcionih faktora na DNA. Naprimjer, vezivanjem za represorne sekvence koje se nalaze u blizini transkripcionog startnog mjesta može blokirati interakciju RNA polimeraze i opštih transkripcionih faktora sa promotorom DNA, što je slično sa aktivnošću u bakterija. Drugi represori se suprotstavljaju aktivatorima u procesu vezivanja za specifične regulatorne sekvence. Regulacija transkripcije represorima je, također, važna kao i regulacija aktivatorima. Važna uloga represora je i u inhibiciji ekspresije tkivnih-specifičnih gena u vidu produkcije neodgovarajućih tipova ćelija. Naprimjer, zabilježena je pojava: represor vezan za mjesto imuno-globin-enhancer sekvencama i usljed supresije transkribuju se nelimfoidni tipovi ćelija. Neki represori imaju ulogu u kontroli ćelijske proliferacije i diferencijacije u reakcijama hormona i faktora rasta.

Hromatinska struktura hromosoma i transkripcija

Veza između hromatinske strukture i transkripcije je evidentna na nekoliko nivoa. Prvo, transkripciono aktivni geni se nalaze u dekondezovanom hromatinu.

U dekondezovanom hromatinu aktivni transkripcioni geni graniče sa histonima smješteni u nukleosomu, tako se transkripcioni faktori i rRNA polimeraza suočavaju sa problemima interakcije, čiji je hromatin drugačiji od gole DNA. Inhibitorni efekti nukleosoma se javljaju pri acetilaciji histona i pri vezivanju nehistskih hromosomskih proteina (nazvani HMG-14 i HMG-17) u nukleosome sa aktivnim transkripcionim genima.

Acetilacija histona je u korelaciji sa transkripciono aktivnim hromatinom u različitim vrstama ćelija. Histoni imaju dva područja (*domains*): jezgro nukleosoma kojeg čini skupina histona (H2A, H2B, H3 i H4) i skupina baza DNA i aminoterminalni dio (*domain*) koji se ispruža (lijevo i desno) van nukleosoma tzv. spone. Acetilacija reducira pozitivnu aktivnost histona, može vezivati histone za DNA, a može ih odvojiti od DNA. Dakle, postoji direktna veza između histona, acetilacije i transkripcijske regulacije.

Modifikacija histona pri acetilaciji povećava dostupnost transkripcionih faktora nukleosomima DNA i ova modifikacija je čvrsta veza u transkripcionoj regulaciji. Histonsku acetilaciju katalizuju enzimi vezujući se sa transkripcionim aktivatorima, nakon čega se histoni deacetilacijom povezuju sa represorima. RNA polimeraza potom transkribuje slobodne nukleosome nakon prekida histon-DNA kontakta. Transkripciju olakšavaju nehistski hromosomalni proteini HMG-14 i HMG-17 koji se specifično vezuju sa aktivnim transkripcionim genima.

DNA metilacija Regulacija genske ekspresije metilacijom ima važnu ulogu u genomu kontrolišući transkripciju nekih gena u procesu razvoja sisara. Metilacija DNA, također, može i inhibirati transkripciju što je direktna posljedica inaktivacije gena metilacijom. Međutim, važna regulatorna uloga DNA metilacije ustanovljena je u fenomenu poznatom kao *genomic imprinting* čija je kontrola ekspresije nekih gena uključena u procesu embrionalnog razvoja sisara. U najvećem broju slučajeva oba roditeljska allele (očev i majčin) u diploidnoj ćeliji imaju svoju ekspresiju. Međutim, mali je broj *imprinting* gena čija ekspresija pripada ocu ili majci, tj. transkripciono je inaktivan samo maternalni allele ili obrnuto, samo paternalni.

Takoder, biološka uloga *genomik imprinting* je neodređena. DNA metilacija se javlja jasno između očevog i majčinog allele *imprinting* gena. Dobar primjer je gen H19 koji se transkribuje samo sa majčine kopije. On se specifično metilira u toku razvoja muškaraca, ali ne i ženskih germinalnih ćelija. Fertilizacijom spermija i jajeta nastaje embrio koji sadrži metilirani očev allele i nemetilirani majčin allele ovog gena. Roditeljski allele H19, prije svega, ostaju metilirani i transkripciono inaktivni u embrionalnim ćelijama somatskog tkiva. Međutim, roditeljski H19 allele postaju demetilirani u germinalnoj liniji dajući stabilne kalupe-uzorke metilacije za prenos u sljedeće generacije.

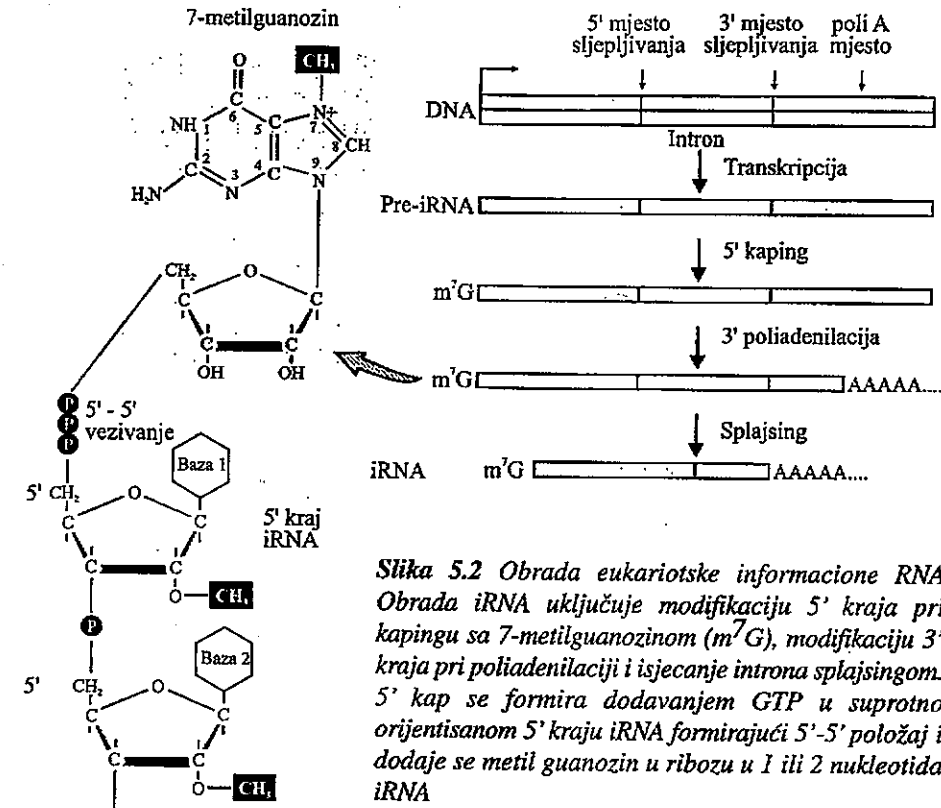
OBRADA RNA

U ćeliji se RNA nalazi u jedru i citoplazmi. Jedrova RNA se nalazi u jedarcetu, ali je ima nešto malo i u hromosomima. U citoplazmi se nalazi u ribosomima, mitohondrijama i hloroplastima. U odnosu na DNA čija je količina ista u svim ćelijama organizma, ukupna količina RNA u ćeliji je promjenljiva. U ćelijama u kojima se sintetišu proteini RNA je velika, a manje je ima u ćelijama bubrega i skeletnih mišića.

Sinteza počinje dosta rano za vrijeme ćelijskog ciklusa, traje sve do kraja profaze. U sintezi RNA učestvuju isti nukleotidsi kao i u sintezi DNA, izuzev što se umjesto timina pojavljuje uracil. Prema tome četiri osnovne baze su: adenin (A), uracil (U), citozin (C) i guanin (G). Postoje i druge bitne razlike, kao npr. umjesto šećera deoksiriboze zastupljen je šećer riboza. Osim toga, lanac RNA je jednostruk i nije spiraliziran. Na osnovu strukture molekula i broja nukleotida u njegovom lancu, te na osnovu funkcije, razlikuje se nekoliko vrsta RNA. Primarni transkripti svih RNA prolaze kroz seriju procesa obrade do zrelih oblika, prije nego se transportuju iz nukleusa u citoplazmu, gdje imaju funkciju u sintezi proteina. Funkcionalno najvažnije i najviše ispitivane su informaciona ili "mesendžer" RNA (iRNA) ribosomalna (rRNA) i rastvorljiva ili transportna RNA (tRNA).

INFORMACIONA RNA (IRNA)

U eukariotskim ćelijama iRNA se sintetiše u nukleusu nakon čega se transportuje u citoplazmu prije nego se uključi u proces sinteze proteina. Prije svega, početni produkt transkripcije ili prekursor - primarni transkript iRNA (pre-iRNA) se prostorno *modifikuje*, tj. postsintetski obradi prije eksporta iz nukleusa. Obrada uključuje modifikaciju oba kraja molekula, kao i uklanjanje introna (nekodirajućih sekvenci) iz sredine. Modifikacija krajeva odvija se tako što se na 5' kraju odbacuju neinformacijski dijelovi (skraćuje se lanac), a dodaje struktura 7-metilguanozin. Stvara se struktura poznata kao *5-kap* (proces kapinga). Međutim, na drugom kraju 3'-OH pre-iRNA dešava se suprotna pojava, postsintetski prekid prim-transkripta, dodavanje polinukleotida i formiranje 3' *poly-A-repa* (tail) proces nazvan *poliadenilacija* (sl. 5.2). Ovu reakciju dodavanja katalizuje enzim poli(A) polimeraza u cilju stabilizacije 3 -OH kraja iRNA. Signali za poliadenilaciju uključuju nekoliko sekvenci elemenata, kao heksanukleotid AAUAAA gdje je locirano 10-30 nukleotida uzvodno od mjesta poliadenilacije. Poliadenilatni signali terminacije transkripcije su obično od po nekoliko stotina nukleotida ispod mjesta poli-A-dodatka. Proteini koji katalizuju poliadenilaciju asociraju sa RNA polimerazom II čineći kariku između transkripcije i formacije na 3prim kraju iRNA. Najviše iRNA u eukariota su poliadenilati i poli-A dio je regulator translacije i stabilnosti iRNA. Njveći udar modifikacije pre-iRNA jeste izbacivanje nekodirajućih elemenata (introna) *splajsingom*.

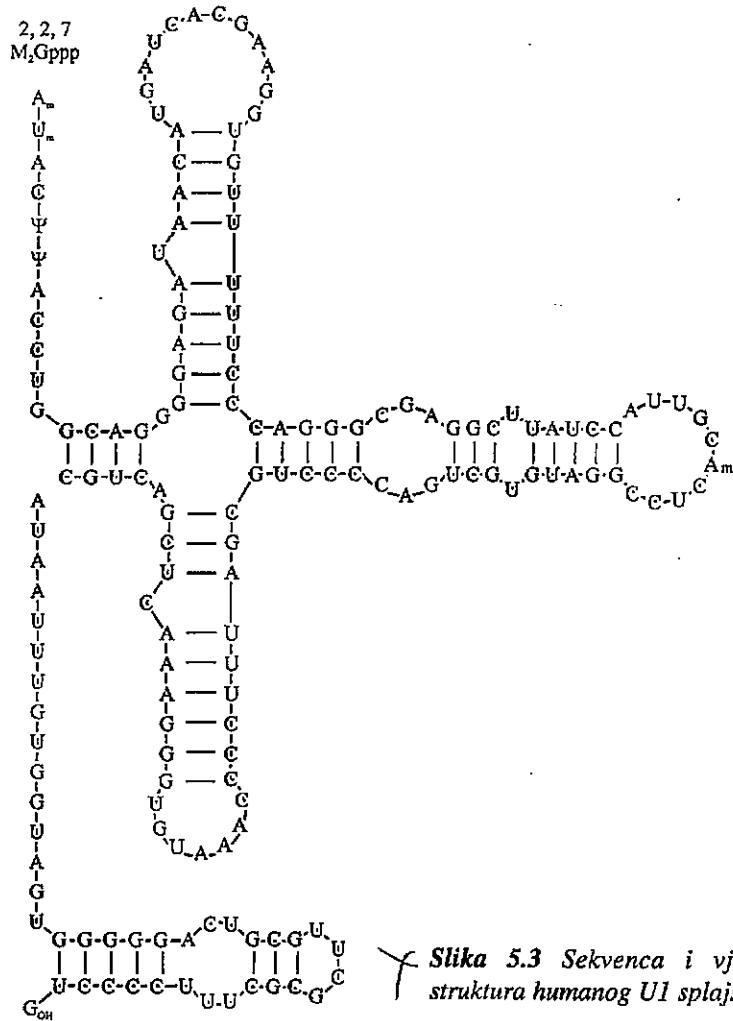


Slika 5.2 Obrada eukariotske informacione RNA. Obrada iRNA uključuje modifikaciju 5' kraja pri kapingu sa 7-metilguanozinom (m⁷G), modifikaciju 3' kraja pri poliadenilaciji i isjecanje introna splajsingom. 5' kap se formira dodavanjem GTP u suprotno orijentisanom 5' kraju iRNA formirajući 5'-5' položaj i dodaje se metil guanozin u ribozu u 1 ili 2 nukleotida iRNA

Mehanizam splajsinga

Dok se kod prokariota svaki molekul iRNA sastoji od kontinuiranog niza nukleotida koji predstavljaju šifru za sintezu proteina, kod eukariota iRNA sadrži i nekodirajuće nizove nukleotida (*introne*), koji se isjecaju iz primarnog transkripta iRNA. Biohemijskom analizom nuklearnog ekstrakta otkriveni su veliki kompleksi nazvani *splajsosomi* sastavljeni od proteina i RNAs. Ima pet tipova RNAs kompleksa-splajsosoma građenih od malih nukleolarnih RNAs (snRNAs) označeni sa U1 (sl. 5.3) U2, U3, U4, U5 i U6 snRNAs kompleksi, veličine otprilike 50-200 nukleotida i 6-10 proteinskih molekula u obliku malih nuklearnih ribonukleoproteinskih partikula. Neki od ovih proteina su specifični za određene splajsosome, dok su drugi zajednički za sve snRNA. Centralna uloga snRNAs kompleksa je u *splajsing procesima* (sl. 5.4) procesima isjecanja introna iz prim-iRNA. Prvi korak u splajsing isjecanju je komplementarno vezivanje U1 snRNAs na 5prim kraju pre-iRNA za par baza GU, nakon čega se komplementarne sekvence prepoznaju i povezuju. Potom se veže U2-snrRNAs a vezivanje ostalih kompleksa se nastavlja dalje s tim da se U5 splajsosom vezuje za položaj 3prim

(Newman, 1997). Skupina splajsosoma na položaju AG-mjestu vezivanja introna i egzona, povlači suprotni kraj introna koji se u vidu omče izbacuje iz pre-iRNA (vidi sliku 5.4). Na slici 5.5 je prikazana elektronska mikrografija splajsosoma videni u supstratu dobivenog iz ekstrakta HeLa ćelija i -globina pre-iRNA.

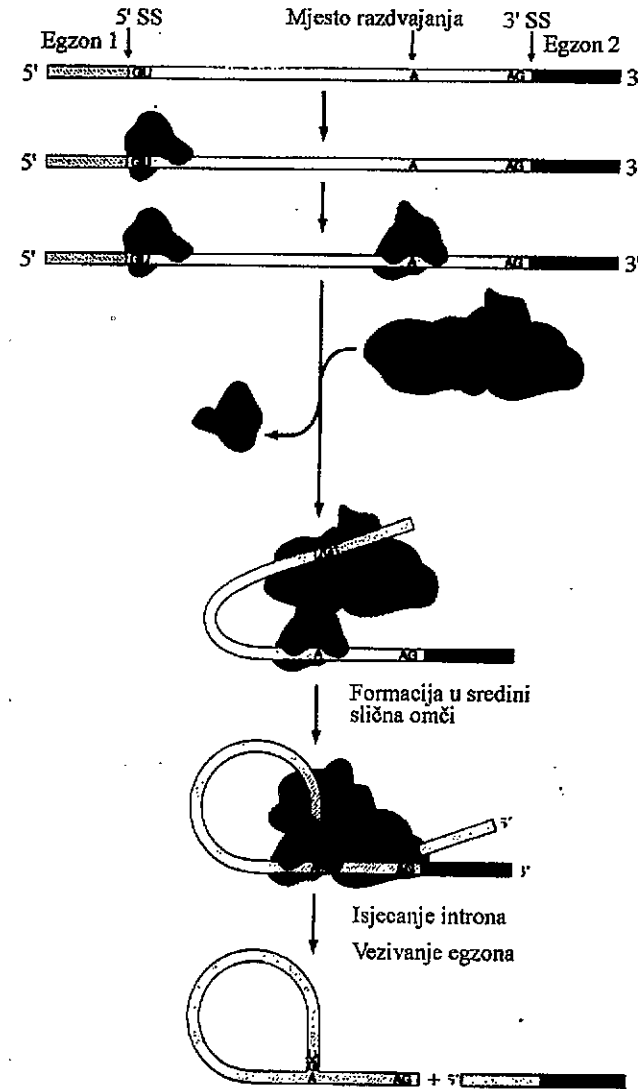


Slika 5.3 Sekvenca i vjerovatna struktura humanog U1 splajsosoma

Smatra se da upravo splajsosomi imaju ulogu u savijanju strukture prim-iRNA i da katalitički djeluju u povezivanju krajeva egzona nakon izbacivanja introna.

Centralna uloga splajsinga u preradi pre-iRNA otvara mogućnost regulacije genske ekspresije u kontroli aktivnosti splajsing mehanizma. Najveći broj iRNA sadrži veliki broj introna i isjecanje introna na različitim mjestima dovodi do različitih kombinacija u vezivanju 5prim i 3prim krajeva i različitih kombinacija iRNA. Isjecanje egzona u različitim kombinacijama dovodi i do neuobičajenih načina

kontrolne genske ekspresije u proizvodnji multiplih iRNA (prije svega multiplih proteina) od pre-iRNA. Ovi procesi su poznati kao *alternativni splajsing*, česti u složenih eukariota. Self-splajsing javlja se u mitohondrijama, hloroplastima i u bakterijskoj iRNA u čijim se splajsing procesima katalizuje isjecanje intronske sekvence.



Slika 5.4 Obrada pre-iRNA splajsingom Prvi korak u splajsingu je vezivanje U1 snRNPs u 5' položaju spajajući se na mjesto (SS) sa p.b.GU, zatim se vezuje U2 snRNPs na drugo mjesto (baza A). Formirani kompleks sadrži U4/U6 i U5 snRNPs splajsosome. U5 se vezuje za sekvence uzvodno od 5' mjesta spajanja, a U6 se odvaja od U4 i pomijera. U5 se potom spaja sa 3' mjestom spajanja, prateći pri tom isjecanje introna (u vidu omče) i vezivanje egzona. (Russell, J.R.1992.)

RNA



Slika 5.5 Elektronska mikrofografija splajnosoma Ekstrakt HeLa ćelija je miješan sa -globin pre-iRNA. Reakcija je prekinuta prije splajsinga, tako da komplement splajnosoma sadrži snRNPs i pre-iRNA nakon čega je supstrat mogao biti prečišćen (Uslužnošću Russell, P.J. 1992.)

Informativna DNA varira po nukleotidnom sastavu, što zavisi od vrste organizama i stepena razvoja. Ima kratko vrijeme postojanja i veoma brzo se vezuje za ribosome. Za razliku od drugih iRNA brzo se degradira (poluvrijeme života iRNA sisara je oko 5 dana). Kod viših sisara komplement iRNA sa ribosomima u citoplazmi može biti aktivan po nekoliko dana. Mali je broj polipeptida koji sadrže manje od 100 amino kiselina, tako skoro svi molekuli iRNA imaju najmanje 100x3 nukleotida (3 nukleotida čine jedan kodon). Neki molekuli iRNA kodiraju više od jednog polipeptidnog lanca. Time se objašnjava postojanje iRNA različite dužine. Npr. postoji iRNA koja kodira 10 enzima potrebnih za sintezu amino kiseline histidina. Ovaj molekul sadrži oko 12.000 nukleotida, što znači po 1.200 nukleotida za kodiranje svakog proteina.

Genetski kod

Kako i na koji način se nukleotidne sekvence DNA prenose na aminokiselinske sekvence proteina? Dokazi genske ekspresije genetske informacije između hemijski nepovezanih različitih makromolekula-nukleinskih kiselina u proteindonijela su i dvije nove vrste problema u razumijevanju aktivnosti gena. Jedan problem je bio razjašnjen kada se otkrilo, da tRNA služi kao adapter između amino kiselina i iRNA u toku translacije. Primarno je da se svaka amino kiselina u procesu sinteze proteina veže za specifični enzim i odgovarajuću tRNA. Osnova vezivanja je komplementarnost sekvenci iRNA koje direktno vežu amino kiselinu na korektno mjesto na iRNA matricu. Drugi problem translacije nukleotida do amino kiselina je bio determinacija genetskog koda. Bilo je postavljeno pitanje,

kako se može informacija sadržana u sekvencama od četiri različita nukleotida prenjeti na sekvence 20 različitih amino kiselina. Nakon niza eksperimenata in vitro naučnici Marshall Nirenberg i Heinrich Matthae su riješili ovo pitanje utvrdivši tačan triplet nukleotida koji kodiraju amino kiselinu fenil alanin, a to je AAA kodon. Iz toga su zaključili da po tri nukleotida (triplet baza) u DNA određuju položaj jedne amino kiseline u proteinu i označeni su kao genetski kod (sl. 5.6). Komplementarni triplet baza na iRNA označen je kao kodon, a komplementarni triplet baza kodonu na tRNA označen je kao antikodon (Crick, 1966). Kako ima 20 amino kiselina, a 4 nukleotida (A, T, G, C), moguće su 64 kombinacije kodona od kojih su 61 specifični za određene amino kiseline a tri su takozvana stop kodoni (UAA, UAG i UGA) ili signali za terminaciju (kraj) sinteze, jer ne nose informaciju niti za jednu amino kiselinu. Pored terminacionih, postoje i inicijalni kodoni (AUG i GUG) koji započinju sintezu i na taj način uslovljavaju pravilno vezivanje amino kiseline u peptidni lanac (NF2-COOH). Naprimjer, kodon AUG kodira početnu amino kiselinu N-formilmetionin kao i metionin. Kako ima 20 amino kiselina, znači da jedna ista amino kiselina može biti kodirana od dva ili više različitih kodona. Naprimjer, amino kiselina triptofan može biti kodirana od šest kodona, dok amino kiselinu metionin kodira samo jedan triplet - kodon.

		Drugo slovo					
		U	C	A	G		
Prvo slovo	U	13 UUG Phe 28 UUC Phe 2 UUA Leu 9 UUG Leu	16 UCU Ser 18 UCC Ser 9 UCA Ser 2 UCG Ser	10 UAU Tyr 23 UAC Tyr UAA Stop UAG Stop	10 UGU Cys 13 UGC Cys UGA Stop 12 UGG Trp	U C A G	
	C	9 CUU Leu 27 CUC Leu 7 GUA Leu 47 CUG Leu	14 CCU Pro 17 CCC Pro 10 CCA Pro 5 CCG Pro	10 CAU His 21 CAC His 10 CAA Gln 28 CAG Gln	8 CGU Arg 11 CGC Arg 4 CGA Arg 5 CGG Arg	U C A G	
	A	11 AAU Ile 24 AUC Ile 4 AUA Met 16 AUG Met	15 ACU Thr 28 ACC Thr 11 ACA Thr 6 ACG Thr	8 AAU Asn 28 AAC Asn 19 AAA Lys 49 AAG Lys	12 AGU Ser 21 AGC Ser 8 AGA Arg 10 AGG Arg	U C A G	
	G	9 GUU Val 21 GUC Val 5 GUA Val 33 GUG Val	28 GCU Ala 38 GCC Ala 14 GCA Ala 6 GCG Ala	16 GAU Asp 24 GAC Asp 21 GAA Glu 34 GAG Glu	22 GGU Gly 32 GGC Gly 16 GGA Gly 11 GGG Gly	U C A G	
						U C A G	

Slika 5.6 Genetski kod Od 64 kodona 61 kodira specifične amino kiseline. Jedan od 61 kodona (AUG) inicira početak sinteze proteina. Tri kodona su terminaciona, završavaju sintezu proteina, ne kodiraju niti jednu amino kiselinu. (Prema, Russel, J.P.:Genetics, 1992.).

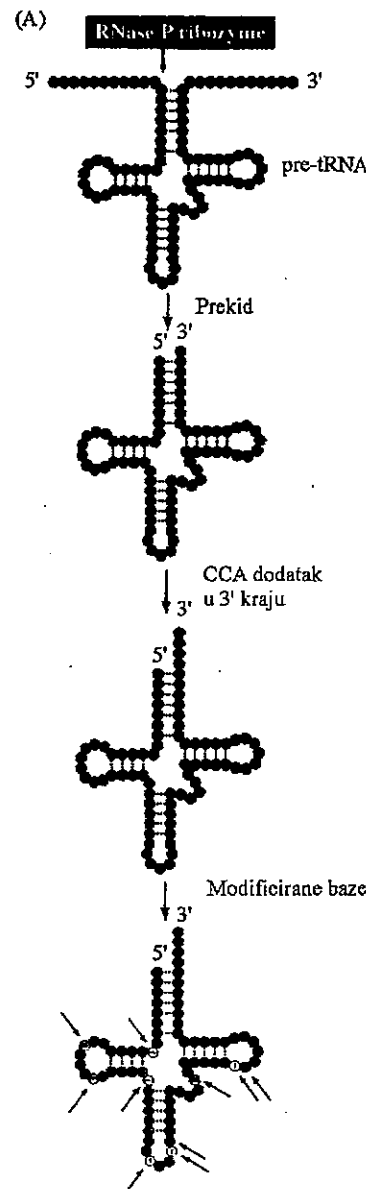
Osnovne karakteristike genetskog koda su brojne. Genetski kod je specifičan, kodira samo specifične amino kiseline. Genetski kod je degenerativan (izrođen). U slučaju kada kodira jednu istu amino kiselinu prve

dvije baze su iste, a treća je različita, što je u slučaju amino kiseline leucina (UUA i UUG) ili serina (UCU, UCC, UCA, UCG,) itd. Dakle, jedan molekul tRNA mož specifično prepoznati nekoliko kodona, ova neodređenost je obično posljedica kolebanja baza na 5 kraju antikodona. Genetski kod je u najvećoj mjeri univerzalan (isti kodon kodira istu amino kiselinu kod svih živih organizama). Međutim, danas je poznato da ima kodona koji kodiraju kod nekih organizama amino kiselinu arginin da bi taj isti kodon kodirao signal stop kod drugih organizama, naprimjer u slučaju mitohondrija ćelija kvasca i humane mitohondrijalne DNA.

OBRADA TRANSPORTNE RNA (TRNA)

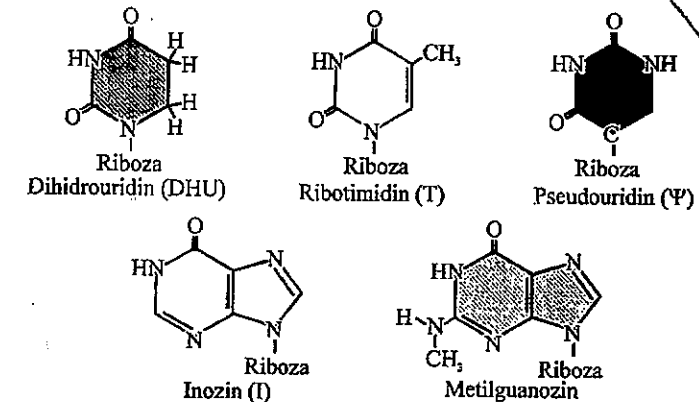
Transportna RNA (tRNA) sintetise se prvobitno u vidu prekursora molekula (pre-tRNA). Primarni transkript se postsintetski obrađuje (sl. 5.7). Obrada započinje na 5' uz učešće enzima RNAs P ribozim koji ima specifično katalitičko djelovanje, tj. katalizira prekid pre-tRNA. Građen je od RNA i proteinskih molekula. Sidney i Altman 1983. su demonstrirali izolaciju RNA komponenta iz enzima. Slobodna RNAs P je katalizovala prekid pre-tRNA. Ovaj eksperiment je potvrdio da je RNAs P ribozim- odgovoran za katalitičku aktivnost. Drugi neobičan aspekt tRNA jeste prostorna modifikacija baza u tRNA molekulama. Upravo, oko 10% baza tRNA se promijeni i tako sa na specifičnim mjestima tRNA nalaze različiti molekuli. I treće, neke pre-tRNA sadrže introne koje, također, odstranjuju mehanizmom splajsinga, kao i iRNA. Karakteristično je da se tRNA prepisuje duž posebnih genskih lokusa i broj tih lokusa je mali. Npr. bakterija E.coli ima sama oko 40 takvih gena.

Slika 5.7 (A) tRNAs nastaje preradom pre-tRNA (prekursora tRNA), osim nekih koje sadrže pojedinačne tRNA molekule



Prekidi na 5' kraju tRNA su katalizovani enzimom RNAs P- ribozim; prekidi na 3' su katalizovani standardnom protein R-nazom. Potom se na 3' kraju u mnogih tRNA u posttranskripcionom procesu dodaje antikodon CCA. Na kraju, neke baze se modificiraju na karakterističnim mjestima u tRNA molekuli. U ovom primjeru modificirani nukleotidi obuhvataju dihidrouridin (DHU), metilguanozin (mG), inozin (I), ribotimidin (T), i pseudouridin (Ψ) (sl. 5.7B).

(B) Modificirane baze

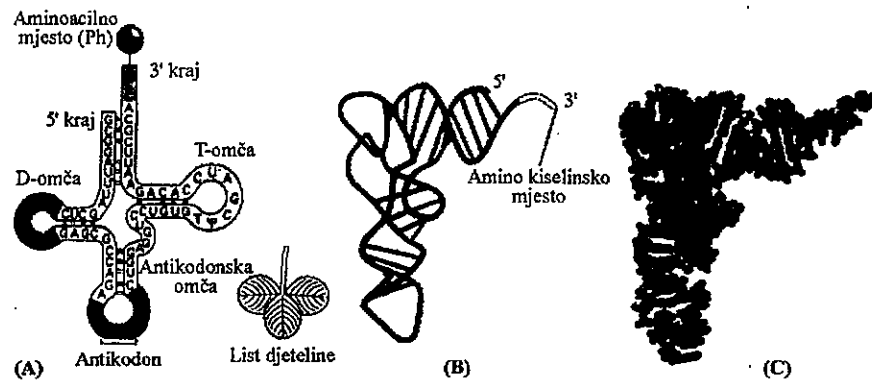


Slika 5.7 (B) Struktura modificiranih baza. Ribotimidin, dihidrouridin, i pseudouridin su formirani modifikacijom uridina u tRNA. Inozin i metilguanozin su formirani modifikacijom guanozina.

Transfer RNA je građena od 70-80 nukleotida i ima karakterističnu kružnu strukturu što je rezultat komplementarnih baza između različitih regiona molekula. U postsintetskoj obradi zadobija L konfiguraciju što opet odgovara potrebama tRNA u procesu sinteze proteina.

Za molekule tRNA karakteristično je da, osim prisustva nukleotidnih baza adenin, guanin, citozin i uracil sadrži i niz neobičnih baza. To su one baze koje sadrže jednu ili više CH3 grupa i koje ne mogu da prave uobičajene parove. Najčešće su zastupljene: inozin pseudouridin, metilguanozin, dihidrouridin i dr.

Sekundarna struktura tRNA je poznata. U prostoru ima formaciju lista djeteline (sl.5.8). Počevši od 5 terminalnog nukleotida (početak) koji se nalazi u dijelu dvostrukog lanca, prvo se nailazi na petlju koja se zbog čestih dihidrouridina naziva dihidrouridinska (D) omča. Lanac kovalentno vezanih nukleotida nastavlja se dalje u antikodonska omča u kojoj se nalazi antikodon nosilac specifičnosti svake pojedine vrste tRNA. Dalje, nakon male varijabilne pomoćne petlje nailazi se na treću veliku takozvanu T- omču (pseudouridinpirimidinska omča). Preostali nukleotidi do kraja lanca najvećim su dijelom vodikovim mostovima vezani u dvostruki lanac, dok na samom 3-OH kraju prestaje jednolančani rep s redosljedom CCA-antikodonom koji je prisutan u svim tipovima tRNA.

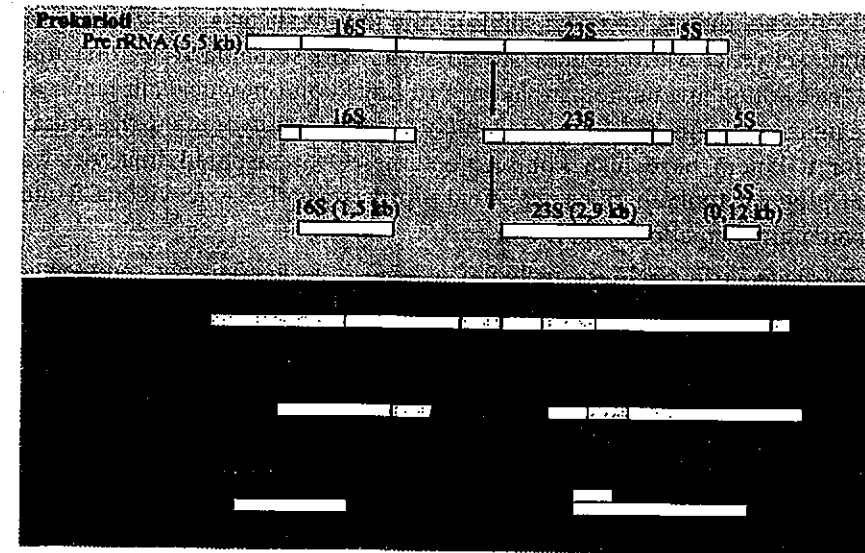


Slika 5.8 Struktura tRNA (A) Ilustracija prikazuje sekundarnu strukturu tRNA. Idući od 5' kraja je dihidrouridinska omča (D), zatim antikodonska omča (omča specifičnosti), mala varijabilna omča i velika pseudouridinpirimidinska omča (T), lanac završava antikodonom CCA (aminoacilno mjesto) na 3' kraju. Dalju promjena konfiguracije lista djeteline prikazuje model (B) i (C). (Uslužnoću of Dan Richardson 1998.)

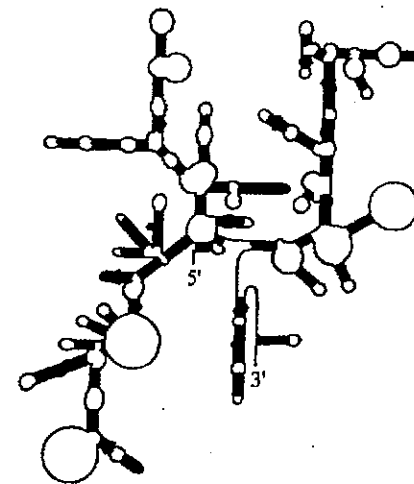
U zaključku, transfer RNA se odlikuje velikom specifičnošću i varijabilnošću, jer za svaku amino kiselinu (20) postoji najmanje po jedna tRNA. Zapravo svaka ćelija sadrži oko 60 vrsta tRNA, što znači da ima nekoliko vrsta tRNA koje prenose istu amino kiselinu do mjesta sinteze proteina. Struktura tRNA povezana je sa njenom funkcijom koja se sastoji u vezivanju slobodnih amino kiselina u spoljnim dijelovima citoplazme i njihovim prenošenjem do ribosoma, mjesta sinteze proteina.

OBRADA RIBOSOMALNE RNA (RRNA)

Eukarioti imaju četiri specifične rRNAs, tri su (28S, 18S i 5.8S) proizvedene pri isjecanju dugog prekursora, nazvan pre-rRNA transkript (sl. 5.9). Za razliku od ostalih, četvrta 5SrRNA se ne obrađuje prostorno u eukariotskim ćelijama, ujedno je završni oblik, transkribuje se sa odvojenih gena. Prokariotska i eukariotska pre-rRNA proizvodi se kroz nekoliko faza. Inicijalno isjecanje bakterijske pre-rRNA proizvodi odvojene prekursore za tri pojedinačne rRNA, potom se obrađuju sekundarnim isjecanjem u finalne produkte. U eukariotskim ćelijama pre-rRNA prvo isjeća 5.8rRNA na 5' mjestu proizvodeći dva odvojena prekursora koja obuhvataju 18S i 28S+5.8S rRNA. Dalje isjecanje konvertuje ove produkte sa 5.8S rRNA prikladno hidrogen povezivanju sa 28S molekulama. Ovo isjecanje rRNA uključuje dodavanje metil grupe u baze i šećer ubacujući je u specifične nukleotide.



Slika 5.9 Obrada ribosomalne RNAs Prokariotske ćelije sadrže tri rRNA (16S, 23S, i5S) koje se formiraju preradom pre-rRNA transkripta. Eukariotske ćelije sadrže četiri rRNAs. Jedna od ovih (5SrRNA) se transkribuje sa posebnog gena; druge tri (18S, 28S, i 5, 8S) proizvode se od zajedničke pre-rRNA.



Slika 5.10 Tro-dimenzionalna mapa sekundarne strukture malih (16S) rRNA kod bakterija prikazuje položaj parova baza stabla i omči.

Struktura rRNA je slična strukturi tRNA po komplementarnosti baza. Trodimenzionalna struktura rRNA (sl. 5.10) omogućava njeno vezivanje za ribosomalne proteine. Zatim ribosomalna RNA objezbjeđuje konstrukciju ribosoma, njihovo sklapanje sa proteinima. Međutim otkrivena je i katalitička uloga rRNA u sintezi proteina, tj. u vezivanju amino kiselina u peptidni lanac.

Ribosomalna RNA ima složenu prostornu strukturu. Molekuli su jednolančani i nemaju jednaku količinu guanina i citozina, odnosno adenina i uracila. Ipak, postoji dovoljan odnos baznih parova, tako da su baze na istom lancu rRNA spojene vodikovim vezama formirajući sekundarnu strukturu, sličnu kao kod tRNA. Ovi jednolančani i spiralizovani molekuli daju rRNA nepravilan trodimenzionalni oblik (3-D).

Uopšteno, dužina i položaj stablo-petlje je vrlo sličan kod svih vrsta, neke posebne sekvence variraju od vrste do vrste. Ribosomalna RNA ima mnoge ispružene komplementarne parove baza (u boji) koji omogućavaju lancu da se vraća unazad u formi duplog-lanca helikoidnog kraja. Otvorene petlje prikazuju prostor u kojem baze nisu komplementarne. Ovaj raspored ima vjerovatno važnu ulogu u funkciji ribosoma. Ovdje prikazana rRNA je videna u malim ribosomalnim subjedinicama E.coli.

Različite vrste rRNA se razlikuju u odnosu na koeficijent sedimentacije. Obično se u maloj subjedinici ribosoma nalazi samo jedna rRNA sa manjim koeficijentom sedimentacije a u većoj dvije ili tri. Sve tri vrste rRNA kod nižih organizama transkribuju se sa tri gena koja su blisko locirana. Kod viših organizama 45SrRNA transkribuje se sa jednog genskog lokusa koji sadrži najmanje 56-1000 identičnih kopija i koji je prekursor za 28S i 18S rRNA, ovi geni se nalaze u regionu hromosoma organizatora nukleolusa (NOR) a to su hromosomi 13, 14, 15, 21 i 22, a 5S kod eukariota, kako smo naveli, determinišu drugi geni. Watson još 1976. navodi da se ovi geni nalaze u telomernim dijelovima dužih krakova većine hromosoma, uz pretpostavku da postoje dvije različite grupe gena koji kodiraju 5SrRNA: aktivni u oocitima (sa oko 2.400 kopija jednog istog gena), dok su drugi prisutni u somatskim ćelijama sa oko 450 kopija.

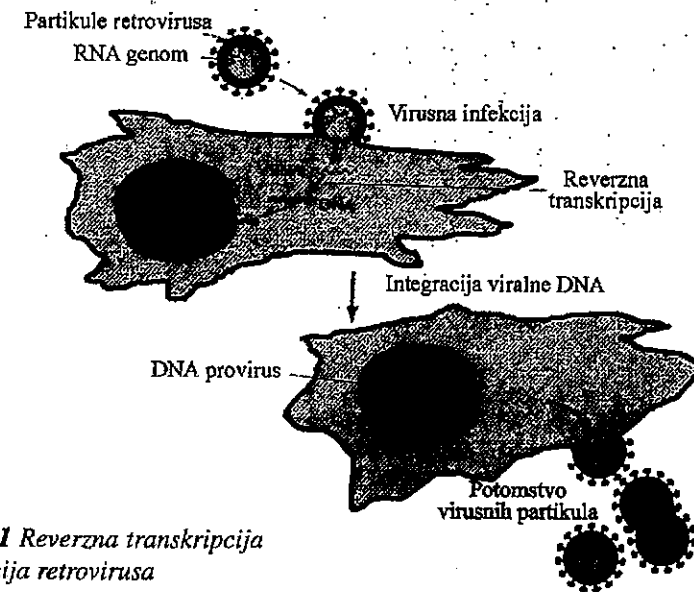
RNA VIRUSI I REVERZNA TRANSKRIPCija

Objašnjenjem genetskog koda bili su utvrđeni fundamentalni principi molekularne biologije ćelije. Prema centralnoj dogmi genetski materijal je DNA čija je sposobnost samoreprodukcije kao i transkripcije u mRNA koja služi kao matrica u procesu sinteze proteina. Međutim, mnogi virusi sadrže RNA, različitu od DNA, kao genetski materijal, implicirajući korištenje drugog modaliteta za prenos informacije.

RNA genom je prvi puta ispitan u biljnim virusima. Mnogi su bili građeni samo od RNA i proteina. Direktan dokaz RNA djelovanja kao genetski materijal u ovih virusa, bio je otkriven 1950. U nizu eksperimenata izolirana je prečišćena RNA iz mozaičnog virusa duhana, kojom su inficirane nove ćelije domaćina, prenoseći infekciju na virusno potomstvo. Model replikacije virusnog RNA genoma bio je kasnije otkriven i studiranjem RNA bakteriofaga E.coli. Otkriveni su enzimi koji katalizuju sintezu RNA sa RNA matrice (RNA-direktno RNA sinteza) koristeći se nekim mehanizmima sparivanja baza između komplementarnih lanaca koji se upotrebljavaju u toku DNA replikacije ili transkripcije RNA sa DNA. Međutim, RNA-direktna RNA sinteza ne objašnjava replikaciju u RNA-tumorskih virusa koji uzrokuju kancer. Također, i ovi virusi sadrže RNA genom i u viralnim partikulama. Međutim, 1970. Temin i David Baltimore zaključili su nezavisno da RNA tumor-virusi sadrže neobične

enzime koji katalizuju sintezu DNA sa RNA matrice. Sinteza DNA sa RNA sada se naziva *reverze transkripcion ili reverzna transkripcija* (sl. 5.11) i utvrđena je kao model prenosa informacije u biološkom sistemu (Levin, 1997).

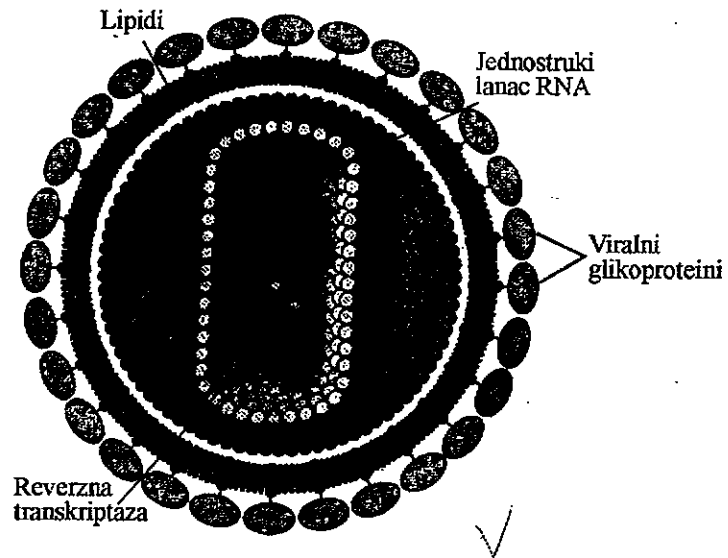
Reverzna transkripcija nije samo važna u replikaciji retrovirusa već, također, u najmanju ruku u dva druga široka aspekta molekularne i ćelularne biologije. Prvo, reverzna transkripcija nije isključivo karakteristika samo retrovirusa; događa se, također, u ćelijama i često je odgovorna za transkripciju DNA sekvenci sa jednog na drugi hromosom tj. hromosomski lokus. Drugo, enzim koji katalizuju RNA-direktno DNA sintezu (reverzna transkriptaza) može biti upotrijebljen eksperimentalno u proizvodnji DNA kopija mnogih RNA molekula.



Slika 5.11 Reverzna transkripcija i replikacija retrovirusa

Retrovirusi sadrže RNA genom u viralnim partikulama. Kada retrovirus inficira viralni ćeliju domaćina, međutim, DNA se kopira sa viralne RNA i sintetizira preko reverzne transkripcije. Ova viralna DNA je integrisana u hromosomalnu DNA domaćina u obliku DNA provirusa koja je transkribovana u potomstvo virusa RNA. (Prema, Levin, H.L. 1997.).

Takoder, i virusi HIV se reprodukuju reverznom transkripcijom. Slika 5.12 prikazuje strukturu AIDS virusa. Unutrašnje jezgro sadrži dvije molekule RNA, zajedno sa dvije ili više molekula enzima reverzne transkriptaze. Okolo je jezgro obavijeno sa dva gusta sloja proteina. Lipidni sloj je proizvod ćelijske membrane ćelije domaćina u kojoj se virus prethodno replicirao. Na površini membrane su razmaknute molekule glikoproteina.



Slika 5.12 HIV virus i reverzna transkriptaza Šematski prikaz presjeka kroz dijelove HIV virusa. Vidi se jednostruku lanac RNA, molekule enzima reverzne transkriptaze, molekule viralnih glikoproteina kao i molekule lipida- produkti ćelije domaćina.

Molekularna medicina

Pit-1 transkripcioni faktor i deficit hormona rasta

Hormon rasta je protein i proizvodi ga hipofiza a reguliše normalni rast i razvoj. Deficit ovog hormona zaustavlja rast, što može biti posljedica različitih uzroka uključujući i mutaciju gena odgovornog za sintezu hormona. U nekim slučajevima nije u pitanju deficijencija samo hormona rasta već i drugih hormonskih produkata kao na primjer, smanjen nivo tireoid-stimulatornog hormona ili prolaktina. Deficit humanog hipofiznog hormona rasta je proučavan 1979, 1985 a 1990 godine dokazano je da se ovaj deficit javlja kao posljedica mutacije gena, koji kodira transkripcioni faktor nazvan Pit-1. Molekularnom analizom je dokazano da je Pit-1 protein odgovoran za transkripciju hormona rasta i prolaktin gene, kao i za stabilizaciju somatotropina i laktotropina u toku razvoja hipofize. Djeca sa deficitom hormona rasta mogu biti tretirana efektivno iniciranjem humanog hormona rasta. Kada je u pitanju deficit ovog hormona radi se o nasljednoj Pit-1 mutaciji. Genetski skrining (DNA-testovi i prenatalna dijagnostika u genetskom savjetovaštu) omogućava otkrivanje eventualnih presimptoma kao i dijagnozu i tretman aficiranog djeteta.



Hipofizni gigant i patuljak jedan pored drugog

Parks, J.S.H. et al.: Genetics of Growth Hormone Res. 40

SINTEZA PROTEINA OBRADA I REGULACIJA

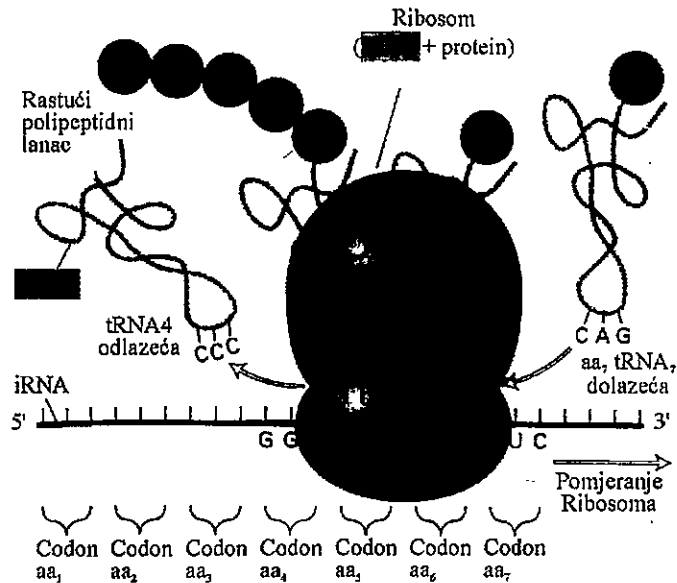
Transkripcija i obrada iRNA prati translaciju iRNA u procesu sinteze proteina. Sinteza proteina je finalni stadij genske ekspresije. Međutim, translacija iRNA je samo prvi korak u formiranju funkcionalnih proteina. Proteini mijenjaju svoju konfiguraciju, obrađuju se prije nego se prerade u aktivni funkcionalni protein. Ovi koraci u obradi su nagovještaj sortiranja, povezivanja srodnih, razdvajanja različitih a potom transport proteina u određene destinacije unutar ćelije.

Također, genska ekspresija je regulisana kako na nivou transkripcije tako na nivou translacije i ova kontrola je vrlo važan element u regulaciji gena i u prokariota i eukariota. Međutim, mehanizam kontrole aktivnosti proteina unutar ćelije je regulisan. Nekada je sinteza proteina regulisana ekstracelularnim signalima, kovalentnom modifikacijom ili povezivanjem sa drugim molekulama. Na kraju, nivo proteina unutar ćelije može biti kontrolisan različitim nivoima proteinske degradacije. Ova multipla kontrola aktivnosti proteina uslovljena je regulacijom svih aspekata ćelijskog ponašanja.

Uloga RNA u sintezi proteina

Jedna od osnovnih bioloških molekula DNA ima sposobnost sinteze fiziološki tačno određene količine specifičnog proteina. Poznato je da sama DNA ne predstavlja kalup za sintezu proteina. Sinteza proteina sastoji se od niza procesa. "Prenos" genetske informacije i uputa o redosljedu amino kiselina u polipeptid odvija se kroz procese transkripcije i translacije.

U procesu transkripcije redosljed baza u polinukleotidnom lancu DNA komplementarno se prepisuje u redosljed baza jednonančane RNA (iRNA, tRNA i rRNA) molekule. U procesu translacije informaciona RNA prenosi genetsku uputu i prevodi je pomoću prenosne-transportne RNA do ribosoma u redosljed amino kiselina u proteinu (sl. .6.1)



Slika 6.1 Tri uloge RNA u sintezi proteina Mesendžer RNA (iRNA) sadrži informaciju o redosljedju amino kiselina u polipeptidu, prenosi je preko transportne RNA (tRNA) u ribosome mjesto sinteze koji su građeni od ribosomalnih RNA molekula (Prema A.J.F.Griffits et al. 1993.

Formira se molekul polipeptida čiji raspored amino kiselina zavisi od redosljeda nukleotida u iRNA, odnosno informacije koju je molekul iRNA primio od odgovarajućeg gena. Prevođenje genske upute predstavlja centralnu dogmu molekulske biologije: (DNA → RNA → PROTEIN).

Organizacija iRNA i inicijacija translacije

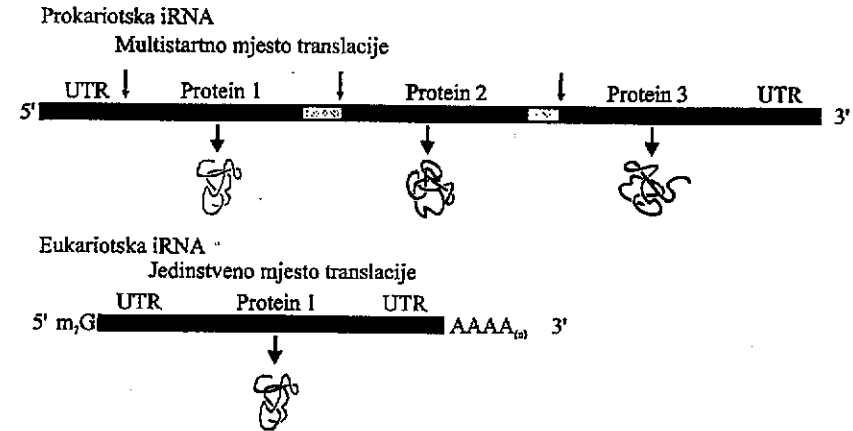
Mehanizam sinteze proteina u prokariotskim i eukariotskim ćelijama je sličan, ali postoje, također, i razlike, djelimično u signalima koji određuju mjesto početka sinteze polipeptidnog lanca na matrici iRNA. Translacija nije jednostavan proces (sl.6.3) počinje na 5' kraju iRNA; to je start-specifično početno mjesto (inicijacija). Terminalni 5' dio u prokariota i eukariota, prije svega, čine nekodirajuće sekvence, označene kao 5' netranskripcioni region. Eukariotska iRNAs obično kodira samo jedan polipeptidni lanac, dok mnoge prokariotske iRNA kodiraju multiple polipeptide sintetisane nezavisno od mjesta inicijacije. Naprimjer, u E.coli lactozni operon sadrži tri gena koja prepisuju iRNA/Mesendžer RNA koja kodira multiple polipeptide naziva se policistrnska dok iRNA koja kodira jedan polipeptidni lanac-monocistrnska iRNA (sl. 6.2). I kod jednih i drugih organizama translacija je inicirana sa amino kiselinom metionin koja je kodirana inicijalnim kodonom AUG. Alternativni inicijalni kodon je

UTRS

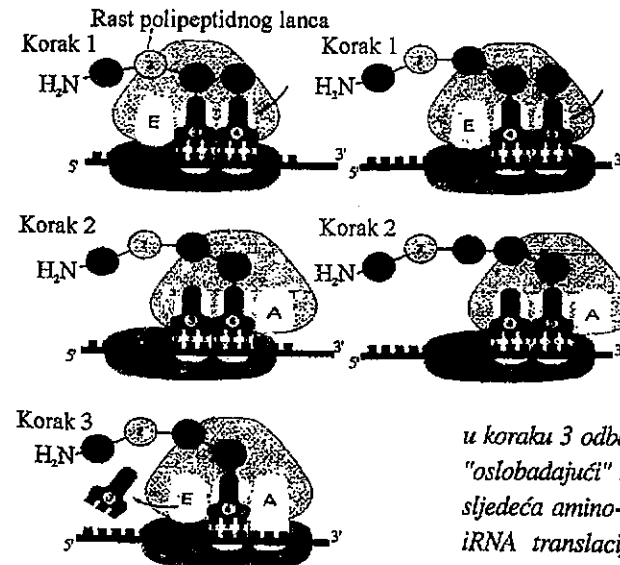
7

PROKARIOTSKA - MONOCISTRONSKA
EUKARIOTSKA - POLICISTRONSKA

GUG i ovaj kodon direktno ugrađuje amino kiselinu metionin. Kod bakterija inicijalni kodon iRNA čine specifične sekvence (nazvan Shine-Delgarno sekvence). Međutim, eukariotska iRNA nema sekvence ekvivalentne Shine-Delgarno sekvencama. Uloga iRNA u prevodenju genske upute prestaje sa terminacijom sinteze polipeptida tj. sa ulaskom terminacionih kodona UAA, UAG i UGA, jer se za ove kodone ne vezuje niti jedna od postojećih AK-tRNA molekula.



Slika 6.2 Prokariotska i eukariotska iRNAs Obje prokariotska i eukariotska sadrže ne transkripcioni region (UTRs) na 5' i 3' krajevima. Eukariotska iRNA, također, sadrži 5 7-metilguanozin (m⁷G) caps (kaps) i 3' poli-A tails (dijelove). Prokariotska iRNA je najčešće policistrnska: ona kodira multiple proteine. Svaki počinje sa posebnog startnog mjesta. Eukariotska iRNA je obično monocistrnska, kodira samo jedan protein

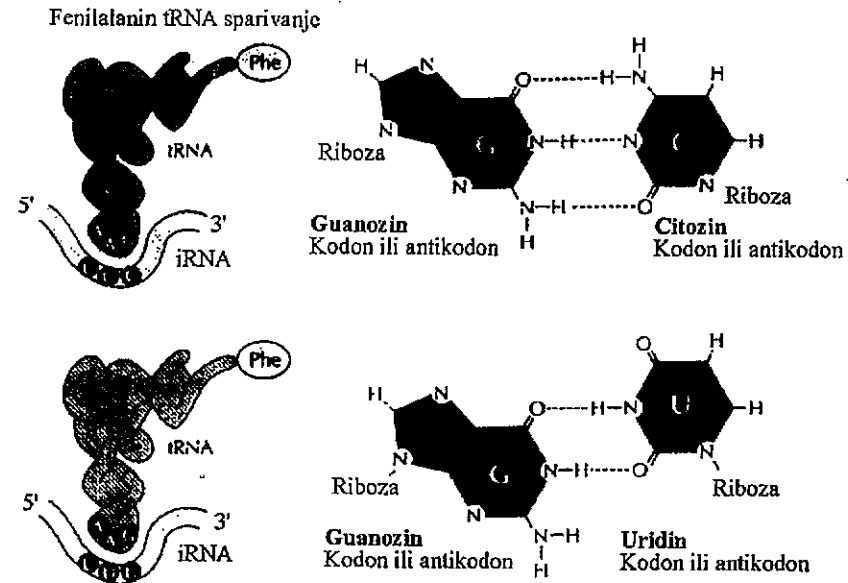


Slika 6.3 Translacija iRNA molekula Prikazana su tri koraka ciklusa sinteze proteinskog lanca. Aminoacil-tRNA molekula se vezuje za A-mjesto na ribosomu u koraku 1, novija peptidna veza se formira u koraku 2, a mala subjedinica se pokreće na rastojanju od tri nukleotida duž iRNA lanca u koraku 3 odbacujući istrošene tRNA molekule "oslobadajući" ribosom, tako da se može vezati sljedeća amino- acil-tRNA. Kako je naznačeno, iRNA translacija je u smjeru 5'-3' smjeru. (Alberts, B. et al. 1998.)

Organizacija tRNA i rRNA ✕

U procesu translacije svaka od 20 amino kiselina mora biti postavljena naspram korespondirajućeg kodona iRNA matrice. Čelija sadrži oko 60-70 vrsta različitih tRNA koje služe kao adapteri amino kiselina u procesu sinteze proteina. Sve vrste tRNA imaju kratke lance sa svega 70-90 nukleotida. Budući da su to kratki lanci molekulske težine 25.000, topivi su, za razliku od velikih lanaca iRNA, pa se nazivaju još topivom tRNA. Različite tRNA imaju sličnu strukturu. Međutim, moguća je jedinstvena identifikacija sekvenci kod prihvatanja amino kiselina i njihovog povezivanja sa odgovarajućim kodonom iRNA. Kako ima 20 amino kiselina, među 60 tRNA očito ima nekoliko različitih tRNA koje će prenositi istu amino kiselinu, pa takve tRNA se nazivaju akceptorske tRNA. Naprimjer, tRNA^{ser} za amino kiselinu serin ili tRNA^{his} za amino kiselinu histidin itd. Međutim, mogući su i nestandardni kodon-antikodon parovi baza dopuštajući da se G spoji sa U, a da se inozin u antikodonu spoji sa uracilom, citozinom ili adeninom. Tako naprimjer, nestandardni parovi baza dopuštaju da fenilalanin (Phe) tRNA prepozna UUC ili UUU kodone i da alanin (Ala) prepozna GCU, GCC, ili GCA što nije uobičajeno (sl. 6.4).

Struktura tRNA je prilagodena funkciji koja se sastoji u vezivanju slobodnih amino kiselina u citoplazmi i njihovom prenošenju do ribosoma-mjesta sinteze proteina. Prilagodavanje strukture tRNA funkciji uključuje dva specifična regiona molekula. To su: sve tRNA imaju triplet nukleotida CCA na 3' kraju za koji se vezuje amino kiselina, nakon čega se tRNA sa amino kiselinom veže kovalentno za ribosom. Ovaj proces je vezan uz prethodno aktiviranje amino kiseline u citoplazmi pomoću ATP-a i enzima aminoacilne-tRNA-sintetaze (prva faza u procesu sinteze proteina). Specifični region molekula tRNA čini antikodonski specifični triplet nukleotida koji "prepoznaje" odgovarajući triplet nukleotida na iRNA, tj. kodon. Između antikodona tRNA i kodona iRNA u procesu sinteze se uspostavlja prolazna vodonična veza (H-most). H-veza se prekida nakon što se između dvije aminokiseline uspostavi peptidna veza. Ponovo se uspostavljaju između sljedeće amino kiseline i njene tRNA i specifičnog kodona iRNA. Kada se sintetiše peptidni lanac između ove aminokiseline i prethodne, iRNA se pomiče, H veze pucaju i tako se proces ponavlja uključivanjem novih aminokiselina i uspostavljenjem novih H-mostova sve dok se ne sintetiše peptidni lanac određene dužine. Funkcija tRNA u translaciji je donošenje, dakle, nove amino kiseline u takav položaj na većoj subjedinici ribosoma da enzym aminoacilna -tRNA-sintetaza može katalizovati sintezu peptidne veze između -COOH grupe posljednje amino kiseline u već postojećem peptidnom lancu i NH₂ grupe, nove amino kiseline. Premještanjem s amino kiselinskog (A) mjesta na peptidilno (P) mjesto, a potom na exit (E) mjesto ribosoma, tRNA, obavlja funkciju vezivanja rastućeg lanca. U sljedećem koraku ona se otpušta od exit (E) položaja ribosoma i peptidnog lanca i spremna je da veže za sebe nove amino kiseline.

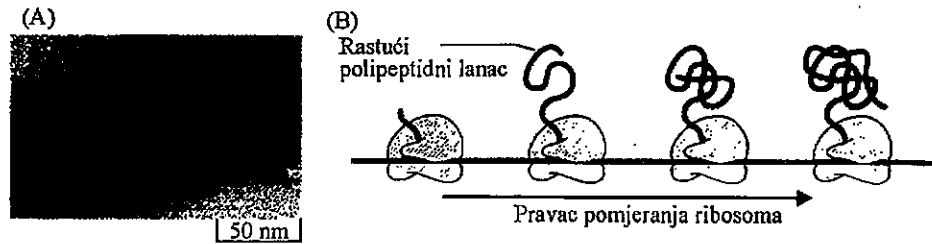


Slika 6.4 Nestandardni kodon-antikodon parovi baza Par baza na položaju trećeg kodona je otpušten dopuštajući da se Guanozin (G) spoji sa Uridinom (U), umjesto Guanozin sa Citozinom (C) što je uobičajeno (gornji dio šeme).

Ribosomalna (rRNA) kiselina u procesu sinteze ima višestruku ulogu: omogućava njeno vezivanje sa ribosomalnim proteinima, zatim strukturnu ulogu, u konstruisanju ribosoma, jer organizuje pravilan raspored proteinskih molekula u ribosomima, omogućava vezivanje iRNA za ribosome u polisome i za dio tRNA po principu komplementarnosti i na kraju ima katalitičke aktivnosti u formiranju peptidnih veza između amino kiselina polipeptida. Najme, ribosomalna RNA katalizuje fundamentalne procese u sintezi proteina. Noller s je 1998. eksperimentalno dokazao da sintetisani fragmenti 23SrRNA u odsustvu nekih ribosomalnih proteina mogu katalizovati formiranje peptida. Ovi rezultati su otklonili svaku sumnju o fundamentalnoj aktivnosti i učešću rRNA u reakcijama enzima peptidil- transferaze i katalize formiranja peptidnih veza. Ovi dokazi ne samo da imaju ulogu razumijevanja katalitičke aktivnosti rRNA molekula već su to i nova saznanja za hipotezu o ranom periodu evolucije RNA svijeta populacije. Uloga rRNA u formiranju peptidnih veza produžuje katalitičke aktivnosti rRNA i dalje u samoreplikaciji, u vezivanju amino kiselina za tRNA i direktnom ugrađivanju amino kiselina u proteine u procesu sinteze.

PROCES TRANSLACIJE
(*sinteza proteina*)

Proteini kao polimeri mnogobrojnih amino kiselina genetski tačno raspoređenih u svom redosljedju nastaju na ribosomima uz pomoć formule (informacije) sadržane u iRNA i tRNA. Ribosomi postaju aktivni tek kada se manja subjedinica poveže sa većom subjedinicom, a potom se ribosomi preko iRNA povežu u kompleks *poliribosom* (sl. 6.5). Na iRNA nalaze se tačno određena specifična mjesta za koja mogu da se vežu 30S subjedinice ribosoma, to su mjesta vezivanja. Svako mjesto vezivanja na iRNA su sekvence AGGA za 8-13 nukleotida udaljene od tzv. inicijalnog kodona (AUG). Broj ribosoma u poliribosomu zavisi od veličine iRNA i polipeptidnog lanca koji se sintetiše. Proces sinteze proteina odvija se kroz više stadijuma: aktivacije amino kiselina, inicijacije ili početka sinteze, elongacije ili rasta lanca i terminacije ili kraj sinteze određenog polipeptida.



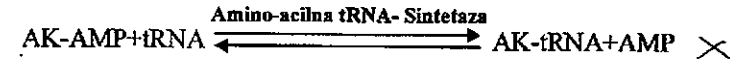
Slika 6.5 Polisom Mesendžer RNA povezuje serije multiplih ribosoma. (A) Elektronska mikrografija eukariotskog polisoma. (B) Šematski uopšten polisom. Polisomi završavaju na 3' kraju iRNA i svaki ribosom u polisomu ima rastući polipeptidni lanac. (Od M. Boublik et al., 1990.)

Aktivacija amino kiselina se odvija u citoplazmi (sl. 6.6). To je enzimatski proces. Uključene su sve vrste RNA kao i enzim amino-acilna-tRNA-sintetaza.

Nakon što se karboksilna grupa (COOH) amino kiseline veže za molekul-adapter (tRNA) i, prije nego obrazuje peptidnu vezu, molekul tRNA mora da se otkaçi. Veza između tRNA i njene amino kiseline je bogata energijom. Energija potrebna za obrazovanje amino-acilne veze potiče od visokoenergetske pirofosfatne veze P-PAPP-a. Prije nego se formira jedinjenje između amino kiselina i tRNA (AK-tRNA), aminokiselina se aktivira pomoću enzima amino-acilne-tRNA -sintetaze, pri čemu se obrazuju aminokiselinski adenilati (AK-AMP) u kojima se karboksilna grupa amino kiseline vezuje za adenilnu kiselinu:

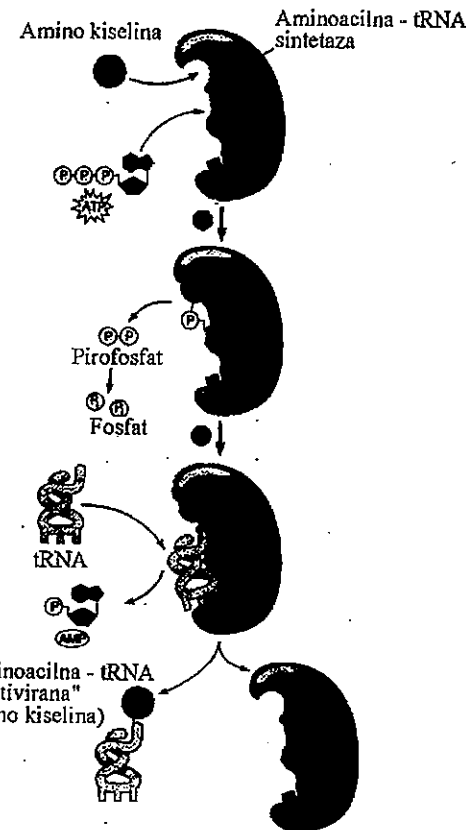


Kompleks AK-AMP ostaje vezan za aktivirajući enzim sve dok ne dode do kontakta sa tRNA koja je specifična za datu amino kiselinu. Tada ovaj isti aktivirajući enzim prebacuje amino kiselinu na krajnji ostatak adenilne kiseline u tRNA:



Enzim koji vezuje datu amino kiselinu i njenu tRNA imaju dva mjesta vezivanja: jedno koje prepoznaje bočnu grupu date amino kiselina i drugo koje prepoznaje tRNA specifično za tu amino kiselinu. (Svakoj ćeliji je potrebno najmanje 20 različitih aktivirajućih enzima i najmanje 20 vrsta molekula tRNA. Najmanje po jedan od ovih molekula mora da postoji za svaku amino kiselinu. Međutim, kako za jednu amino kiselinu postoji više specifičnih tRNA, to ne moraju da postoje posebni aktivirajući enzimi. Molekule iRNA koje se vezuju za različite kodove na DNA obično se vezuju za jedan isti aktivirajući enzim (Watson 1977.).

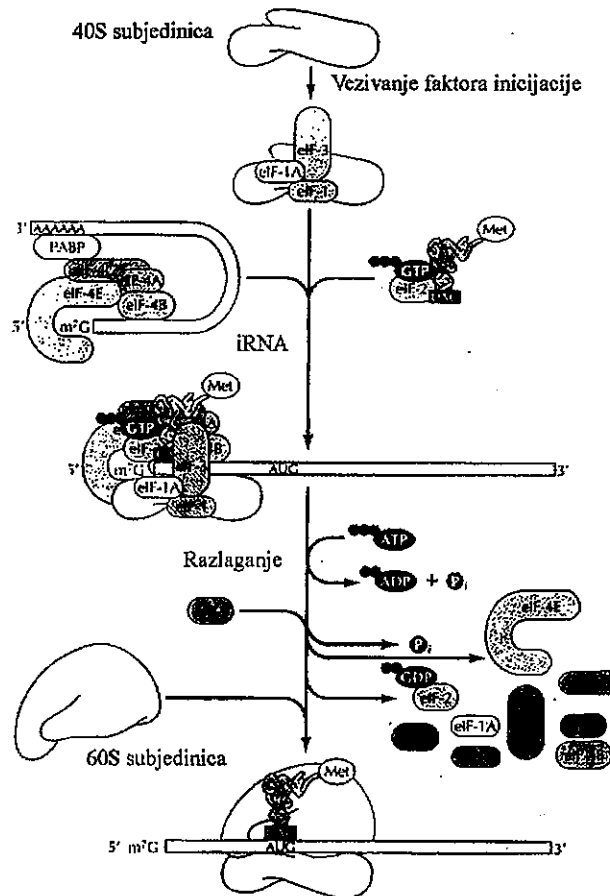
Opšti stadiji translacije su stadiji inicijacije, elongacije i terminacije.



Slika 6.6 Aktivacija amino kiselina aminoacil-tRNA sintetazom. Kroz dva hemijska koraka, enzim katalizuje formiranje esterske veze između karboksilne grupe amino kiselina i 3' OH pripadajuće tRNA. - Amino kiselina i molekula ATP ulaze u aktivno mjesto enzima. Simultano, ATP gubi fosfat i prelazi u AMP vezujući se kovalentno za amino kiselinu. Polifosfat hidrolizira u 2P. - tRNA kovalentno vezuje amino kiselinu, otpušta AMP. Potom se aminoacil -tRNA oslobada od enzima. (Uslužnošću Alberts, B. et al. 1994.)

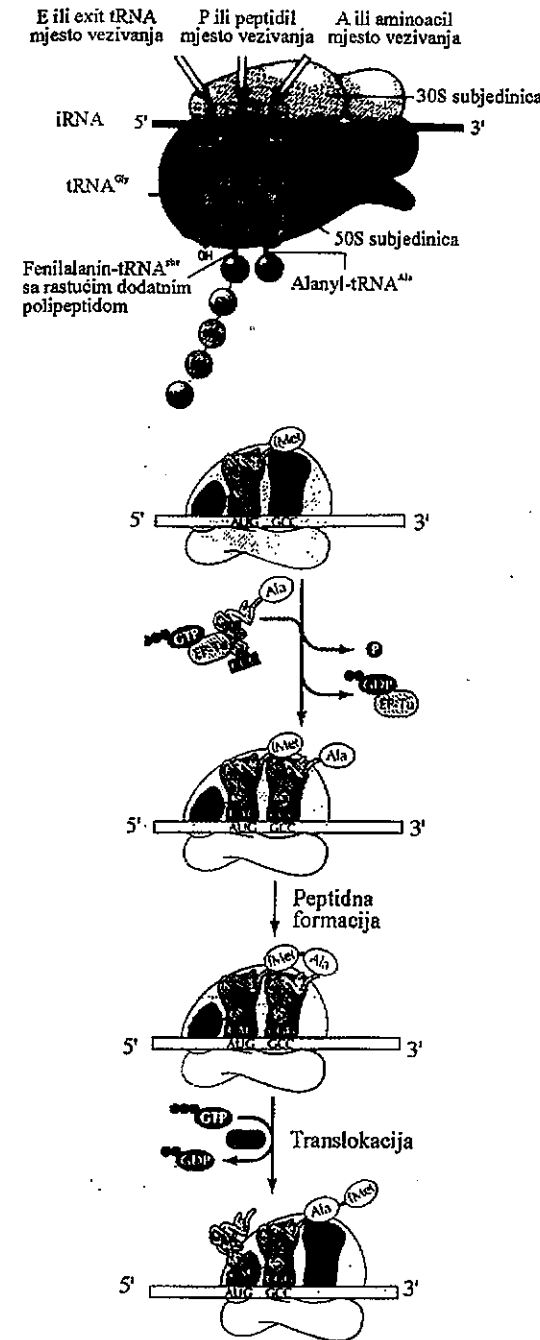
U stadiju *inicijacije* formira se inicijalni kompleks kod eukariota (sl. 6.7): 80S iRNA-metionin tRNA (80S-kompletni ribosom, iRNA za koju se vezuje ribosom, metionin-prva amino kiselina koja se uključuje u proces sinteze sa svojom tRNA). Formiranje inicijalnog kompleksa se odvija postupno uz učešće osnovnih proteinskih faktora: I-F1, I-F2 i I-F3. Proteinski faktor I-F3 formira kompleks I: I=F3-40S-iRNA (mala subjedinica ribosoma vezana za iRNA). Proteinski faktor I-F2 omogućava vezivanje prve aminokiseline metionina za specifičnu tRNA-nastaje kompleks II- F2-40s iRNA-metionin tRNA-GTP. U daljem procesu sinteze za kompleks II vezuje se veća subjedinica ribosoma (60S). U ovom vezivanju proteinski faktor F1 ima ulogu pri čemu GTP prelazi u GDP. Nakon razgradnje GTP-a formira se inicijalni kompleks: 80S iRNA-metionin tRNA.

U momentu formiranja inicijalnog kompleksa tRNA sa metioninom nalazi se u položaju P (peptidno mjesto) na većoj subjedinici ribosoma. Nakon formiranja inicijalnog kompleksa u procesu translacije započinje rast peptidnog lanca-faza elongacije.



Slika 6.7 Inicijacija translacije u eukariotskim ćelijama Inicijalni faktori eIF-3, eIF-2 i eIF-1A vezuju se za 40S ribosomalnu subjedinicu. Prvu amino kiselinu metionin tRNA donosi na ribosom Ribosomi duž iRNA prepoznaju prvi inicijalni kodon AUG. Energija se razgrađuje, ATP prelazi u ADP i P. Kada je inicijalni kodon AUG prepoznat, eIF-5 pokreće hidrolizu GTP vezanog u eIF-2, praćeno otpuštanjem eIF-2 faktora (sastavljen sa GDP) i drugih inicijalnih faktora. Potom se 60S subjedinica spaja sa 40S kompleksom. (Prema Cooper, M. G. 2000.)

U fazi *elongacije* (sl. 6.9) ili fazi rasta polipeptidnog lanca prva amino kiselina formil metionin (kod prokariota) dolazi u P položaj ostavljajući prazno A mjesto. Druga aminokiselinaša tRNA (alanin) dolazi u A mjesto.

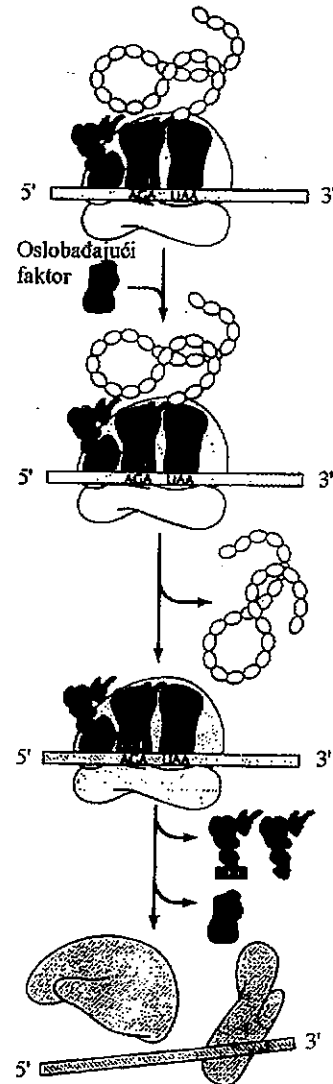


Slika 6.8 Svaki ribosom-tRNA kompleks sadrži tri aminoacil-tRNA mjesta vezivanja. A ili aminoacilno-tRNA mjesto je za vezivanje alanin-tRNA^{Ala} kompleks. P ili peptidil mjesto je za vezivanje fenilalanin-tRNA^{Phe} kompleks, sa rastućim polipeptidom kovalentno vezanim za fenilalanin tRNA. E ili exit- mjesto otpuštanja zauzeto je sa tRNA^{Gly} što prethodi njegovom oslobađanju od ribosoma. (Prema Lodish, H. et al. 2001.)

Slika 6.9 Elongacija u procesu translacije Ribosomi imaju tri tRNA-mjesta vezivanja, označena sa P (peptidilno), A (aminoacilno) i E (exit-mjesto otpuštanja). Prva amino kiselina N-formilmetionil tRNA dolazi na P mjesto, ostavljajući prazno A mjesto. Druga amino kiselina tRNA (alanin tRNA) dolazi u A mjesto nošena kompleksom Ef-Tu (zajedno sa GTP). Prateća hidroliza GTP otpušta faktor Ef-Tu (zajedno sa GTP) sa ribosoma, a alanin tRNA se ubacuje u A mjesto. Potom se formiraju peptidne veze, što rezultira prebacivanjem metionina sa aminoacil-tRNA u A mjesto. Ribosom se potom pokreće tri nukleotida duž iRNA. Ovo pokretanje premješta peptidil (Met-Ala) tRNA u P mjesto i neopterećenu tRNA u E mjesto, puštajući slobodno A mjesto za dolazak sljedeće amino kiseline. Ilustrirani proces kod prokariota je vrlo sličan eukariotima. (Prema, Cooper, M.G. 2000.)

Između ove dvije aminokiseline formira se peptidna veza (metionin-alanin) uz učešće enzima peptidilne transferaze koja se nalazi u samom ribosomu. Ribosom se potom pokreće duž iRNA. Ovo pokretanje prebacuje lančić (metionin-alanin) u P mjesto, a slobodna tRNA otpušta se sa E mjesta ostavljajući tako slobodno A mjesto za sljedeću amino kiselinu sa tRNA (sl. 6.9). Za kraj sinteze peptidnog lanca (za fazu **terminacije**) potrebna su dva uslova: potreban je jedan završni iRNA kodon (UAA, UAG i UGA) i drugo, prisustvo proteinskih faktora R1 i R2. Čelije ne sadrže tRNA aktivatore komplementarne terminacionim signalima-kodonima već imaju "oslobađajuće faktore" koji označavaju signal za terminaciju sin -pot (sl. 6.10). U eukariotskim ćelijama "oslobađajući faktor" prepoznaje tri specifična terminaciona kodona zajedno sa proteinskim faktorima R1 i R2.

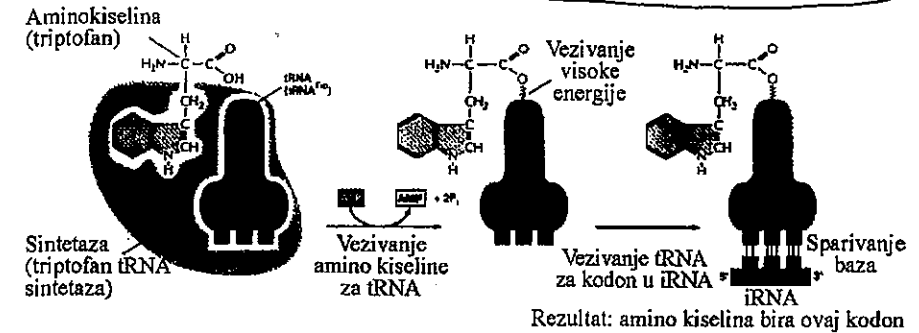
Slika 6.10 Terminacija translacije Kada se sintetise peptidni lanac određene dužine započinje finalna faza sinteze proteina. Tada pristižu terminacioni kodoni iRNA (UAA, UAG i UGA), zatim proteinski faktori otpuštanja (R1 i R2) koji se vezuju za terminacione stop kodone. Time se završava translacija. Kompletan polipeptid je otpušten, a ribosom se disocira u dvije odvojene subjedinice.



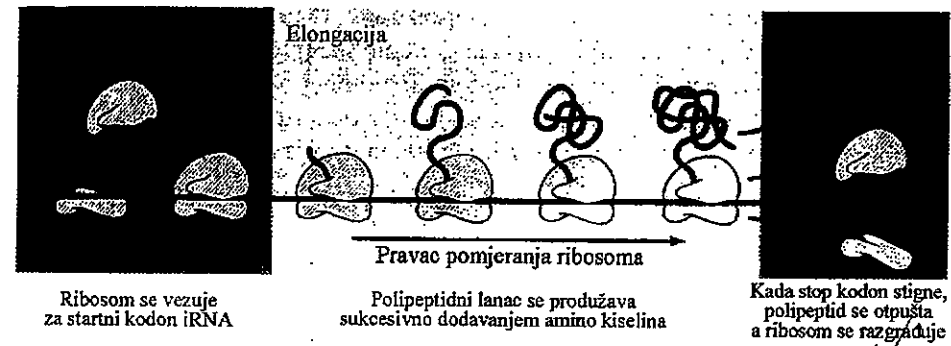
Proteinski faktori se vezuju za terminacione kodone u A mjestu stimulišući hidrolizu veza između tRNA i polipeptida u P položaju odvajajući kompletan polipeptid od ribosoma. Informaciona RNA može simultano vezivati više ribosoma u dužini od 100 do 200 nukleotida. Svaki ribosom van grupe (pojedinačno) funkcioniše nezavisno u sintezi proteina, tj. sintetise odvojen polipeptidni lanac, što znači da svi ribosomi u polisomu funkcionišu simultano.

U zaključku, genetski kod se prevodi preko dva adaptera koji djeluju jedan nakon drugog (vidi sliku 6.11). Prvi adapter je aminoacilna tRNA sintetaza koja sparuje amino kiselinu sa odgovarajućom tRNA. Drugi adapter je sama tRNA molekula čiji antikodon povezuje parove

baza sa odgovarajućim kodonom iRNA. Greška u bilo kojem koraku prouzrokuje vezivanje pogrešne amino kiseline koja se ugrađuje u protein. U prikazanoj sekvenci je odabrana amino kiselina triptofan (Trip) od UGG kodona na iRNA za ugrađivanje u peptidni lanac. Generalno, translacija se dijeli u tri stadija: inicijaciju, elongaciju i terminaciju (vidi sliku 6.12) kada se sintetise polipeptid određene dužine uz učešće specifičnih faktora za svaki stadij (tabela 6.1)



Slika 6.11 Genetski kod se prevodi putem dva adaptera koji djeluju jedan za drugim



Slika 6.12. Tri osnovna stadija translacije: inicijacija, elongacija i terminacija.

Tabela 6.1

Uloga	Translacijski faktori	
	Prokarioti	Eukarioti
Inicijacija	IF-1, IF-2 IF-3	eIF-1, eIF-1a, eIF-2, eIF-2B, eIF-3, eIF-4A, eIF-4b, eIF-4e, eIF-4G, eIF-5
Elongacija	EF-Tu, EF-Ts, EF-G	eEF-1α, eEF-1βγ, eEF-2
Terminacija	RF-1, RF-2, RF-3	Erf-1, Erf-3

REGULACIJA TRANSLACIJE PROČITO

Kako je genska ekspresija u procesu transkripcije regulisana, tako je translacija iRNA, također, regulisana. Jedan mehanizam regulacije translacije je u vezivanju proteina represora čija je translacija vezana za blok specifičnih sekvenci iRNA. Najbolji primjer ovog mehanizma je u eukariotskim ćelijama u regulaciji sistema *ferritin proteina*. Translacija ferritin iRNA je regulisana željezom u ćeliji: ferritin se sintetise u ćeliji u većoj količini ukoliko je u ćeliji više željeza. Vezivanjem ferritina (u odsustvu željeza) za sekvence u 5' netranskripcionom regionu ferritin blokira iRNA translaciju. U prisustvu željeza represor nije dugo vezan za iRNA (željezo odgovorni element) i ferritin -translacija može da se nastavi.

Drugi mehanizam regulacije translacije u eukariotskim ćelijama rezultira ukupnim efektima na ukupne translacijske aktivnosti, specifičnih iRNA, uključujući modulaciju aktivnosti inicijacijskih faktora, kompleksa sa GTP vezanog za inicijator metionin tRNA donijetog na ribosom. Druga grupa proteina translacijskih regulatora su, naprimjer, hormoni-stimulatori protein sinteze. Inzulin djeluje posredno u vrlo maloj količini pri fosforilaciji proteina vezanih za inicijalne faktore što je rezultat stimulacije aktivnosti i povećanja nivoa inicijacije translacije. Poliadenilacija iRNA je, također, važan mehanizam za regulaciju translacije u toku ranog embrionalnog razvoja. Translacija nekih iRNA u toku razvoja može biti regulisana proteinima represorima vezivanjem za specifične sekvence u 3' netranslacionom regionu. Ovi regulatorni proteini mogu, također, direktno djelovati na iRNA u specifičnom regionu jajne ćelije ili embriona omogućujući sintezu kodiranih proteina u toku embrionalnog razvoja.

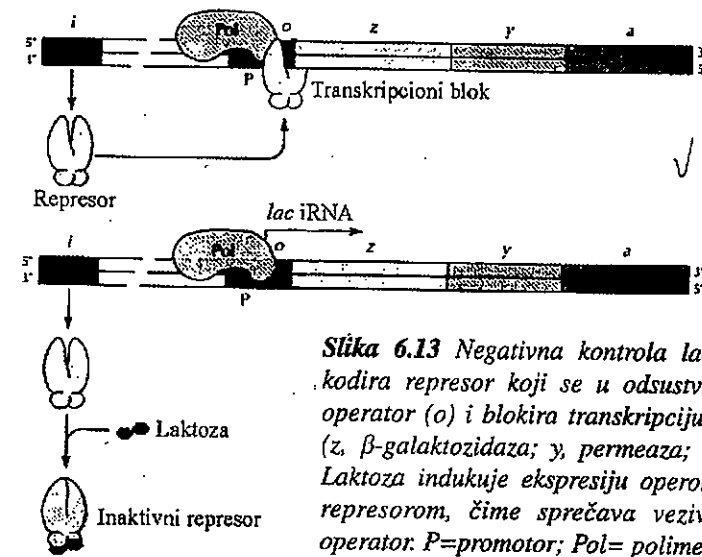
Genetska regulacija translacije (sinteze proteina) PROČITO

U procesu sinteze proteina odlučujuću ulogu ima DNA. Genetske analize su pokazale da je u svakom trenutku aktivno najviše -10-20% DNA u ćeliji. Međutim, iako je količina DNA u svim ćelijama jednog organizma ista, ne sintetisu sve ćelije iste proteine. Naprimjer, ćelije tireoidne žlijezde proizvode hormon tiroksin, crvene krvne ćelije hemoglobin, ćelije pankrasa enzime varenja itd. Unutar date ćelije postoji, također, i veliki broj različitih proteina, jer su različiti dijelovi molekula DNA funkcionalno raznovrsni, pa jedan molekul DNA može kontrolisati sintezu velikog broja hemijski i funkcionalno različitih proteina. Prema tome, moraju da postoje mehanizmi koji će omogućiti selektivnu sintezu ovih proteina koji su najviše potrebni. Istraživanja su pokazala da DNA, iako ima odlučujuću ulogu, sama po sebi ne reguliše aktivnost ćelije ili organizma već su procesi rezultat interakcijskih elemenata i ćelijskih sistema. Na osnovu svojih eksperimenata francuski naučnici Žakob i Mono 1950. su pretpostavili model na osnovu kojeg se reguliše sinteza proteina i koji je postao osnov za dalja rasvjetljavanja regulacije.

Sistem pozitivne i negativne kontrole sinteze proteina (laktozni operon)

Dakle, pionirski studiji gena regulatora u *E.coli* potiču od Žakob i Monoa. Njihova istraživanja bila su bazirana na analizi ekspresije enzima uključenih u metabolizam laktoze koja je upotrijebljena kao izvor energije pri razlaganju laktoze na glukozu i galaktozu. Enzim -galaktozidaza katalizuje razlaganje laktoze dok drugi enzimi uključeni u laktozni metabolizam aktivni su samo kada je prisutna laktoza. Laktoza svojim prisustvom inducira sintezu enzima uključenih u ovaj metabolizam. Enzim -galaktozidaza u laktozni metabolizam uključuje još dva enzima (produkti dva druga vezana gena) to su: laktozna permeaza čija je funkcija transporta laktoze u ćeliju i van ćelije i transacetilaza čija funkcija u laktoznom mehanizmu još nije utvrđena. Ćelije *E.coli* koje rastu na podlozi sa laktozom, obično sadrže oko 3×10^3 molekula, tj. 3% ukupnih ćelijskih proteina. Ovo je količina koja se sintetise pod kontrolom jednog gena na kružnom bakterijskom hromosomu. Međutim, mutacijom može da nastane više kopija ovog gena, pa se kod mutiranih sojeva povećava sinteza -galaktozidaze. Ova supersinteza se postiže na štetu sinteze drugih proteina. Ove ćelije slabo rastu i vode ka mutantima.

Regulatorne sekvence (i) slične operatoru (grupa strukturalnih gena npr. x, y, a) nazvane su Cis-akting kontrolni elementi, jer ispoljavaju ekspresiju samo ove grupe vezanih gena. Na drugoj strani, proteini slični represorima nazvani su transacting faktori, jer mogu da se proizvode sa gena lociranih na drugom hromosomu unutar ćelije. Laktozni operon je primjer negativne kontrole (sl. 6.13), jer vezuje represore (čime se sprečava vezivanje represora za operator) koji blokiraju transkripciju iRNA, te prema tome i sintezu laktoznih enzima (ili uopšte proteina). Međutim, to nije uvijek slučaj, jer mnogi transacting faktori su aktivatori drugih inhibitora transkripcije.



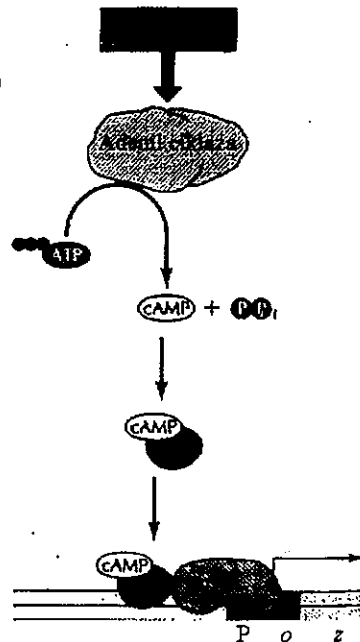
Slika 6.13 Negativna kontrola lac operona. Gen (i) kodira represor koji se u odsustvu laktoze vezuje za operator (o) i blokira transkripciju tri strukturalna gena (z, β -galaktozidaza; y, permeaza; i a, transacetilaza). Laktoza indukuje ekspresiju operona pri vezivanju sa represorom, čime sprečava vezivanje represora za operator. P=promotor; Pol= polimeraza

regulatorna sekvencija

Pozitivna kontrola. Eksperimenti sa bakterijom *E.coli* pokazali su da laktozni operon ima elemente i negativne i pozitivne kontrole (sl. 6.14) sinteze proteina. Naime, najbolji primjer pozitivne kontrole je upravo primjer sa *E.coli*. Kada je bakterija uzgajana na podlozi koja je sadržavala šećer glukozu i laktozu, kao izvor energije, korištena je glukozna, a enzimi laktoznog operona (β -galaktozidaza, permeaza i transacetilaza) nisu sintetisani. Otkriće mutanti *E.coli* uzgajanih, iako na istom hranilištu, pokazalo je produkciju enzima laktoznog operona (grupe strukturalnih gena) čime je dokazan uticaj glukoze na transkripciju. Efekat glukoze je dalje objašnjen. U podlogu sa oba šećera (glukoza i laktoza) dodavan je "ciklin AMP". Dolazilo je do normalne produkcije laktoznog operona (strukturnih gena), tj. njegovih enzima. Znači, glukozna nije direktno djelovala na laktozni operon već je jedan od produkata glukoze snižavao količinu cAMP. Utvrđeno je da se cAMP ("ciklin AMP") vezuje zajedno sa specifičnim proteinom kataboličkim aktivatorom (CAP-catabolite gene activator protein) za promotor operona. Kompleks (cAMP-CAP) stimuliše inicijaciju transkripcije iRNA pomoću RNA polimeraze.

Kompleks stimuliše promotor da efikasije vezuje RNA-polimerazu koja započinje prepisivanje genske upute sve dok ne dođe do terminacijskog redosljeda. Zajednički slijed nukleotida u promotoru važan za vezivanje RNA-polimeraze označen je kao "konsensus redosljed" (za RNA-polimerazu bakterije *E.coli* glasi: TATAAT i zove se TATA slog). Novija istraživanja pokazuju da glukozna (ili neki produkt njenog katabolizma) snižava količinu cAMP, što ima za posljedicu smanjenje inteziteta transkripcije genske šifre (Marinković, 1987; Levin 1997.). U zaključku, glukozni represor je poznat kao pozitivni kontrolni sistem sredine koji čini ciklin AMP (cAMP) koji se vezuje sa proteinskim faktorom (CAP) u kompleks cAMP-CAP, a ovaj stimuliše vezivanje regulatornih sekvenci u operonima (strukturnim genima) odgovornim za metabolizam alternativnih šećera, kao laktoza. Sistem pozitivne i negativne kontrole djeluje usaglašeno, koordinirano čime se uspostavlja normalni mehanizam regulacije genske aktivnosti. Može se zaključiti da se sinteza proteina odvija na nivou transkripcije i na nivou translacije genske informacije.

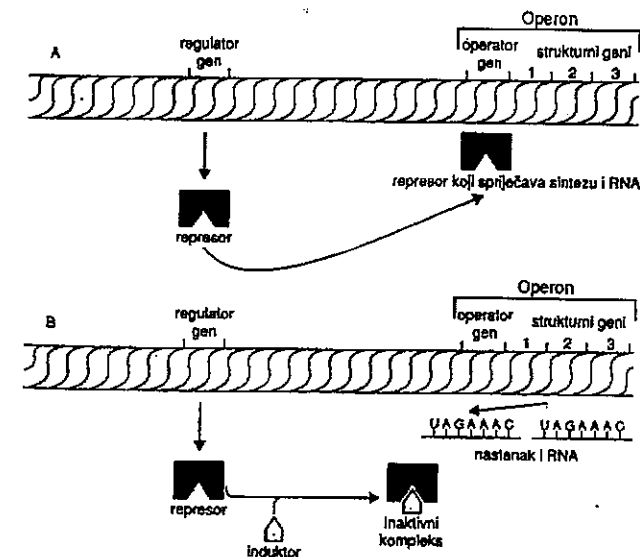
Slika 6.14 Pozitivna kontrola lac operona glukozom. Veliki nivo glukoze aktivira adenilciklazu, koja prevodi ATP u ciklin AMP (cAMP). Ciklin AMP se potom vezuje za katabolički aktivni protein (CAP) i stimuliše vezivanje regulatornih sekvenci različitih operona odgovornih za metabolizam alternativnih šećera, kao laktoza. CAP interakcija sa jedinicom RNA polimeraze aktivira transkripciju.



REGULACIJA SINTEZE PROTEINA NA NIVOU TRANSKRIPCIJE

Kao što smo prethodno izložili Žakob i Mono su pretpostavili postojanje 3 grupe gena: jednu grupu čine susjedni strukturalni geni i oni čine jedan operon, u blizini je redovno gen (i) operator i gen (r) regulator. (vidi sliku 6.15). Operoni (strukturni geni) kodiraju iRNA, tj. određeni protein. Neki operoni sadrže jedan gen, neki dva, a neki i više. Jedan protein represor može da djeluje na tri različita operona. Naprimjer, geni koji su odgovorni za biosintezu arginina u *E.coli* nalaze se na tri različita operona. Gen operator se može nalaziti sa jedne ili druge strane grupe strukturalnih gena, a "otvoren" je dok za njega nije vezan represor i "zatvoren" je kada se za njega veže represor. Regulacija nivoa sinteze odvija se tako što gen regulator upravlja sintezom proteina represora. Na neki način represor služi kao veza između citoplazme i genoma. Sredina i citoplazma daju hemijske signale preko represora strukturalnim genima koji reaguju kroz svoju aktivnost ili neaktivnost. Represor se može vezivati sa malim molekulama, a ovi molekuli su specifični metaboliti označeni kao efektori. Efektori mogu djelovati kao induktori i kao korepresori.

Zapravo, funkcionalno stanje represora određuju korepresori i induktori. Korepresori ne mogu uvijek spriječiti sintezu specifičnih iRNA, jer bi u tom slučaju spriječili i sintezu svojih specifičnih proteina. Usljed toga, represori mogu da budu u aktivnom i inaktivnom stanju zavisno od toga da li su vezani sa svojim odgovarajućim induktorima ili korepresorima. Znači, vezivanjem represora sa induktorom, ovaj ne može da se veže za specifični operator na DNA, aktivira se sinteza odgovarajućeg enzima, a smanjuje se koncentracija aktivnog represora. Nasuprot ovom, vezivanjem korepresora za negativni represor pretvara ga u aktivni oblik. Ovaj se vezuje za odgovarajući operator (koji čini grupa strukturalnih gena) prekida sintezu odgovarajućih molekula iRNA, prema tome, i odgovarajućeg proteina. Dakle, da bi strukturalni geni mogli da vrše sintezu iRNA, tj. spec. proteina, gen operator mora da bude slobodan.



Slika 6.15 Regulacija sinteze proteina na nivou transkripcije prema Žakobu i Monou. (A) Represor sprečava sintezu iRNA. (B) Induktor se vezao za represor i inaktivira ga što omogućava sintezu proteina.

REGULACIJA SINTEZE PROTEINA NA NIVOU TRANSLACIJE

Regulacija genetske aktivnosti u procesu sinteze proteina može da se odvija i na nivou translacije genetske informacije. Naprimjer, biosintezu amino kiseline histidina kontroliše 9-10 strukturalnih gena. Utvrđeno je da se svi ovi geni prepisuju na jednu jedinstvenu iRNA. Utvrđeno je, također, da se enzim kojeg kodiraju ovi strukturalni geni sintetiše u različitim količinama i različitom brzinom. Pokazalo se da strukturalni geni koji se nalaze u blizini gena operatora, determinišu sintezu enzima u većoj količini, ali sa smanjenom aktivnošću. Međutim, geni koji su udaljeni više od gena operatora proizvode manju količinu odgovarajućeg enzima sa većom aktivnošću. Ovu pojavu razlika u količini sintetisanih enzima, kodiranih zajedničkom matricom, autori su nazvali *modulacijom*. Hipoteza o modulaciji tumači pojavu veće količine histidina kodiranu od strukturalnih gena bližih operonu, time što su ti tripleti (kodovi) široko zastupljeni (mnogobrojniji) u genomu ćelije. Mala količina produkta gena daljih od operona je posljedica male koncentracije moduliranih tripleta, što podrazumijeva i malu količinu modulirane tRNA. Znači, aktivnost i represija sinteze proteina može nastati stimulisanjem ili inhibicijom enzima koji modifikuju određene tRNA, prenosiocice amino kiseline do mjesta sinteze. Pretpostavlja se da to mogu biti enzimi tipa metilaza koji mogu transformisati normalne nukleotide tRNA u minorne.

KONSTITUTIVNA SINTEZA PROTEINA

Svi enzimi ne podliježu represiji. Brzina sinteze mnogih proteina nije kontrolisana represorima i induktorima (konstitutivna sinteza). Neki proteini se sintetišu velikom brzinom, a drugi manjom. Ova kontrola se reguliše specifičnim redoslijedom nukleotida u njihovim promotorima na DNA. Neki nizovi nukleotida u promotoru imaju jak afinitet prema RNA-polimerazi, dok drugi slab. To je slučaj sa promotorima represora, jer se sintetišu u malim količinama. Enzimi koji se sintetišu neprekidno, približno istim intenzitetom i katalizuju za život neophodne reakcije, kao što su enzimi uključeni u ćelijsko disanje, nazivaju se konstitutivni enzimi, a proces sinteze konstitutivna sinteza.

Na kraju, kontrola ćelijskog metabolizma može da se ostvari i inhibicijom enzima od strane završnog proizvoda. Metaboliti koji predstavljaju završni proizvod mogu se reverzno vezati za prvi enzim u nizu reakcija i prevesti ga u neaktivni oblik. Pretpostavlja se da se taj završni proizvod-inhibitor veže za drugi dio enzima mijenjajući mu oblik. Enzimi čiji se oblik i aktivnost mijenjaju vezivanjem za druge molekule nazivaju se alosterični enzimi.

Molekularna medicina

Antibiotici i sinteza proteina

Danas se upotrebljava više od hiljadu različitih antibiotika sa pozitivnim efektom u tretmanu bakterijskih infekcija. Klinički efekti se svode na ubijanje bakterija ili inhibiranje njihovog rasta na samom početku djelovanja toksina na čovjeka. Veliki broj klinički efektivnih antibiotika direktno pogada bakterije, ali ne i humane ćelije. Penicilin, naprimjer, inhibira sintezu ćelijskog zida bakterija. Mnogi drugi, zajedno upotrijebljeni antibiotici međutim, inhibiraju različite stupnjeve u sintezi proteina. Neki od ovih antibiotika, uključujući streptomycin, tetracyclin, chloramphenicol, eritromycin su specifični za prokariotske ribosome, a prije svega, su efektivni agensi za tretman bakterijskih infekcija. Drugi antibiotici su inhibitori sinteze proteina i kod prokariota i eukariota, a neki samo kod eukariota. Među tim postoje antibiotik rezistentne bakterije, što je posljedica mutacija, koje u ovom slučaju imaju prednost, pa su mnoge bakterijske vrste rezistentne na jedan, dva ili više antibiotika, tj. multipli rezistentne.

Kontroliše se i vodi optimalna briga pri upotrebi antibiotika koji su bakterijski rezistentni, kao i pri razvoju novih antibiotika u današnjoj medicinskoj praksi.

Antibiotici	Pogođene ćelije	Efekat
Streptomycin	Prokarioti	Inhibitor inicijacije i uzrokuje pogrešno kodiranje
Tetracyclin	Prokarioti	Inhibicija vezivanja aminoacil tRNAs
Chloramphenicol	Prokarioti	Inhibicija aktivnosti peptidil transferaze
Erytromycin	Prokarioti	Inhibicija translacije amino kiseline u sintezi proteina
Puromycin	Prokarioti i eukarioti	Uzrokovanje prijevremene terminacije lanca
Cicloheximide	Eukarioti	Inhibicija aktivnosti peptidil transferaze

MOLEKULARNA DEFINICIJA GENA

Gregor Johann Mendel je prvi pretpostavio postojanje nasljednih faktora ili gena (1865.) na osnovu njihovih krajnjih efekata, dobijenih fenotipova. Corens (1900.), Boveri i Sutton (1904.) utvrdili su vezu između gena i hromosoma, a Morgan je (1911.) dokazao da svaki nasljedni faktor (gen) zauzima određeno mjesto (lokus) na hromosomu. Averi, Mek Lid i Mek Karti (1944.) dokazali su da je gen strukturiran od DNA, a neki virusi i od RNA.

Gen može biti definisan na osnovu analize klasične genetike (komplementarnom analizom) kao mutant fenotipova. Upravo većina takvih mutant definisanih gena djeluju na funkciju proteina. Međutim, neke mutacije djeluju na više sintetisanih proteina, a neke djeluju na samo jedan od dva proteina kodirana sekvencijama iz iste regije DNA. Razumijevanje ovog fenomena zahtijeva poznavanje molekulske strukture gena i mehanizma iRNA sinteze.

U molekularnoj terminologiji gen je uopšteno definisan kao skup sekvenci DNA potrebnih za sintezu funkcionalnog proteina. Prema ovoj definiciji gen obuhvata više stotina protein kodirajućih nukleotida, nazvanih kodirajući regioni. Geni, također, obuhvataju DNA sekvencije potrebne za sintezu partikula RNA transkripta. To su protein ne- kodirajući geni, tj. geni za rRNA i iRNA.

Dakle, gen je dio DNA koji ima sposobnost sinteze funkcionalnog proteina ili RNA molekula.

MOLEKULARNA ORGANIZACIJA GENA

Najveći broj gena eukariota smješten je linealno duž molekula DNA koje čine osnovu hromosoma. Gen je stabilna jedinica nasljedja, ali se povremeno može mijenjati u sekvencijama. Ovakve promjene se nazivaju mutacije. Geni su vrlo različiti po veličini (veličina zavisi od broja nukleotida), strukturi i redoslijedu nukleotida. Međutim, osnovna građa im je jednaka (Alberts et.al.1998.)

Eukariotski geni su strukturirani od kodirajućih sekvencija nukleotida (egsona) i redoslijeda nukleotida čiji se prepisi nalaze u iRNA isprekidani sekvencijama DNA koje ne kodiraju proteine (introni), umetnutih redoslijeda čije prepise iRNA ne sadrži (sl. 7.1). Ovakvu strukturu ima većina gena, što je otkriveno nakon što je pokazano da je iRNA u citoplazmi kraća od gena s kojeg se prepisuje ili primarnog transkripta iRNA u jezgri. U procesu transkripcije prepisuju se egsoni i introni, tako da početni transkript pre-iRNA sadrži prepis cijelog gena. Nakon što se transkribuje prim.- transkript iRNA, postsintetski se obradi pravilnim cijepanjem na granicama ergsona i introna. Nakon cijepanja i odstranjivanja introna egsoni se spajaju pomoću malih jezgrinih molekula RNA (Berger, 1995). Proces se naziva RNA-splajsing ili sazrijevanje RNA molekula (proces prethodno opisan).

Spoj egsona i introna čine karakter redoslijeda nukleotida koji su evolucijski veoma očuvani tako da su u svim eukariotskim ćelijama veoma slični. Ispitivanjem tih redoslijeda izvedeni su "usaglašeni redoslijedi" od kojih najmanje odudaraju redoslijedi nukleotida pojedinih organizama. Najmanje su varijabilni dinukleotidi na granicama egsona i introna i to na 5 prim kraju gdje se nalazi par baza GT, a na 3 prim kraju par baza AG. Ti redoslijedi omogućuju pravilno cijepanje pre-iRNA na granicama egsona i introna.

Broj i dužina egsona i introna razlikuje se u pojedinim genima. Svi eukariotski geni nemaju introne. Rijetko ih posjeduju geni za histone ili geni za interferone, npr. gen za globin sadrži tri egsona i dva introna itd. Geni koji nemaju introna imaju genomsku sekvenciju identičnu sekvenciji iRNA, a isprekidani geni

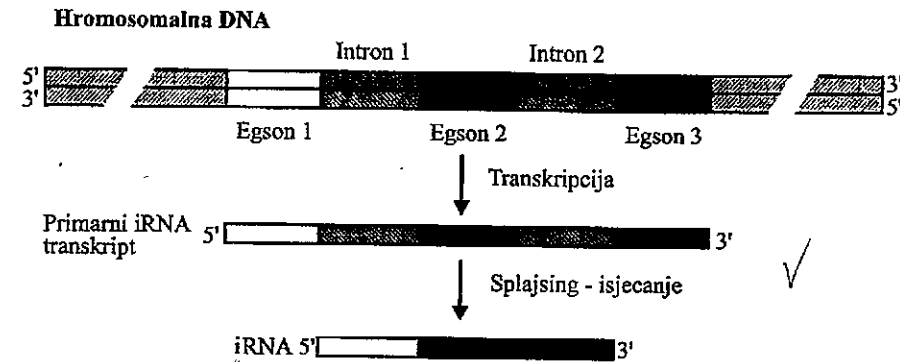
imaju istu strukturu u svim somatskim ćelijama uključujući i gamete.

Kod najvećeg broja gena introni su znatno duži od egsona. Utvrđeno je da su geni sisara daleko više razlikuju u intronskim sekvencijama nego egsonskim.

Prisustvo introna koji se isjecaju na nivou iRNA može biti evolucijska prednost u više eukariota da bi se programirali novi polipeptidi. Naime, introni omogućuju da se egsoni kombiniraju na različite načine i tako evolucijski nastaju novi geni i različite strukture više polipeptida. Alternativnom preradom prim-iRNA transkripta mogu nastati međusobno srodni ili identični polipeptidi (familije polipeptida). Prisustvo introna je nepromjenljiva karakteristika. Introni se, također, nalaze u DNA mitohondrija, kvasca, genomu bakterija.

Egsoni u ribosomalnim genima za rRNA ili tRNA su zastupljeni u građi ovih kiselina, ali ne kodiraju proteine. Egsoni sadrže i redoslijede nukleotida

koji nemaju značenje genetskog koda, npr. redoslijedi nukleotida na početku ispred inicijalnog kodona 5 prim kraju i na 3 prim kraju od terminacionog kodona nazivaju se pseudogeni, evolucijski inaktivirani.

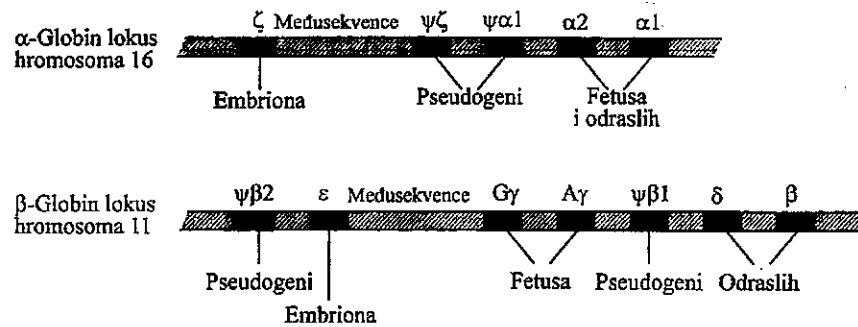


Slika-7.1 Struktura eukariotskog gena. Većina eukariotskih gena sadrže segmente kodirajućih sekvencija (egsone) isprekidane nekodirajućim sekvencijama (introni). I egsoni i introni se transkribuju u prim-transkript iRNA u procesu transkripcije. U postsintetskoj obradi introni se isjecaju iz zrele iRNA (Uslužnošću Richard, R. 2001.)

Protein-kodirajući geni mogu biti usamljeni ili pripadati familiji gena

U više ćelijskih organizama su 25-50 procenata protein-kodirajući ili strukturni geni prezentirani samo u haploidnom genomu i označeni su kao usamljeni geni. Preostali protein-kodirajući geni pripadaju familijama koje sadrže dva ili više sličnih ili identičnih gena. Kopije koje nastaju duplikacijom pretka gena su označene kao duplicirani protein-kodirajući geni. Set dupliciranih gena kodira slične proteine, ali ne sa identičnim amino kiselinama, nazvan je *familija gena*. Slobodne sekvence na krajevima DNA lanca, a koje, također, nastaju duplikacijom pretka gena, nefunkcionalne su i označene su kao *pseudogeni*. Analizirane sekvence su pokazale da pseudogeni imaju očevidno neke egson-intron strukture kao funkcionalni beta-globin geni ili alfa-globin geni, što sugeriše da oni nastaju, također, duplikacijom pretka gena koji je mutacijom u procesu evolucije izgubio genetsku aktivnost. Međutim, sekvencijski drift (slučajnost) u toku evolucije svih sekvenci dovodi do toga da neke sekvence završavaju translaciju u iRNA, dok druge sprečavaju taj proces, pa nastaju ne funkcionalne regije čak iako su bile transkribovane u iRNA. Takvi pseudogeni nisu štetni, ostaju u genomu u označenoj lokaciji dupliciranog gena koji vodi porijeklo od pretka gena.

Kodirani srodni homologni proteini čine **familije proteina**. Poznate su familije proteina, npr. protein kinaza, transkripcijski faktori, imunoglobulina vertebrata, a najveća familija proteina su proteini citosketa. Familija gena za globine hemoglobina najbolji je primjer genskih familija (sl. 7.2). Ovi geni imaju sličnu strukturu. Nalaze se uglavnom na hromosomu 11 i 16. Na hromosomu 16 je pet gena za globin, od kojih su tri funkcionalna i dva nefunkcionalna pseudogena. Na hromosomu 11 su geni za globin, pet funkcionalnih gena i dva pseudogena. Različiti globin geni su vjerovatno nastali duplikacijom pretka gena slično kao rezultat "nejednakog crossovera" u toku rekombinacije u germinalnim ćelijama. U procesu evolucije dvije kopije gena su rezultat akumulacije mutacija. Ponavljanje ovih procesa u evoluciji je rezultiralo savremenim globin-sličnim genima kod ljudi i drugih složenih vrsta danas. Kopije praga su vrlo slične funkcionalnim genima genskog kompleksa kojem pripadaju.



Slika 7.2 Familija gena za globin. Članovi humanih α i β gena se nalaze na hromosomu 16 i 11. Svaka familija obuhvata gene sa specifičnom ekspresijom u embrionalnoj fazi, fetusu i adultnom tkivu, uz nefunkcionalne kopije gena -pseudogene. (Prema Collins et. al. 2000.)

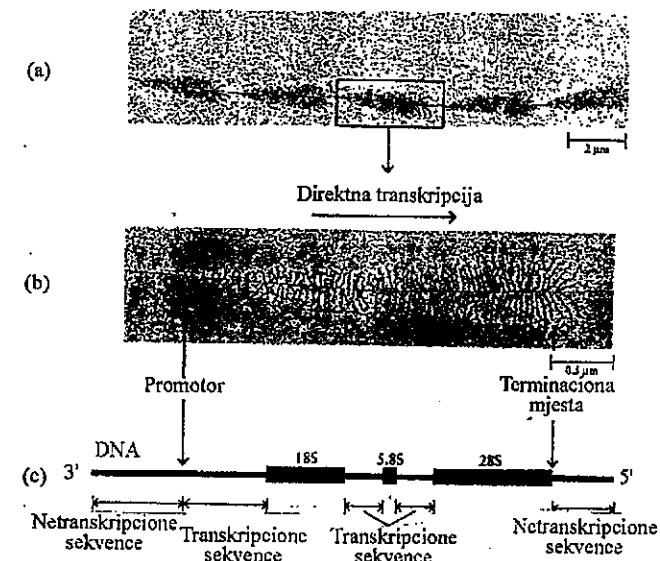
Tandemi ponovljenih gena koji kodiraju rRNAs, tRNAs i histone

U invertebrata i nekih vertebrata kodirajući geni za rRNA, tRNA, histone (familija proteina vezana za eukariotsku nukleolarnu DNA) i neke druge proteine ponavljaju se u tandemima. Jasno se razlikuju od dupliciranih familija gena po multiplim tandemima repetitivnih gena koji kodiraju identične ili približno identične proteine ili funkcionalnu RNAs. Najčešće kopije ovih sekvencija se javljaju van prostora tandemima rRNA ili tRNA gena, svaka kopija je slična drugima. Između transkripcijskih regija tandemima gena nalaze se pojedinačne netranskripcijske regije. Također, velika familija gena za histone nalazi se u dijelu genoma u vidu multiplih identičnih kopija. Poredak tandemima gena za histone je nešto složeniji. Geni se nalaze na hromosomu 7, raspoređeni u pet skupina, prema vrsti histona (Hb_a, Hb_{a2}, Hb₃, Hb₄ i Hb₅), a svaka skupina sadrži 20-40 identičnih primjeraka gena.

Potrebe ćelije za rRNA, tRNA i histone su velike, zato su potrebne multiple kopije gena. Npr. u toku ranog embrionalnog razvoja u ljudi mnoge embrionalne ćelije u toku 24 sata strukturiraju oko 5-10 miliona ribosoma. Za produkciju rRNA u obliku mnogih ribosoma u embrionalnim humanim ćelijama potrebno je najmanje oko 100 kopija prim-rRNA gena i moraju biti blisko locirani i maksimalno aktivni za diobu ćelije svakih 24 sata. Svi karioti obuhvatajući i kvasac sadrže oko 100 ili više kopija gena koji kodiraju pre-5SrRNA, nalaze se na dužem kraku hromosoma 1.

U zaključku, geni za molekule rRNA nalaze se u području nukleolarnog organizatora hromosoma (NOR) 13, 14, 15, 21 i 22 i zastupljeni su u oko 500 primjeraka. (Svaki je od tih gena građen od redosljeda nukleotida za pojedine vrste molekula rRNA (18S, 5.8S i 28S). Geni su razdvojeni nefunkcionalnim sekvencama DNA (sl. 7.3).

Broj kopija gena za pojedinačne tRNA je oko 10-100 primjeraka u haploidnom genomu čovjeka, koje programiraju oko 40-50 različitih molekula tRNA. Konačno, molekule tRNA nastaju postsintetskom obradom znatno većih prethodnika kopija gena.



Slika 7.3 Tandemi ponovljenih gena koji kodiraju rRNAs. Jedan gen kodira tri tipa rRNA molekula (18S, 5.8S i 28S) u eukariotskim ribosomima. Ovaj gen ima multiple kopije i ponavlja se u tandemima (naznačeni dio). (a)Elektronska mikrografija prikazuje pet kopija ovog gena odvojeni netranskripcijskim povezanim sekvencama. (b) Povećan gen i transkripcija RNA prekursor molekula. (c)Enzimski obrada prekursor molekula RNA i transkripcija pojedinačnih sekvenci 18S, 5.8S i 28SrRNA gena. Dijelovi DNA za kodiranje tri rRNA molekule su prikazani u tamnoj boji. (Russel, P.J. 1982.)

Kontrolni geni i geni regulatori

Geni koji sadrže, osim egsona i introna, regulacijske sekvencije čine grupu gena regulatora. U odnosu na protein-kodirajuće ili strukturne gene, geni regulatori imaju molekulska strukturu, ali se razlikuju po funkciji. Ne kodiraju polipeptide niti iRNA, ali zato imaju kontrolnu i regulatornu funkciju u ovim procesima. Npr. u genu kao transkripcionoj jedinici sadržano je četiri skupine regulatornih elemenata: promotori, genski pobudivači (enhancer elementi), smirivači i mjesta koja određuju završetak transkripcije, elementi terminatori. Svi ovi elementi čine gen kao funkcionalnu jedinicu-cistron. Promotori regulacijskih sekvenci omogućavaju prepis iRNA koja se prevodi u jedan protein (monocistronska iRNA). U ćelijama prokariota gen operator i gen regulator omogućava prepis sa nekoliko strukturnih gena koji nemaju introna nego se nadovezuju jedan na drugi. Nastaje dugačka iRNA (policistronska iRNA koja predstavlja prepis s nekoliko uzastopnih gena) čiji su produkti proteini funkcionalno povezani u nekom bakterijskom procesu. Promotor je sekvencija DNA za koju se vezuje RNA-polimeraza. Aktivnost promotora može biti pojačana prisustvom druge sekvencije koja se zove enhancer (enhancer-pojačivač). Genski pobudivači su smješteni nizvodno, za razliku od promotora, na različitoj udaljenosti. Na genske pobudivače djeluju posredno preko različitih regulacijskih proteina faktori koji pobuđuju gensku ekspresiju, kao steroidi i tireoidni hormoni. Genski smirivači su redosljedi nukleotida za koje se vezuju regulatorski proteini i potiskuju aktivnost gena. Enzim RNA polimeraza se u procesu transkripcije pomiče po DNA sve do terminacijske sekvencije-terminatora. Terminator je palindromska DNA koja uzrokuje pucanje hidrogenskih veza između DNA i RNA, nakon čega se RNA lanac oslobađa i odvaja od DNA molekula. Proces sinteze proteina, također, regulisan je grupom gena regulatora, operatora ili, isto tako, proces diferencijacije genetske aktivnosti u procesu embriogeneze.

Regulacija genske ekspresije u eukariotskim ćelijama

Osnovni model regulacije genske aktivnosti predložili su Britten i Davidson. Na osnovu modela protumačena je genska regulacija diferencijacije genetske aktivnosti u procesu embriogeneze. Po ovom modelu strukturni gen se nalazi pod pozitivnom kontrolom receptorskog mjesta na 5 prim položaju. Receptorsko mjesto reaguje na aktivator što je obično molekula RNA, ali može biti i neki protein. Molekule aktivatori se sintetiziraju s intergrator gena pored kojeg se nalaze kontrolni elementi senzori. Senzori reaguju na signale ćelije i molekule koje kontrolišu gensku ekspresiju, npr. hormoni.

Pod pojmom genske ekspresije podrazumijeva se aktivirani gen čiji je finalni produkt njegove aktivnosti funkcionalni protein u ćeliji. U ćeliji može biti prisutan i nefunkcionalni protein nastao usljed mutacije gena kada se ne može identificirati ekspresija gena. Da li će neki gen rezultirati proteinom ili ne, ovisi

o regulaciji na više nivoa. Prvi nivo je transkripcija gena koja ovisi o regulacijskim sekvencijama gena, promotora i enhancer sekvencija, o metilaciji tih regulacijskih mjesta, o strukturi hromatina ćelija. Na mjestima kondenzacije hromatina neće doći do transkripcije za razliku od despiraliziranog razvučenog hromosoma, odakle se geni nesmetano prepisuju. Drugi nivo regulacije je poslije transkripcije ili posttranskripcijska regulacija na nivou splajsinga i postsintetske obrade (isjecanja introna) iRNA. Posttranslacijska regulacija nastupa nakon sintetiziranog proteina, uz citoplazmatsko biohemijske procese koji ga upotpunjuju (Watson, 1987.)

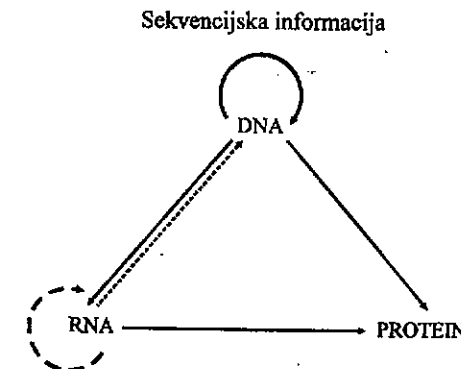
Ekspresija genske informacije

Geni determinišu strukturu proteina, koji se uključuju direktno u ćelijski metabolizam kroz aktivnost enzima. Identifikacija DNA kao genetskog materijala i objašnjenje strukture ukazuje na to da je genetska informacija sadržana u redosljedu baza (A, T, G, C) u DNA molekulama. A sekvence nukleotida baza DNA određuju specifični raspored amino kiselina u proteinu.

Informacija o redosljedu nukleotida u DNA prenosi se preko iRNA do mjesta sinteze proteina. Ova karakteristika iRNA ukazuje na to da je put za prenos genetske informacije poznat kao *centralna dogma molekulske biologije*.

Time je jednostavno rastumačena relativna ovisnost građe triju najvažnijih makromolekula biološkog sistema: DNA i RNA kao nosioca informacije i proteina kao funkcije svake ćelije. Francis Krik je (1958. i 1970.) rastumačio svoju ideju o prenosu sekvencijske informacije, tj. informacije sadržane u linealnom redosljedu nukleotida DNA i RNA, odnosno amino kiselina u proteinima. Opšti tipovi prenosa mogu se sažeti (sl. 7.4):

DNA - DNA - replikacija ili udvostručavanje DNA
 DNA - RNA - prepisivanje ili transkripcija genske upute
 RNA - protein - prevodenje ili translacija genske upute ili
 DNA → RNA → PROTEIN



Slika 7.4 Centralna dogma molekulske biologije (Prema Kriku, 1970.)

Osim ovih opštih, postoje i specijalni tipovi prenosa informacije koji se dešavaju u posebnim okolnostima, kao kada RNA daje RNA ili kada RNA daje DNA i, nakraju, kada DNA daje direktno

ptotein. U prva dva slučaja radi se o infekcijama RNA-virusa. Treći tip utvrđen je u rijetkim okolnostima, kao što je bestanični sistem. Jedino nije moguć prenos informacije sa proteina na RNA ili DNA. Na kraju, postoje proteini prioni koji se mogu reprodukovati, a ne sadrže genetski materijal.

Fenotipska ekspresija gena

Aktivnost gena kao jedinice nasljedna karakterišu posebna svojstva, jedno od tih je fenotipska ekspresija. Kada se dva gena sa različitom fenotipskom ekspresijom nađu zajedno u zigotu, a fenotipski se ispolji samo jedan gen, to svojstvo je dominantno u odnosu na drugo svojstvo koje ostaje neispoljeno u fenotipu i označeno je kao recesivno. Recesivna svojstva se ispoljavaju samo u homozigotitetu. Recesivno svojstvo može biti fenotipski ispoljeno ukoliko je determinisano samo jednim recesivnim genom u slučaju ako mu nedostaje dominantni alel, što je čest slučaj kod haploidnih organizama. Dominantnost i recesivnost su u velikoj mjeri relativne kategorije budući da postoje genetski mehanizmi koji su u stanju da modifikuju dominantnost ili recesivnost nekog gena. Pored toga, jedan gen je *dominantan* u odnosu na određenu osobinu. Ali, ako taj isti gen učestvuje u determinaciji više osobina, on može za jednu osobinu biti dominantan, a za drugu *recesivan* ili obrnuto. S biohemijskog gledišta dominantan je onaj gen koji ispoljava svoju funkciju, odnosno koji uslovljava sintezu specifičnog proteina. U odnosu na dominantni gen, recesivni gen je inaktivan, jer on ne kodira sintezu proteina.

Kako je prethodno navedeno, dominantni i recesivni geni mogu biti izmijenjeni pod uticajem neallelnih gena. Takvi se geni nazivaju modifikatori. Ako geni modifikatori stimulišu dejstvo osnovnog gena, nazivaju se intezifikatori. Ako geni modifikatori koče dejstvo osnovnog gena nazivaju se supresori. Dominantnost i recesivnost, također, mogu biti izmijenjeni pod uticajem faktora spoljašnje sredine. Geni mogu uticati kako na povećanje tako i na smanjenje životne sposobnosti sve do letalnog efekta. Takvi geni su označeni kao letalni.

Letalni geni mogu imati dominantan ili recesivan fenotipski efekat. Recesivni letalni geni proizvode letalan efekat samo u homozigotitetu, a dominantni i u homozigotitetu i heterozigotitetu. Letalni geni mogu da se nalaze u gametama (gametno letalni) ili u oplodnom jajetu (zigotno letalni). U prvom slučaju, letalni efekat se ispoljava već u haploidnim gametama, a u drugom slučaju u diploidnom stanju. Pored apsolutno letalnih gena, postoje i geni koji mada nemaju uvijek letalni efekat mogu da izazovu teške poremećaje organizma. Oni uslovljavaju smrt samo malog broja defektnih osoba. Druge jedinice sa takvim genima sposobne su da žive dugo i da ostavljaju potomstvo. Ovi geni su označeni kao subletalni, npr. gen za hemofiliju ili gen za Xerodermu pigmentozum i druge bolesti.

MUTACIJE GENA

U klasičnoj genetici novi nasljedni oblici živih organizama nastaju kao rezultat spontanih hemijskih promjena molekula DNA i promjena struktura i broja hromosoma. Prema tome, osnovne kategorije mutacija su: mutacije gena, mutacije hromosoma i uopšte mutacije genoma. Ako mutacije uzrokuju promjene somatskih ćelija (multicelularnih organizama) i ne prenose se na potomstvo, govori se o somatskim mutacijama, mutacije u spolnim ćelijama se prenose na potomstvo i to su germinativne mutacije.

Mutacije gena su znatno češće i mnogo su važnije za evoluciju. Genske mutacije mogu da zahvate samo jedan dio sekvencije DNA jednog gena, dovodeći do supstitucije para baza, dodavanja ili delecije-gubitka jednog od više pari baza. To su veoma slične promjene koje se javljaju i kao greške tokom replikacije DNA, što sve dovodi do promjene genetske šifre, što opet vodi nastanku novih gena, novih alela.

Opisani su mnogi primjeri mutacije dominantnog gena u recesivni (A-a)-direktna mutacije ili mutacije recesivnog u dominantni (a-A)-povratne ili reverzne mutacije. Kako su aleli alternativne forme jednog gena, smatra se da aleli nastaju mutacijom izvjesnog ishodišnog oblika gena ("divlji tip gena"), otuda postoje dvije forme alela: mutirana forma alela i nemutirana forma. Mutirani aleli čiji je fenotipski efekat sličan, ali je slabije izražen od efekta "divljeg tipa" označen je kao hipomorfni. Mutirani alel koji je fenotipski neaktivan u odnosu na alel "divljeg tipa" je amorfan. Mutanti koji produkuju veći fenotipski efekat u odnosu na "divlji tip" su hiper-morfni. Mutanti koji produkuju nove fenotipske efekte su neomorfni.

Kako smo prethodno naveli, mutacije su promjene hemijske strukture, promjene organizacije sekvenci nukleotida DNA i one se dašavaju na različite načine.

Supstitucije dovode do zamjene jednog para baza drugim parom baza dodavanjem ili oduzimanjem jednoga ili više parova baza. Npr. par baza AT može biti supstituiran parom baza GC.

Tranzicije su specifičan tip supstitucija para baza koje dovode do promjena hemijske strukture DNA, zamjenom jednog purinskog para baza drugim purinskim parom baza. Moguća se četiri tipa: AT-GC, GC-AT, AT-CG i CG-TA.

Transverzije su drugi specifičan tip supstitucija para baza koji dovodi do promjene hemijske strukture DNA time što zamjenjuje purinski par baza sa pirimidinskim parom baza npr.: AT-TA, GC-CG, AT-CG i GC-TA. Umjesto supstitucije može se dogoditi da se neka baza greškom udvostruči (duplikacija) ili se neka baza može dodati (adicija) ili se neka baza može izgubiti (delecija), odnosno da se pogrešno dislocira i time se rearanžira normalna sekvencija, tj. promijeni se normalni redoslijed baza u tripletima DNA lanaca. Prema načinu na koji supstitucija baza utiče na izmjenu redoslijeda amino kiselina, mutacije mogu biti misens (pogrešne) i nonsens (besmislene).

Misens mutacije su promjene kod kojih se par baza mijenja u DNA uzrokujući promjene iRNA, nakon čega ova kodira drugu amino kiselinu uključujući je u peptidni lanac, što je slučaj sa bolesnicima koji imaju anemiju srpastih eritrocita.

Besmislene mutacije i nepotpuni peptidni lanci su supstitucije koje dovode do zamjene jednog para baza u DNA nakon čega se mijenja tRNA kodon u jedan od tri besmislena ili terminaciona kodona (UAG, UGA i UAA) koji ne kodiraju niti jednu amino kiselinu, označene su kao besmislene mutacije. Besmislene mutacije proizvode nepotpune polipeptide zavisno od mjesta mutacije u DNA. Ako je mutacija na početku strukturalnog gena, onda je polipeptidni lanac u vidu kratkog polu-fragmenta koji je biološki nefunkcionalan.

Frame shift mutacije nastaju usljed pomicanja jednog od lanaca DNA u odnosu na drugi lanac DNA u procesu replikacije. Sve to remeći normalan put genske ekspresije genetske informacije u procesu translacije. Prenosi se pogrešna informacija i ugrađuju neodgovarajuće amino kiseline tj. sintetišu se nefunkcionalni proteini.

Supresije nastaju kao rezultat promjena istog gena i označene su kao unutargenske supresije i mogu nastati kao rezultat dejstva sasvim drugog gena na mutirani gen čiju ekspresiju pratimo i tada govorimo o genskim supresijama. U tom slučaju supresorni geni ne dovode do izmjene u redoslijedu nukleotida gena na koji utiču već izazivaju promjene u ponašanju tog gena. U osnovi razlikuju se tri načina djelovanja supresornih gena: uspostavljanje nekog drugog puta biosinteze koja je inače blokirana direktnom mutacijom gena, aktiviranjem izmijenjenog polipeptida koji je sintetisan pod kontrolom mutiranog gena i supresija na nivou translacije genetske informacije.

Delecije se javljaju kao posljedica gubitka parova baza ili sekvenci gena usljed jednostrukih ili dvostrukih prekida lanca DNA. Jedna od čestih hemoglobinopatija koja nastaje kao posljedica mutacija tipa delecija jeste bolest talasemija α i β .

Duplikacije su posljedica prekida koji dovode do dupliciranja gena i genskih sekvenci.

HEMIJSKI I FIZIČKI MUTAGENI

Svake godine spisak hemijskih mutagena je sve duži i duži i sadrži veoma različite hemikalije kao što su formaldehid, uretan, akridinske boje, nitro-kiseline, vinil-hlorid, soli azota, iperit i dr. Hemijski mutageni mogu djelovati direktno ili indirektno. Do ovoga dolazi zbog sposobnosti organizma da stvara antimutagene koji djeluju suprotno mutagenima. Takav jedan prirodni antimutagen je enzim katalaza. Kod nekih organizama nije bilo moguće izazvati mutacije sa vodonik peroksidom, jer je u ćelijama bio veliki sadržaj katalaze. Dodavanjem kalijevog cijanida koji inaktivira katalazu uspješno se dobili mutacije.

Neki mutageni djeluju pri replikaciji DNA, kao što su bazni analozi. Naprimjer, **5-brom uracil (BU)** Atom broma djeluje tako što u spoju sa pirimidinovim prstenom narušava ravnotežu u reakciji keto-enolnih formi. U prisustvu broma povećava se formiranje enolne forme. U ovoj reakciji keto forma BU vezuje se za adenin, a enolna forma za guanin. U prvoj replikaciji BU ulazi u sastav novog lanca

DNA u keto formi u drugoj replikaciji u enolnoj formi, konačno, poslije tri replikacije dolazi do tranzicije AT u GC. 2-amino-purin se vezuje sa timinom. Do zamjene baza dolazi samo ako se u drugoj replikaciji DNA purin veže sa drugacijom bazom u odnosu na prvu replikaciju, pa se javlja tranzicija GC u AT. Interkalirajući agensi (proflavin ili akridin oranž) su mutageni koji, također, djeluju pri replikaciji DNA. Ovi molekuli se ugrađuju između susjednih baza i dovode do deformacije lanca DNA ili, pak, prilikom sljedeće replikacije u novosintetisani lanac ugrađuje se nova baza. [Ili dolazi do gubitka baze (delecije) jednog ili više nukleotida. Ove promjene u broju nukleotida mijenjaju strukturu genetskog koda. U interkalirajuću grupu agensa spadaju još adrijamicin, aktinomicin D i dr.]

Mutageni koji indukuju direktne promjene na DNA su modifikatori baza. Naprimjer, **azotasta kiselina (HNO₂)**. Ova kiselina može da dovede do gubitka amino grupe iz adenina, guanina ili citozina, pa nastaju neprirodne baze od citozina-uracil, od adenina-hipoksantin, a od guanina-ksantin. Kada se ne bi odstranjivale iz DNA, neprirodne baze bi u osnovi promijenile gensku uputu. Azotasta kiselina najčešće dovodi do promjena tipa tranzicija GC u AT. **Hidroksilamin (HN₂OH)** u neutralnim i slabo kiselim rastvorima vezuje OH grupu za NH₂ grupu citozina, što dovodi do tautomerne promjene i zamjene citozina timinom, tj. GC u AT. Grupa hemijskih mutagena, kao što su alkilirajući agensi, može da pored modifikacije purinskih i pirimidinskih baza dovede do vezivanja DNA lanca. Radi se o unakrsnom vezivanju metil ili etil grupe za purine (guanin ili adenin), nakon čega može doći do hidrolize veze između purina i deoksiriboze i njihovog gubitka. Takvo povezivanje sprečava normalnu replikaciju DNA, jer nastupaju različite mutacije kao što su tranzicije i transverzije. Među agensima koji indukuju ovakve promjene prvobitno je bio otkriven nitrogen mustard-derivat bojnog otrova iperita u kojem je atom sumpora zamijenjen CH₃N skupinom.

Mutageni koji djeluju indirektno na sintezu DNA predstavljaju posebnu grupu hemijskih supstanci (kao uretan, aminouracil i druge) koje imaju sličnu hemijsku strukturu. Pod uticajem uretana i sličnih supstancija dolazi do velikih promjena u DNA tipa delecija i translokacija hromosoma.

Fizički mutageni zauzimaju značajno mjesto, posebno jonizujuće zračenje. Nakon izlaganja organizama jonizujućem zračenju, apsorbirana energija može indukovati promjene makromolekula u ćeliji. Ove promjene su veoma štetne po organizam a mogu dovesti i do smrti ćelije. Broj štetnih mutacija zavisi od vrste jonizujućeg zračenja (X-zruci ili rendgenski i drugi), upotrijebljene doze kao i vremenskog perioda u kojem se organizam izlaže zračenju. Naprimjer, akutne doze zračenja (primljene odjednom) indukuju četiri do pet puta više mutacija nego ista doza kada se daje od nekoliko puta (hronična doza).

Rendgensko zračenje dovodi do prekida polinukleotidnih lanaca. Prelomi obično nastaju na mjestu vezivanja fosfata i šećera. Prekidi mogu zahvatiti jedan ili oba lanca DNA ili može doći do modifikacije purinskih ili pirimidinskih baza.

Ultravioletno zračenje dovodi do potpuno drugačijih promjena u DNA. Ovo zračenje nema značaja za buduće generacije, jer ne obuhvata germinativne ćelije. Djeluje uglavnom na komponente koje ih dobro apsorbuju, kao pirimidinske baze. Najveće promjene u DNA indukuju UV zraci talasne dužine preko 2.500Å. UV zraci mogu dovesti do razaranja lanca DNA, lokalne denaturacije, hidratacije pirimidinskih baza (npr. u citozin se pod dejstvom UV zračenja može ugraditi molekul vode, čime se mijenja njegova struktura) i obrazovanja dimera pirimidinovitih baza. UV zračenje, također, indukuje fotoprodukt. Ova deformacija se formira između dva pirimidinova prstena u istome lancu DNA, pri čemu pirimidin na jednom kraju (3prim) gubi svojstvo "normalnog" slova genske upute. Mnogi lijekovi iz grupe visokotoksičnih farmaka, antibiotici, citostatiki sadrže toksične supstancije i dokazano je njihovo mutageno djelovanje.

GENI I GENSKE BOLESTI

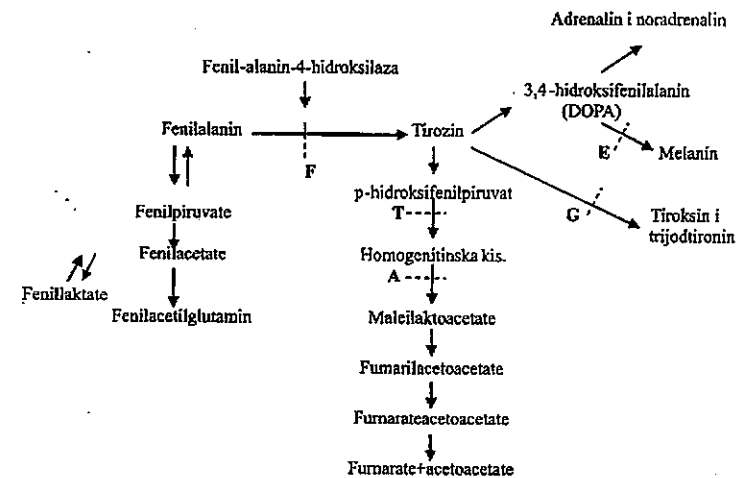
Metaboličke bolesti su posebna vrsta genskih bolesti, to su brojne tzv. nasljedne metaboličke bolesti. Ove se bolesti nasljeđuju po jedinstvenim Mendelovim zakonima (monogensko nasljeđivanje). Na osnovu proučavanja alkaptonurije, albinizma i cistinurije, Archibald Garrod početkom prošlog vijeka zaključio je da su neke bolesti u čovjeka uzrokovane smanjenom aktivnošću ili potpunim nedostatkom nekog enzima koji katalizuje jednu fazu nekog metaboličkog procesa. U kliničkoj genetici poznato je preko hiljadu različitih poremećaja uslovljenih promjenama u strukturi DNA, tj. mutacijama. Mutacije DNA uzrokuju promjene u strukturi i funkciji proteina, što se uglavnom odnosi na fiziološki aktivne materij enzime, hormone, fermente ili vitamine. To dovodi do poremećaja funkcije ćelije, organela ili organa.

Promjene u strukturi DNA i genske bolesti javljaju se kao posljedica svih vrsta mutacija: delecija, duplikacija, misens mutacija i drugih. Sve ove mutacije dovode do promjene strukture određenog proteina, do izostajanja određene enzimske reakcije, često do smanjenja njegove aktivnosti, čak može i da nedostaje. Genske bolesti kod kojih je presječen metabolički put zbog promijenjene aktivnosti enzima su npr. bolesti sa poremećenim metabolizmom amino kiselina, ugljenih hidrata. Presječen metabolički put npr. u organelama lisosomima je usljed nedostatka jednog od niza hidrolitičkih enzima, što je slučaj sa Pompeovom bolesti itd.

Fenilketonurija (F) je jedna od dobro proučenih genskih bolesti kod koje je poremećen metabolički put (opisana u prvom poglavlju). Javlja se kao posljedica mutacije gena odgovornog za sintezu enzima fenil-alanin-4-hidroksilaza. Ovaj enzim prevodi esencijelnju amino kiselinu fenil-alanin u tirozin, što se odigrava u jetri. Usljed mutacije, tj. poremećaja aktivnosti ovog enzima dolazi do povećane koncentracije fenil-alanina u tjelesnim tečnostima (krvnoj plazmi, cerebrospinalnoj tečnosti, urinu). Osim fenil-alanina, povećana je i količina fenil-piruvične kiseline,

fenil laktične i drugih derivata fenil-alanina (vidi sliku 7.5) Ukoliko ne dođe do mutacije gena odgovornog za sintezu enzima tirozinaze (fenil-alanin-4-hidroksilaze) odgovornog za hidroksilaciju fenil-alanina u tirozin, proces će se odvijati normalno, fenil-alanin hidroksilira u tirozin. Sam tirozin dalje biva pretvoren u 3,4-dihidroksi-fenil-alanin (DOPA) pomoću drugog enzima. Ukoliko dođe do mutacije gena koji determiniše sintezu ovog enzima, tirozin neće preći u DOPA. Usljed toga suvišni tirozin biva degradiran u ugljen-dioksid i vodu, što dovodi do formiranja i nakupljanja-hidroksifenilpiruvične kiseline. Ako u daljem procesu dođe do mutacije gena koji je odgovoran za sintezu enzima oksidaze, neće se moći p-hidroksifenilpiruvična kiselina prevesti u homogenitinsku kiselinu, doći će do tirozinoze (T). U slučaju da se ne dogodi ova mutacija, pa se p-hidroksifenilpiruvična kiselina prevede u homogenitinsku kiselinu, zato nastupi mutacija gena koji kontroliše sintezu enzima (oksidaza) pod čijom se kontrolom homogenitinska kiselina prevodi u acetoacetičnu kiselinu, nastupit će alkaptonurija (A). Usljed velike količine homogenitinske kiseline urin alkaptonuričara brzo na vazduhu poćmi.

U daljem procesu metabolizma fenil-alanina u boćnom lancu mogu nastupiti još sekundarne biohemijske devijacije. Naveli smo da je sam tirozin prethodnik hormona tiroksina i trijod- tironina. Ako u ovom lancu dođe do mutacije odgovornog gena za određeni enzim, pod čijom kontrolom se sintetišu navedeni hormoni, doći će do teškog oboljenja (*genetski strumozni kretinizam*) (G) koje karakteriše fizićka i mentalna zaostalost i hipertrofija tireoidne žlijezde. Ili, ukoliko tirozin normalno prede u DOPA, a ovaj je direktni prethodnik formiranja tamnog pigmenta melanina, normalno se melanin sintetiše putem jednog enzimskog sistema "tirozinaza" koji je prisutan u melanocitima. Nakon mutacije gena koji determiniše sintezu jednog od ovih enzima ne sintetiše se normalni pigment melanin, što uzrokuje *albinizam* (E).



Slika 7.5 Genetski poremećaji metabolizma fenil-alanina i srodnih spojeva: F-fenilketonurija, T-tirozinoza, A-alkaptonurija, G-genetski strumozni kretinizam i E-albinizam.

Galaktozemija, ova se genska bolest manifestira već u prvim danima života. Dijete zaostaje u razvoju, a kasnije se ispoljava mentalna zaostalost, katarakta i ciroza jetre. Anomalija je uslovljena deficitom enzima (galaktoza-1-fosfat transferaza) neophodnog za metabolizam šećera galaktoze u glukozu. Kod djeteta kod kojeg nedostaje ovaj enzim ne razlaže se galaktoza već se akumulira u krvotoku. Nedostatak enzima transferaze je posljedica mutacije recesivnog gena na autosomima, pa se galaktozemija ispoljava samo kod homozigotnih individua za ovu anomaliju. *Cistinurija* jeste anomalija izražena u obliku stalne ekskrecije velike količine cistina u mokraći. Kako je cistin nerastvorljiv u tjelesnim tečnostima, dolazi do njegovog taloženja u bubrezima i formiranja kamenca. Pojačano izlučivanje cistina sa mokraćom nastupa usljed blokade i poremećaja aktivnog transporta kroz membranu. Ovu anomaliju uslovljavaju mutacije jednog od tri različita autosomalna gena, recesivna po funkciji. *Hemofilija* je bolest kod koje je genska analiza pokazala različite genske poremećaje: delecije, insercije, tačkaste mutacije ili misens mutacije koje dovode do poremećaja faktora koagulacije VIII. Ili, u porodica sa hiperkolesteronemijom (Fhk) ustanovljen je niz mutacija (delecije u različitim dijelovima gena, insercije, misens mutacije). Do poremećaja funkcije *LDL-receptora* dovode mutacije. Dolazi do prestanka sinteze LDL-receptora, remeti se prenos receptora kroz endoplazmatski retikulum, vezivanje LDL-a i receptora kao i poremećaji u endocitozi receptora. Posljedica je dvostruko, trostruko povećanje holesterola u plazmi. *Hemoglobinopatije* obuhvataju grupu bolesti koje se javljaju kao posljedica promjene strukture hemoglobina ili imunoglobulina usljed mutacija tipa supstitucije parova baza, što je slučaj sa anemijom srpastih eritrocita. U ovom slučaju supstitucija para baza dovodi do promjena DNA uzrokujući promjene iRNA, nakon čega ova kodira drugu amino kiselinu uključujući je u peptidni lanac. Lanac hemoglobina sadrži u svom sastavu amino kiselinu glutamin u položaju 6-lanca hemoglobina, a kodira je GAG kodon. Kad se zbog mutacije DNA mijenja kodon iRNA u GTA, tRNA prepoznaje ovaj izmijenjeni kodon i glutaminsku amino kiselinu zamjenjuje amino kiselinom valin. Ova supstitucija jedne amino kiseline drugom prouzrokuje stvaranje defektnog hemoglobina "S" (HbS umjesto HbA) kod bolesnika koji imaju za posljedicu bolest *anemiju srpastih eritrocita*. Međutim, talasemija α i β su bolesti koje se javljaju kao posljedica drugog tipa mutacija-delecija. U slučaju talasemije najčešći uzrok je delecija α -globina. Kako humani genom sadrži četiri gena za α -globin, intezitet bolesti ovisi o broju gena koji nedostaju. Također, i drugi poremećaji u građi mogu smanjiti količinu α -globina i uzrokovati ovu bolest. β talasemija je, također, posljedica delecija, što dovodi do izmjene redoslijeda nukleotida, s tim što je ovaj oblik talasemije blaži u odnosu na α talasemiju. Za α i β globin ustanovljene su mutacije koje zahvataju introne, što remeti njihovo isjecanje iz primarnog transkripta iRNA.

Molekularna medicina

Primjena DNA-testova u dijagnostici Huntingtonove bolesti

Huntingtonova bolest (HB) je najčešća nasljedna bolest bazalnih moždanih ganglija. Riječ je o progresivnom degenerativnom poremećaju bazalnih ganglija i moždane kore koji se nasljeđuje autosomalno-dominantno. Manifestuje se besciljnim, brzim, neritmičnim i nesimetričnim pokretima dijelova tijela, te različitim psihičkim smetnjama. Huntingtonov gen, nazvan IT15, mapiran je na hromosomu 4p16,3. Sadrži 67 egzona s kodirajućim područjem od 10366 pb i nestabilnom CAG sekvencom koja šifrira glutamin na 5 prim kraju.

Molekularna genetska analiza oboljelih ukazuje na ekspantiju ponovljenih nukleotidnih sekvenci CAG koje kodiraju glutamin na 5 prim kraju. Dio gena koji šifrira multiple kopije amino kiseline glutamina povećan je u svim slučajevima s poremećajem ("dinamična mutacija"). Proteinski proizvod gena IT15, tzv. huntingtin, nema jasne homologije sa drugim proteinima, a malo se zna o njegovoj strukturi i funkciji.

Bolest se u mladosti češće javlja u muškom potomstvu, što upućuje na to da je spol važan za stabilnost ponovljenih sekvenci u gametama. Najčešće počinje oko četrdesete godine, a ponekada se javi i prije dvadesete. Jedna je od najučestalijih neurodegenerativnih genetskih bolesti sa frekvencijom 3×10^{-5} . Danas se sa uspjehom može dijagnosticirati i ova bolest zahvaljujući primjeni specifičnih DNA testova. Na šta ukazuje sljedeći primjer: u neposrednoj blizini u jednoj velikoj porodici sa Huntingtonovom bolesti izvršena je specifična DNA dijagnostika mutacije u IT15 genu. Rukovodeći se potrebi ženskog člana porodice sa "visokim genskim rizikom", a koja je nakon genetske informacije dobrovoljno pristupila DNA testiranju da bi planirala porodicu bez rizika za prenos bolesnog gena. Kod bolesnog brata PCR-metodom otkrivena je mutacija u IT15 genu (broj CAG trinukleotid ponavljanja 46, veličina DNA fragmenata 165-245 pb). Kod ispitanice broj CAG sekvenci je 23 a veličina fragmenata 180 pb, što isključuje prisustvo ove bolesti. Genetsko savjetovanje, izrada heredograma i pristupanje DNA testiranju se nameću kao savremene metode u dijagnostici, detekciji i potvrđivanju nosilaca patološkog gena, a imaju odlučujući značaj za osobe kod kojih je postojao genetski rizik.

Hromosomi predstavljaju najvažniju strukturnu i funkcionalnu konstituentu ćelije. U hromosomima je ugrađen gotovo sav genetski materijal organizma. Zahvaljujući materiji koja je u njih ugrađena omogućen je kontinuitet i kostantnost nasljednih procesa s druge strane.

Nasljedna supstancija jedra je u viših organizama raspoređena u većem ili manjem za svaku vrst karakterističnom broju hromosoma. Nasljedna supstancija svakog organizma je podijeljena u posebne funkcionalne grupe čiji se broj podudara sa osnovnim brojem hromosoma jedinke. Ove grupe se međusobno razlikuju kako po broju, tako i po obliku i funkciji. Tako se svi hromosomi međusobno razlikuju morfološki po specifičnosti grade, karakterističnom obliku i veličini. Morfološka specifičnost i individualnost hromosoma ne može se proučavati za vrijeme interfaznog stanja jedra kada je hromatin hromosoma u despiralizovanom obliku. Oblik hromosoma se može proučavati samo za vrijeme mitoznog stanja jedra, tj. u vrijeme kada su hromosomi maksimalno kondenzovani.

Broj hromosoma je stalna karakteristika za svaku vrstu. U prokariotskim ćelijama postoji samo jedan hromosom. Broj hromosoma se kreće od jednog do preko 100. U nekih Krustacea iznosi 127, a najveći broj imaju neke Protozoe - preko 300. U eukariotskim somatskim ćelijama svaki hromosom je ponovljen dva puta i jedan od njih uvijek vodi porijeklo od oca, a drugi od majke. U humanim somatskim ćelijama nalazi se 46 hromosoma. Za somatski broj hromosoma se kaže da je diploidan, dok je broj hromosoma u spolnim ćelijama upola manji (haploidan) iznosi 23 (22 autosoma i jedan spolni hromosom).

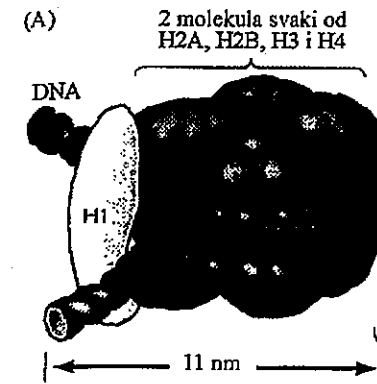
INTERFAZNI HROMOSOM

U interfazi eukariotskih ćelija hromosomi se nalaze u dekondezovanom i kondenzovanom stanju. Hromatin, tj. euhromatin i heterohromatin se razlikuju po strukturi molekula i ekspresiji gena. Euhromatin je dekondezovan i despiralizovan i genetski aktivan. Heterohromatin je kondenzovani dio hromosoma, kao takav je u represiji i neaktivan. Pored hromatina, hromosomi se u osnovi sastoje još od molekula male molekulske težine -histona, mnogo složenijih proteina, tj. rezidualnih proteina uglavnom sa funkcijom enzima, DNA i RNA.

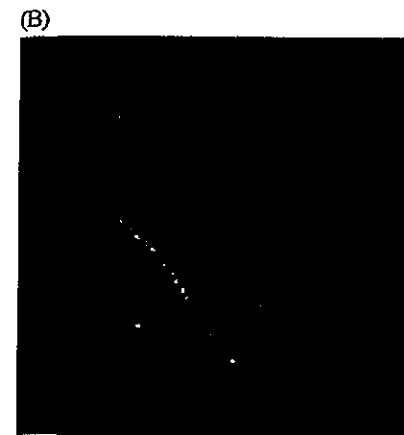
Hromatin

Kompleks sastavljen od eukariotske DNA i proteina se naziva hromatin, u kojemu je dva puta više proteina od DNA. Glavni proteini hromatina su histoni - mali proteini koji sadrže veliki procenat baznih amino kiselina (arginina i lizina) koji olakšavaju vezivanje negativnih lanaca DNA molekula. Zastupljeno je pet vrsta histona - označenih sa H1, H2A, H2B, H3 i H4 - svi su slični među različitim vrstama eukariota. Histona ima približno onoliko koliko ima i DNA u ćeliji. U hromatinu su i različite vrste nehistskih proteina. Zastupljeno je preko stotinu različitih vrsta nehistskih proteina koji su uključeni u različite aktivnosti, kao DNA replikaciju i gensku ekspresiju. Histoni nisu nađeni u eubakterijama (E.coli), DNA ovih bakterija asocira sa drugim proteinima koji, vjerovatno, imaju sličnu funkciju histonima, a smješteni su van DNA bakterijske ćelije. Međutim, arheobakterije sadrže histone u DNA u strukturi sličnoj eukariotskim hromosomima. Histoni se ispituju i kao mogući faktori u molekularnoj kontroli diferencijalne genetske aktivnosti. Npr. ako se izolovani i inhibiranim jedrima timusa dodaje tripsin, oslobada se 17% histona od DNA i sinteza RNA se povećava. Dodavanjem histona ovim jedrima sinteza RNA se zaustavlja. Histoni se lako mijenjaju, metiliraju, acetiliraju i fosforiliraju. Zahvaljujući ovim hemijskim promjenama histona, posebno acetilaciji i fosforilaciji, oslobođena DNA od histona započinje transkripciju RNA, pa se povećava i proces sinteze proteina. Znači, u DNA oslobođenoj od histona vrši se transkripcija svih vrsta RNA, što dokazuje da su u genomu ćelija prisutni i određeni geni koji pod određenim uslovima determinišu vezivanje ili odvajanje histona od DNA i time sintetišu ili zaustavljaju sintezu RNA.

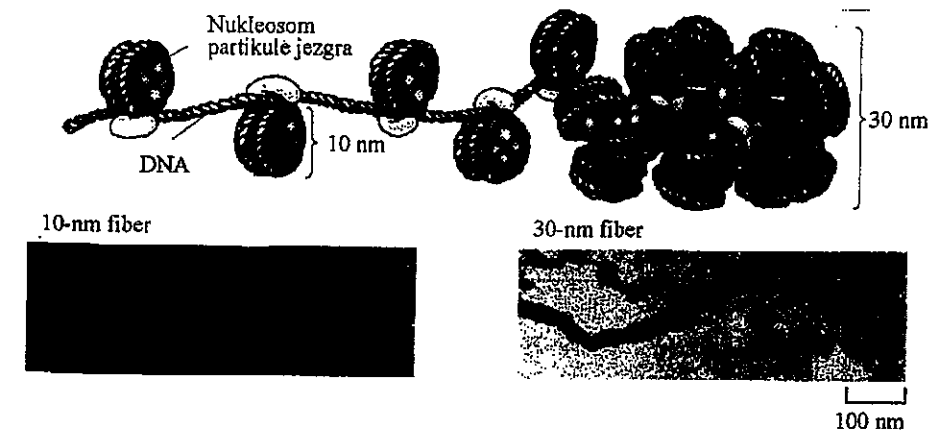
Osnovna strukturalna repetitivna jedinica hromatina je *nukleosom* ili *hromatosom* (sl. 8.1). Ispitivanjem hromatina pomoću X zraka i pomoću enzima nukleaze dokazano je da se na svakih 100A dužine hromatinske niti ponavlja pravilna struktura koja se sastoji od 8 molekula (oktamera) histona (H2A, H2B, H3 i H4) i 140-200 pari baza nukleotida DNA. Histoni čine jezgro nukleosoma, a DNA omotava jezgro i nastavlja se u DNA spone preko kojih se nukleosomi povezuju u veće jedinice.



Slika 8.1 Struktura hromatosoma-nukleosoma (A) Omotač nukleosoma sastavljen je od oko 200 pari baza DNA, a jezgro od oktamera histona koji sadrži po dvije molekule svake vrste histona: H2A, H2B, H3 i H4. Hromatosom sadrži dva puna obrtaja DNA (oko 200 p.b.) locirana pored molekula histona H1. (B) Model nukleosoma sa dijelovima omotača DNA. Kostur DNA lanaca obojen tamno i tirkiz. Histoni H3 u plavoj boji, H4 u zelenoj, H2A žutoj i H2B crvenoj. (B. od K.Luger et al.1997.)



DNA - sponje između nukleosoma ostvaruju se uz pomoć H-1 histona i prosječno su duge oko 80 p.b. Kondenzacijom nukleosoma prvobitno nastaje hromatinski fiber od oko 10 nm (sl.8.2), pod elektronskim mikroskopom pokazuje perlastu strukturu, što ukazuje na nukleosom-model. U nastavku dalje kondenzacije nastaje fiber od oko 30 nm, što prikazuje elektronska mikrografija na slici 8.3



Slika 8.2 Hromatinski fiber. Sabijanje DNA u nukleosome daje hromatinski fiber aproksimativno 10 nm u dijimetru. Hromatin se kasnije kondenzuje u 30 nm fiber koji obuhvata 6 nukleosoma u turnusu-obrtu. (Fotografije uslužnošću, Donald E.Olins, 2001.)



Slika 8.3 Elektronska mikrofotografija 30 nm hromatinskog fibera

Euhromatin i heterohromatin 48, 49 str.

Intezitet kondenzacije hromatina u toku životnog ciklusa ćelije je različit. U interfazi (nema diobe) hromatin je najviše dekondezovan (nazvan euhromatin) i raspršen je po nukleusu. U toku ovog perioda geni se transkribuju, replicira se DNA i vrši se priprema za diobu. U interfaznom nukleusu euhromatin je u obliku vlakana debljine 30 nm, organizovan u vidu omči, sadrži približno 50-100 kb DNA. Oko 10% euhromatina sadrži gene u dekondezovanom stanju - spreman za transkripciju (Kornberg, 1992.)

Suprotno euhromatinu, oko 10% interfaznog heterohromatina je vrlo kondenzovan i liči hromatinu u ćeliji u procesu diobe-mitoze. Heterohromatin je transkripciono inaktivan i sadrži visokorepetitivne sekvence DNA, kao u centromerama i telomerama gdje je prisutan. Hromosomi u mitotičkim ćelijama su visoko kondenzovani što omogućava njihovu distribuciju u kćeri ćelije. Elektronski mikroskop pokazuje da je DNA metafaznog hromosoma organizovana u obliku velikih petlji-zavoja (ima ih oko 10.000) pričvršćenih za proteinski skelet.

Centromera

Centromera je specifičan region hromosoma, ima odlučujuću ulogu u distribuciji pri duplikaciji hromosoma u procesu mitoze. Centromera asociira sa obje sestre hromatide i pričvršćena je za mikrotubule diobenog vretena. Ona sadrži specifične DNA sekvence, asociira sa proteinima formirajući specifičnu strukturu nazvanu kinetohor. Mikrotubuli se vezuju za kinetohor posredstvom proteina i na taj način se pričvršćuju za hromosome mitotičkog vretena. Proteini asociiraju sa kinetohorom, potom kao "molekularni motor" voze i pokreću hromosome duž niti vretena istovremeno razdvajajući ih na hromatide koje odlaze u kćeri ćelije.

Prema položaju centromere hromosomi se dijele na metacentrične (centromera u sredini i dijeli hromosom na potpuno jednake donje i gornje krake), submetacentrične (centromera je prema gornjem dijelu hromosoma i dijeli hromosoma na gornje kraće i donje duže krake) i akrocentrične

(centromera je sasvim na kraju i dijeli hromosoma na gornje sasvim kratke i donje sasvim duge krake). Pored primarnog suženja (centromera) koje predstavlja postojanu karakteristiku svakog hromosoma, postoje i sekundarna suženja koja su karakteristika pojedinih hromosoma npr. produženja akrocentričnih hromosoma koja asociiraju sa nukleolusom (NOR), regioni u kojima se odvija transkripcija rRNA, ili suženja sa kojima asociiraju telomere (Wilrad, H.F. 1990).

Telomere

Telomere su sekvence na krajevima hromosoma imaju važnu ulogu u replikaciji i održavanju integriteta hromosoma. Telomere grade snopovi velikog broja paralelnih hromatinskih vlakana. To su sekvence DNA kod kojih su u kratkim sekvencama baze jednog lanca "invertovane" sa bazama drugog lanca npr.

ATCCGGAT

TAGGCCTA

Telomere se prepoznaju kao guste strukture hromosoma visoko nestabilne u eukariotskim ćelijama. Telomere imaju važnu ulogu pri replikaciji krajeva linealnih DNA molekula. Replikacija se ne dešava pri normalnom djelovanju DNK polimeraze. Ovaj problem je riješen evolucijski specijalnim mehanizmom, obuhvatajući reverznu transkripciju za replikaciju telomernih DNA sekvenci. Često telomere asociiraju sa nukleolarnim membranama.

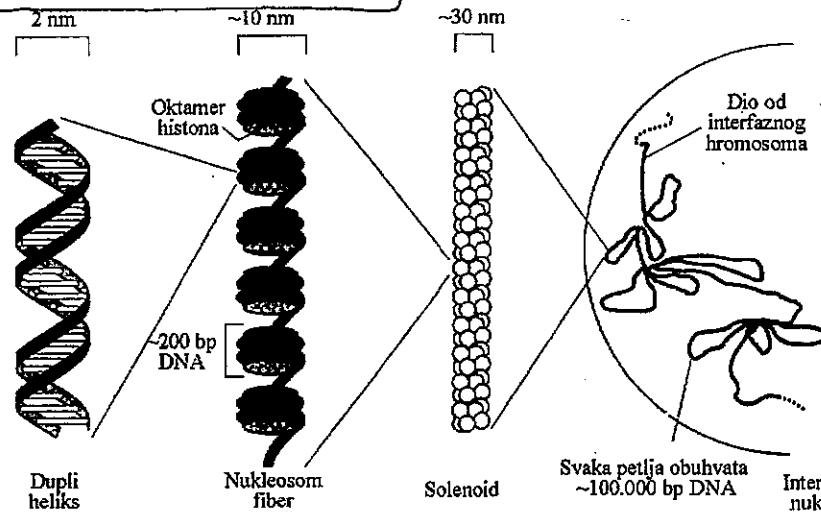
MOLEKULSKA STRUKTURA INTERFAZNOG HROMOSOMA

Hromatin je hromosomski kompleks DNA sa histonskim i nehistonskim proteinima, te hromosomskom RNA, a njegovu osnovnu, mnogo puta ponovljenu strukturu podjedinicu čini nukleosom. Nukleosom uključuje segment DNA s oko-140-200 pari baza udružen s oktamerom histona 2x (H2A + H2B + H3 + H4). Dužina DNA po nukleosomu može varirati, ovisno o organizmu ili tkivu iz kojeg potječe. Susjedne nukleosome povezuju DNA spona i varijabilnost u dužini DNA potječe isključivo od različitih dužina spona. To su istovremeno najosjetljivija mjesta za enzimski napad. Srž nukleosoma se sastoji od dvije identične polovine u svakoj po jedan tetramer histona obavijen jednom od omči histona (vidi sliku 8.1). Niz nukleosoma u brojanici tvori hijerarhijski viši stupanj mitotskog hromosoma, vlakno debljine 100 Å, tzv. nukleofilament. Drugi stupanj kondenzacije hromatina jeste sabijanje nukleofilamenta u uzvojniciu tzv. solenoid, debljine 300 Å, sa po šest nukleosoma u jednom punom zavoju

PROČITATI

uzvojnice. Treći stupanj kondezacije DNA predstavlja treću uzvojnicu, *supersolenoid* ili jedinicu hromosomskog vlakna. Supersolenoid je nastao spiralizacijom solenoida u jednu dugačku, pravilnu jako hidriranu cijev promjera 400Å . Posljednji, četvrti, stupanj sabijanja DNA jeste još jedno sabijanje supersolenoida da bi nastao mitotski hromosom.

Na osnovu zapažanja na djelićima razgrađenih izoliranih metafaznih hromosoma čovjeka, autori Krik i saradnici (1975.) zaključili su da je hromatin humanog hromosoma jednostavno građen na osnovu spiralizacije jedne dugačke pravilne, šuplje, cilindrične strukture koju su nazvali jedinično vlakno. Dakle, jedinično vlakno (400Å) predstavlja jedan supersolenoid, valjkastu spiralu nastalu zavijanjem solenoida debljine 300Å koji potječe od uzvojnice osnovnog vlakna sa više nukleosoma debljine 100Å . Molekularna struktura interfaznog hromosoma je prikazana na slici 8.4.



Slika 8.4 Hijerarhijski niz hromatina sabijan u humani hromosom. Dupli heliks DNA, nukleosom fiber, solenoid i interfazni hromosom. Sabijanje hromatina se nastavlja u supersolenoid, a ovaj dalje u metafazni hromosom (Prema Heck, M.M.S. 1997.)

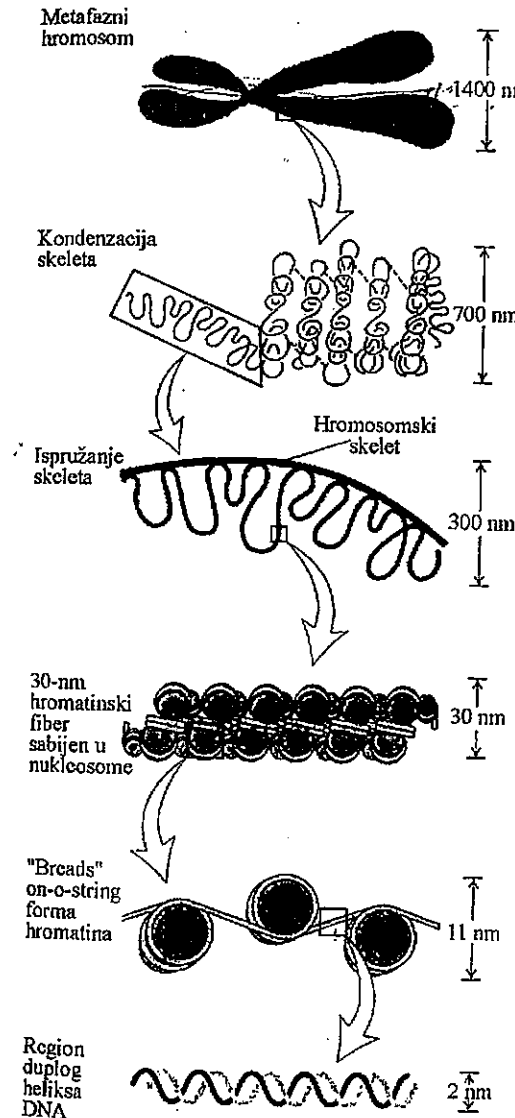
HROMOSOMI U MITOZI

Metafazni hromosom u procesu mitoze je vidljiv zahvaljujući spiralizaciji osnovne dugačke hromosomske niti hromonemi koja se u interfazi ne može vidjeti. U toku interfaze, tačnije u S-fazi, svaka se hromonema udvostruči, pa se sastoji od dvije hromoneme koje se spiralizacijom skrate, tako postaju definitivno dvije hromatide vidljive u svjetlosnom mikroskopu (sl.8.5).

Spiralizacija je jedan od bitnih procesa u nastajanju metafaznih hromosoma, pri tom se dužina u odnosu na interfazu smanjuje za 122 puta. Osnovna nit *hromonema*

nije sasvim homogena već pokazuje mjesta jače spiralizacije koja se jače boje bojama specifičnim za DNA i koja se nazivaju *hromomere*. U svakom hromomeru se nalazi samostalni zatvoreni lanac DNA, a između susjednih lanaca, tj. hromomera se nalazi veći ili manji interhromerni region. To su mjesta transkripcije RNA. Hromonema i hromomere su uklopljene u osnovnoj materiji -matriksu. Hromatide su povezane primarnim suženjem ili centromerom. Za neke hromosome je karakteristično sekundarno suženje koje se obično nalazi pri vrhu hromosoma i asocira sa telomerama ili nukleolusom što je najčešće karakteristika akrocentričnih hromosoma. Na metafaznom hromosomu se zapažaju heterohromatinski regioni u

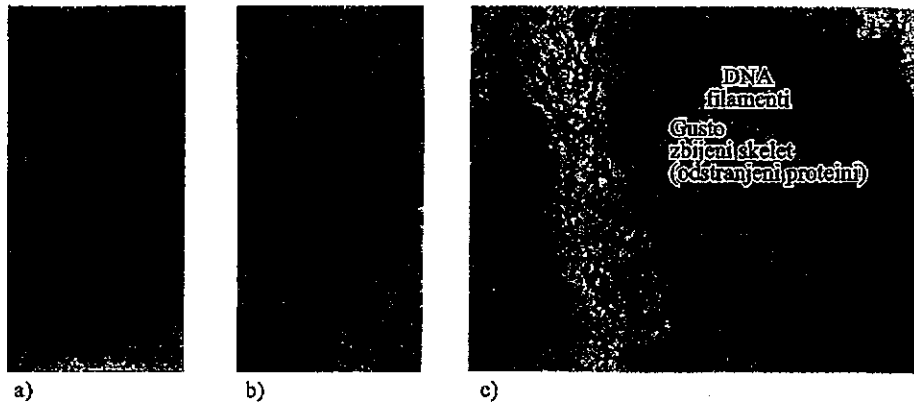
području centromere, intezivnije se boje u odnosu na euhromatinske regione koji se zapažaju u gornjim dijelovima gornjih i donjih krakova hromatida. Euhromatinski region se slabije boji, jer je više despiralizovan.



Slika 8.5 Model sabijanja hromatina i formiranje metafaznog hromosoma Duž interfaznog hromosoma hromatinske omče se sabijaju i kondezuju. U metafaznom hromosomu postiže se najviši stepen sabijanja u skeletu-heliksi i nastaje visoko kompaktna struktura koja nije precizno geometrijski određena. (Prema Koshland, D. and A.Strunnikov.1996.)



Metafazni hromosomi su najpogodniji za mikroskopsku analizu, posmatranje i studiranje, jer su maksimalno kondenzovani, zbog čega se dobro boje, pa ih je lako uočavati, utvrđivati njihov broj i morfologiju. Na slici 8.6 prikazane su elektronske mikrografije humanog metafaznog hromosoma na kojima se jasno razlikuju hromatide sa gusto kondenzovanim hromatinom, zatim mjesto centromere - mjesto vezivanja hromatida.



Slika 8.6 Humani metafazni hromosom (a) Prenos elektronske mikrografije intaktnog hromosoma; (b) Skening elektronska mikrografije intaktnog hromosoma; (c) Prenos elektronske mikrografije hromosoma kod kojeg su mnogi proteini odstranjeni; odmotani DNA filament. (Prema Saitoh, Y. and Laemmli, U.K. 1994.)

POSEBNI HROMOSOMI

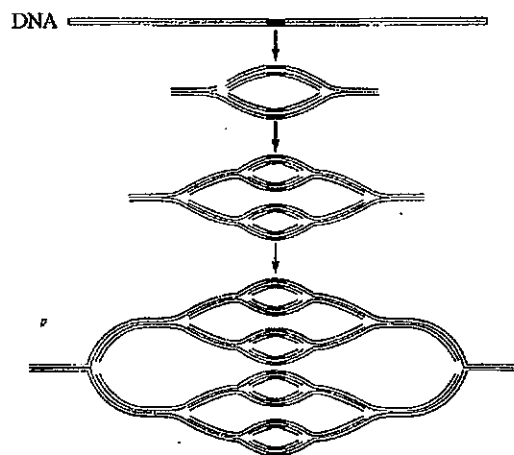
Neki posebni tipovi nemitotskih hromosoma lampbrush i politeni hromosomi mogu da se nađu u jajima vodozemaca ili politeni hromosomi u žlijezdama slinovnice vinske mušice. Politeni hromosomi nastaju najčešće kao rezultat nepravilnog odvajanja (endomitozom) hromatida pri odlasku na polove u anafazi ćelijske diobe. Uzdužno se dijele hromoneme, ali ostaju jedna uz drugu, pri čemu se jedro ne dijeli. Tako nastaju krupni hromosomi koje još nazivaju gigantski. Najčešće služe kao objekt za istraživanja strukture i funkcije hromosoma.

Lampbrush hromosomi

Lampbrush (četkasti) hromosom je zapravo poseban primjer mejotički sljubljenog para homolognih hromosoma koji u diplotenu dostiže ogromnu dužinu od oko 800 nm u poređenju s 15-20 nm dugačkim hromosomima u preostalim fazama mejoze. Lampbrush hromosom u jajnim ćelijama vodozemaca ima četkast izgled. Osnovnu nit čini DNA - hromonema duž koje se nalaze hromomere, mjesta jače spiralizacije hromoneme. Iz hromomera se izvijaju hromatinske omče (sl. 8.7). [Ogroman broj omči koji se izvija iz hromomera povećava ukupnu površinu hromosoma. Po omčama se nalaze brojne molekule enzima RNA polimeraze, pod čijom kontrolom se odvija sinteza svih vrsta RNA. U organizmina kao što su vodozemci u ranom razvoju se javlja potreba za velikom količinom 28S i 18S rRNA kako bi mogli akumulirati veliki broj ribosoma za sintezu proteina u kasnijim fazama razvoja. Iako su geni za rRNA već prisutni u ponovljenim, repetitivnim redoslijedima, sa stotinama kopija u svakoj somatskoj ćeliji (magnifikacija gena), taj se broj u oocitama u ovakvim hromosomima povećava (amplificira) čak na 2, 000.000 kopija (sl. 8.8)



Slika 8.7 (A) Snimak svjetlosnim mikroskopom četkastih hromosoma iz oocite vodozemaca. Vide se stotine omči i dekondezacija omči u procesu aktivne transkripcije četkastih hromosoma i visokokondenzovane transkripcione osovine hromatina. (Prema Galu i Milleru. Uslužnoću Brookhaven National Laboratory.)

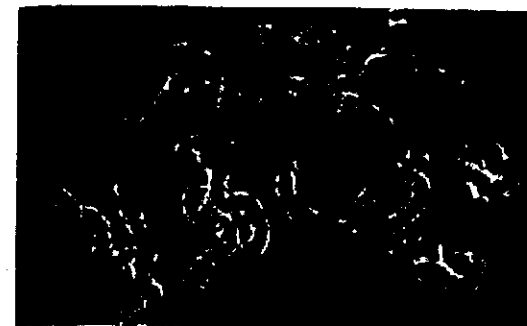


Slika 8.8 DNA amplifikacija
Ponavljanje srednjeg repli-
ciranog dijela DNA daje
multiple kopije dijelova
hromosomalnih regija.

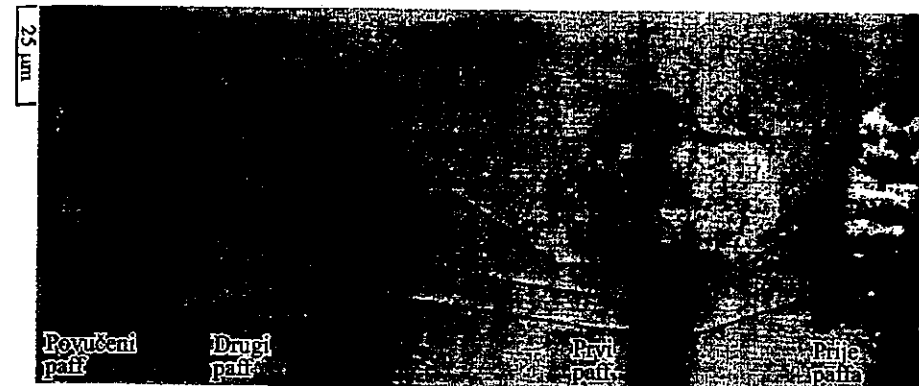
Politeni hromosomi

Politeni hromosomi (sl. 8.9) predstavljaju posebnu grupu hromosoma, koja nastaje mnogostrukom replikacijom bez razdvajanja hromoneme, tj. jedra. Ovaj vid diobe se naziva endomitoza. Umnožena hromatinska vlakna se ne odvajaju već ostaju zajedno sljubljena u politenom hromosomu sa brojem hromonema 100-4000. Hromoneme su iste dužine, imaju na istoj visini hromomere, tako da kada se posmatraju mikroskopski, dobija se utisak o poprečnim vrpčama. Sljubljene hromomere, tj. poprečne vrpce, imaju specifičan linealan raspored. Još je Bridges utvrdio: jedna vrpca-jedan gen na temelju genskih karti u vinske mušice. Broj vrpce u njoj iznosi oko 3.500 što približno odgovara očekivanom broju gena i ujedno sugerira da se geni nalaze u vrpčama-hromo merama, a ne u međuvrpčama.

Politeni hromosomi vinske mušice posjeduju omče prepisivanja i to ne jednu ili dvije na jednom lokusu, kao kod Lampbrush hromosoma već čitavo mnoštvo omči. Kada se skup svih vrpce-hromomera istog lokusa počne ekspanirati iz svoje strukture, tada svaka hromomera izvija po jednu omču i ukupan rezultat je rahlo zadebljanje ili "paff" (sl.8.10). U tim raspršenjima ("paffovima") se odigrava intezivna sinteza iRNA i amplifikacija ribosomalnih gena. Džinovski ili politeni hromosomi su vrlo povoljni za eksperimentalna istraživanja. Npr. dijelovanjem agensa kao što su temperatura ili neki hormon, moguće je u politenom hromosomu inducirati pretvaranje vrpce (skup hromomera) u raspršenje "paff". Što znači aktivirati određene gene na prepisivanje određene sekvence. Na osnovu eksperimenta je utvrđeno da se aktivacija gena odvija u tri etape: akumulacija kiselih nehistskih hromosomskih proteina u području određene vrpce (hromomera), despiralizacija hromomeričke DNA u području "paffa" i sinteza i pohranjivanje nastale RNA. Struktura sintetski aktivne regije hromosoma sa rahlim omčama ("paffovi") bitno se razlikuje od strukture neaktivnih regija sa kondeziranom hromatinskom niti u hromomerama ili od sasvim neaktivnih hromosoma kao što su maksimalno kondezovani-sabijeni mitotski hromosomi.



Slika 8.9 Politeni hromosomi
Drosophile Svjetlosna mikrografija
hromosoma iz pljuvačnih žlijezda.
Četiri hromosoma (X, 2, 3 i 4) su
spojeni centromerom. (Prema Peter
J.Bryant, 1989.)



Slika 8.10 Posmatranje hromosomalnih paffova Ovi paffovi su videni na hromosomima brazilijanskog komarca koji su slični gigantskim hromosomima voćne mušice. Paffovi nastaju normalno, ali se mogu inducirati eksperimentalno. Ovi paffovi su nastali kao reakcija dijelovanja hormona uzrokujući linjanje. Mikrografija prikazuje paffove duž sekvenci hromosoma: stanje prije paffa, prvi paff, drugi paff i povlaćenje i nestanak paffa.

Amplifikacija gena

Genska amplifikacija može se posmatrati kao različit tip promjena strukture unutar genoma, tj. promjene broja kopija gena unutar ćelije. Amplifikacija gena rezultira ponavljanjem DNA replikacije dajući multiple kopije dijelova određene regije (vidi sliku 8.8). Amplificirane DNA sekvencije mogu da se nalaze u ekstrahromosomalnim molekulama ili kao tandemi u redovima sekvencija unutar hromosoma. U svakom slučaju, rezultat je povećanje ekspresije amplificiranih gena, jer je mnogo više sličnih kopija raspoloživo za transkripciju. U nekim slučajevima amplifikacija gena je odgovorna za razvojni program obuhvaćen genskom ekspresijom. Prototip primjera amplifikacije ribosomalnih RNA gena je u amplifikaciji oocita (jaja). Amplificira se ogromna količina rRNA potrebna za sintezu proteina u ranim fazama embriogeneze amfiba (jedan milion kopija po oociti). Amplifikacija gena sreće se i kod politenih hromosoma *Drosophile* sa pojavom paffova u ranoj fazi razvoja.

Hromosomi, po svojoj strukturi slični četkastim lampbrush hromosomima, sreću se u procesu oogeneze kod žena u stadijumu diplotena mejoze i kod kojih se, također, dešava amplifikacija ribosomalnih gena za potrebe proteina u kasnijim fazama razvoja embriona.

Amplifikacija gena je abnormalna pojava u kancer ćelijama gdje rezultira ekspresijom gena koji, suprotno, ne kontrolišu rast ćelije. Frekvencija amplificiranih gena u kancer ćelijama rezultira povećanjem ekspresije gena, tj. proliferaciji onkogeni, a to vodi direktno razvoju tumora.

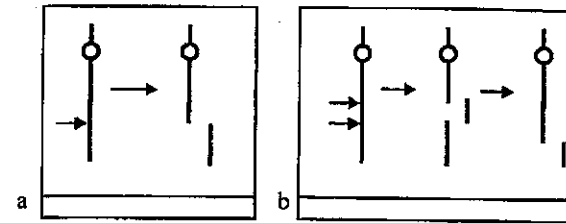
VARIJANTE HROMOSOMSKIH PROMJENA

Hromosomske promjene se pojavljuju u dva glavna oblika: u obliku aberantne strukture i u obliku promijenjenog broja cijelih hromosoma. Ove promjene se mogu desiti nezavisno ili kombinovano. Promjene strukture hromosoma najčešće se javljaju kao rezultat poprečnih prekida u jednom ili više hromosoma i ponovnog spajanja prekinutih dijelova, što remeti linealni raspored genetskog materijala. Prekidi na hromosomima mogu se javiti u G1 fazi ćelijskog ciklusa, prije replikacije u S fazi i u G2 fazi poslije replikacije. Prekidi hromosoma mogu se svrstati u interhromosomske prekide (delecije, inverzije, izohromosomi itd.) i intrahromosomske prekide i preraspodjele genetskog materijala (recipročne translokacije, duplikacije, dicentrični hromosomi).

VARIJANTE U HROMOSOMSKOJ STRUKTURI

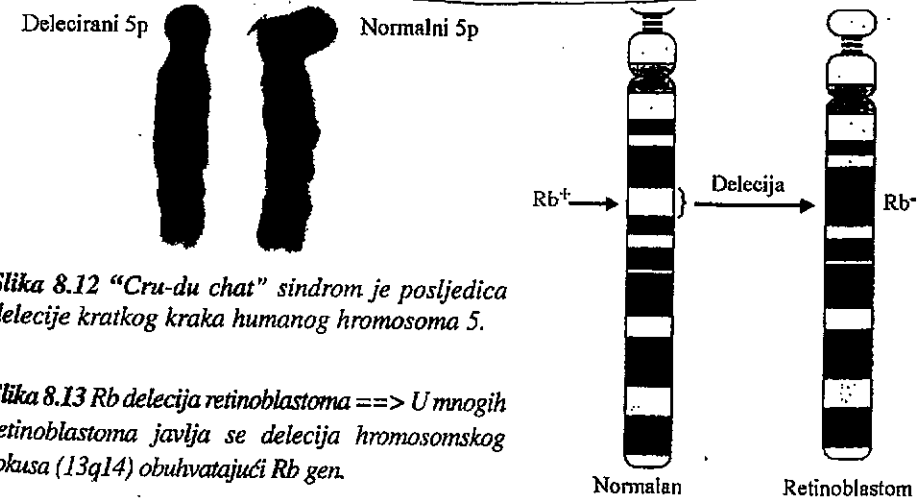
Delecije

Delecija znači gubitak, tj. gubitak genetskog materijala (dijelova hromosoma ili hromatida). Delecije imaju obično veoma štetne posljedice za svoje nosioce i veoma često se završavaju letalno, naročito kad zahvate oba homologna hromosoma. Razlikuju se: subhromatidne delecije koje se ne ispoljavaju za vrijeme ćelijskog ciklusa, pa ih je teško uočiti svjetlosnim mikroskopom, hromatidne delecije dešavaju se najčešće za vrijeme G2 ili krajem S faze ćelijskog ciklusa. Zahvataju obično samo jednu hromatidu. Hromatida se može prekinuti u terminalnom dijelu i poslije toga se pojavljuju centrični i acentrični fragmenti. Acentrični fragmenti se jasno vide za vrijeme anafaze. Ovi fragmenti nemaju kinetohor i nalaze se najčešće između polova i kao takvi su osuđeni na eliminisanje. Terminalno se mogu prekinuti obje sestre hromatide. U svakom slučaju javljaju se fragmenti, ostvaruju se delecije, gubici genetskog materijala i nova jedra bit će deficitna za veći ili manji broj gena, zavisno od toga koliko ih delecirani fragmenti sadrže. Hromosomske delecije, kao i hromatidne, mogu biti terminalne, a kod terminalnih delecija može doći do pericentričnog i paracentričnog kidanja hromatida. Pericentrične hromosomske delecije za razliku od paracentričnih delecija uvijek nose kinetohor (sl. 8.11).



Slika 8.11 Terminalne delecije
a- pericentrične delecije nose kinetohor b-paracentrične delecije

Ovi acentrični prsteni su izvor novih strukturnih aberacija, jer se za vrijeme S faze prsten replicira. Hromosomski prekidi mogu se restituciono obnoviti u tom slučaju u različitim kombinacijama, pa se u anafazi javljaju acentrične (bez centromere), centrične (sa centromerom) i dicentrične spone (sa dvije centromere). Ove delecije nastaju kao posljedica najmanje dva prekida na dva mjesta pa nastaju tri fragmenta. Ovo je najteži oblik delecija. Najčešće se dešava da segmenti ipak srastu. Postoje u osnovi dva načina srastanja, restituciono i nerestituciono. Ako se svi segmenti spoje i srastu ponavljajući prvobitnu strukturu, to je onda potpuna restitucija originalne dužine hromosoma. Međutim, može doći do srastanja samo jednog ili dva segmenta. U tom slučaju je dužinska struktura hromosoma nepotpuno restituisana. Nakon restitucionog srastanja fragmenata hromosoma ili hromatida u anafazi može doći do nastanka: deleciranih monocentrika (sa jednom centromerom), dicentrika (sa dvije centromere), manje parnih ili većih neparnih acentrika (jednostrano sraslih fragmenti bez centromere), većih neparnih ili manje parnih prstena (obostrano sraslih acentričnih fragmenata). Eliminacijom acentričnih fragmenata u toku diobe jedra mijenja se kariotip odgovarajućeg organizma, jer se na ovaj način iz njegovog genoma eliminišu geni koji se nalaze u eliminisanim acentričnim fragmentima. Kakav će biti efekat usljed gubitka genetskog materijala zavisi od broja izgubljenih gena. Neke delecije izazivaju samo manji ili veći pad sposobnosti za normalne životne funkcije, a druge imaju smrtonosno dejstvo npr. u slučaju "Cru du chat" sindroma (sl. 8.12) ili retinoblastoma (sl. 8.13).



Slika 8.12 "Cru-du chat" sindrom je posljedica delecije kratkog kraka humanog hromosoma 5.

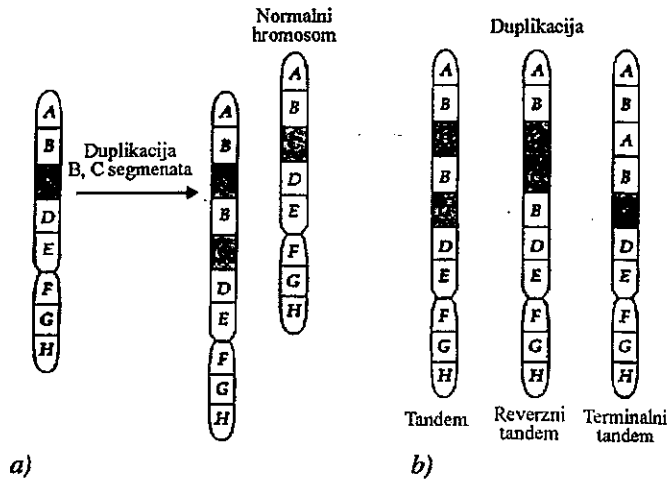
Slika 8.13 Rb delecija retinoblastoma ==> U mnogih retinoblastoma javlja se delecija hromosomskog lokusa (13q14) obuhvatajući Rb gen.

Duplikacije

Duplikacija je fenomen sasvim suprotan deleciji. To je pojava kada se u hromosomima haploidne garniture nekog organizma dvaput ponavlja genetski isti region (sl. 8.14) Duplikacije, po pravilu, nastaju kao rezultat premještanja segmenata hromosoma. Duplikacije mogu biti interhromosomske i intrahromosomske. U prvom slučaju radi se o udvostručenim segmentima koji se javljaju kao rezultat premještanja s jednog na drugi homologni hromosom. U drugom slučaju udvostručeni segmenti javljaju se kao rezultat premještanja s jednog na drugi nehomologni hromosom, jedan postaje kraći, a drugi duži.

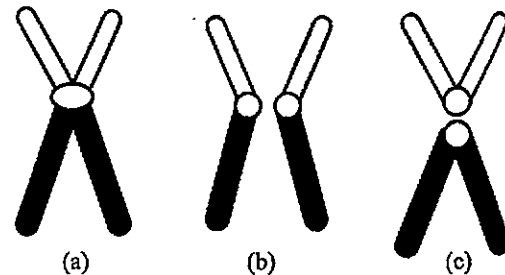
Slika 8.14 *Forme hromosomskih duplikacija*

- a) Duplikacija ponovljenih hromosomskih segmenata (B i C).
- b) Tandemi, reverzni tandem i duplicirani terminalni tandemi.



U duplikacije se može uvrstiti i pojava izohrosoma (sl. 8.15). Izohrosomi su rezultat delecije i duplikacije. Javljaju se kao rezultat poprečnog kidanja u području centromere. Normalno je da se hromosom uzdužno razdvoji na dvije hromatide u anafazi mitoze. Međutim, ako dođe do poprečnog prekida u području centromere, odvajaju se gornji i donji kraci. Jedni kraci nose centromeru -potpuni telocentrik (to mogu biti donji ili gornji kraci), drugi nemaju centromeru -nepotpuni telocentrik (to mogu biti donji ili gornji kraci).

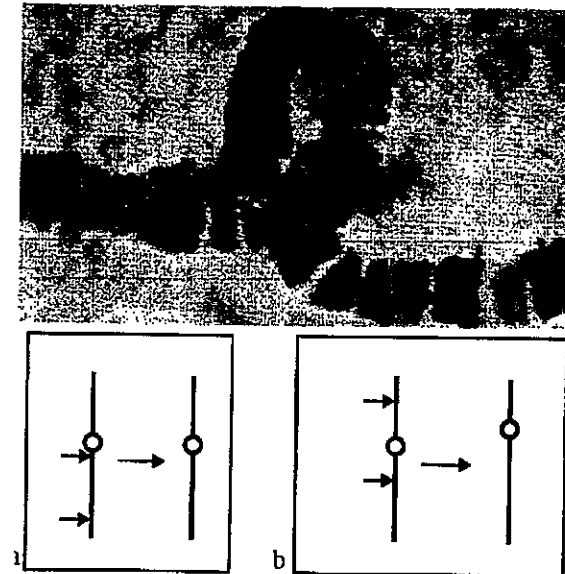
Slika 8.15 *Izohrosom a) Hromosom kod kojeg nije došlo do podjele centromere. b) Normalna dioba centromere i odvajanje hromatida. c) Abnormalna dioba centromere*



Najčešće se telocentrici razvijaju u izohromosome. U tom slučaju obje gornje ili donje sestre hromatide idu na isti pol bez razdvajanja, nakon čega srastu površine sestrinskih centromernih regiona. Takav telocentrični hromosom će u interfazi sljedećeg ciklusa normalno da se replicira i formira se izohromosom sa dvije hromatide. Takav hromosom je uvijek metacentričan (donji i gornji kraci su morfološki potpuno identični, po obliku i dužini). Međutim, kod izohrosoma donji i gornji kraci su ne samo morfološki identični već i po strukturnom i genetskom sastavu (jer su donji kraci nastali replikacijom od donjih i obrnuto). Izohrosomi predstavljaju istovremeno duplikaciju (duplicirani donji kraci ili duplicirani gornji kraci) i deleciju (izohrosomu donjim kracima nedostaju gornji iz normalne kombinacije i obrnuto).

Inverzije

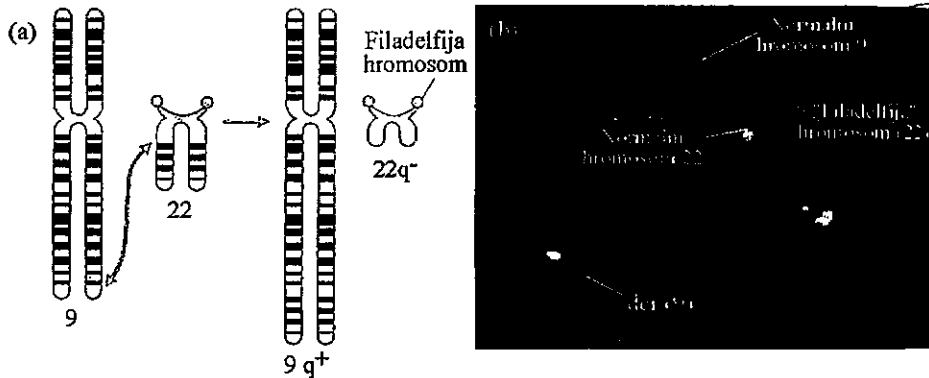
Inverzije podrazumijevaju promjene hromosomske strukture u kojoj je veći ili manji hromosomski region okrenut za 180 stepeni. Dakle, predstavljaju promjenu linealnog reda gena u hromosomu. Nastaju nakon dvostrukog prekida na hromosomu, nakon čega se intersticijski segmenti okrenu za 180 stepeni, a zatim površine kidanja srastu (sl. 8.16). Inverzija kod koje invertovani segment zahvata samo jedan krak kaže se da je paracentrična (asimetrična), a za razliku od pericentrične (simetrične) inverzije u kojoj invertirani segment zahvata oba kraka i obuhvata centromeru



Slika 8.16 *Inverzija hromosoma- elektronska mikrografija a) Šematski crtež paracentrične inverzije. b) Šematski crtež pericentrične inverzije.*

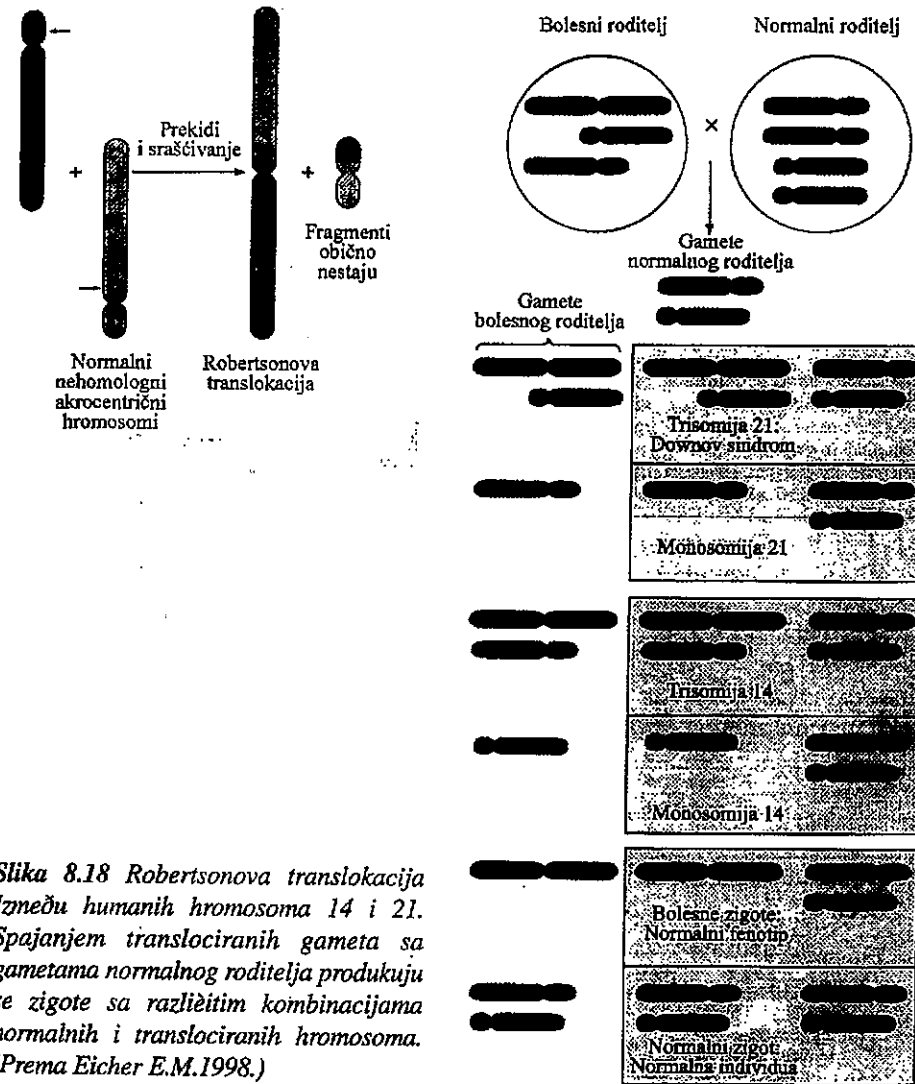
Translokacije

Translokacija podrazumijeva premještanje hromosomskog segmenta u granicama istog hromosoma, kao i premještanje segmenata s jednog hromosoma na drugi homologni ili nehomologni. I translokacije se dijele na: intrahromosomske i interhromosomske. U slučaju intrahromosomskih translokacija dislociraju segmenti između sestrinskih hromatida ili u granicama istog hromatida. U slučaju interhromosomskih translokacija dolazi do razmijene segmenata između homolognih i nehomolognih hromosoma. Interhromosomske translokacije mogu biti: jednosmjerne kada dođe do razmijene genetskog materijala jednostrano, i recipročne kada dođe do uzajamne razmijene segmenata između dva homologna ili dva nehomologna hromosoma. Za opstanak translokacija od presudnog značaja je na koji način u kojoj kombinaciji srastaju razmijenjeni segmenti. Segmenti mogu da srastaju: simetrično i asimetrično. Asimetrično srastanje obično dovodi do eliminacije translokacija ili do potpunog ili djelimičnog vezivanja translokacije, ali ove strukturne promjene namaju genetskog efekta i obično ne preživljavaju. Mnoge translokacije stupaju u nasljedni proces zahvaljujući velikom broju kombinacija asimetričnog i simetričnog, potpunog ili nepotpunog srastanja. Na osnovu ovih elemenata Ewans je (1967.) prikazao deset genetskih i citološki različitih tipova translokacija u slučaju recipročne razmijene hromatidnih segmenata nehomolognih hromosoma.



Slika 8.17 Analiza translokacije hromosoma 9 i 22 (Filadelfija hromosom)

Karakteristične hromosomske translokacije asociraju sa nekim genetskim bolestima kao i sa specifičnim tipovima kancera. Naprimjer, u pacijenata sa hroničnom mijeloidnom leukemijom, leukemične ćelije sadrže Filadelfija hromosom 22 i abnormalni hromosom koji rezultira translokacijom između normalnog hromosoma 9 i 22. Ova translokacija može biti otkrivena klasičnom bendežnom tehnikom (a) i multikolornom FISH tehnikom (b). (sl. 8.17) (Prema Comings, D.E.1975.)



Slika 8.18 Robertsonova translokacija između hromosoma 14 i 21. Spajanjem translociranih gameta sa gametama normalnog roditelja produkuju se zigote sa različitim kombinacijama normalnih i translociranih hromosoma. (Prema Eicher E.M.1998.)

Poseban tip recipročnih translokacija je Robertsonova translokacija (sl. 8.18). U ovom slučaju prekidi nastaju u jednom hromosomu iznad centromere, a u drugom ispod centromere. Prekinuti krajevi se sjedinjuju i obrazuju jedan veliki metacentrični hromosom i jedan sasvim mali hromosom koji se obično izgubi, što dovodi do smanjenja broja hromosoma bez efekta na fenotip. Robertsonova translokacija predstavlja najopštiji oblik preraspodjele genetskog materijala kod čovjeka. Najčešće se dešava između hromosoma iz grupe D i hromosoma iz grupe G. Osobe nosioci ove translokacije su fenotipski normalne. Međutim, produciraju grupu nebalansnih gameta koje kada se oplode sa normalnim gametama daju trizomične ili monozomične zigote.

zigote. Iz trizomičnih zigota (sa jednim hromosomom više) razvijaju se individue sa izmijenjenim fenotipom, a monozomične zigote (sa jednim hromosomom manje) su najčešće letalne.

Ring-hromosom

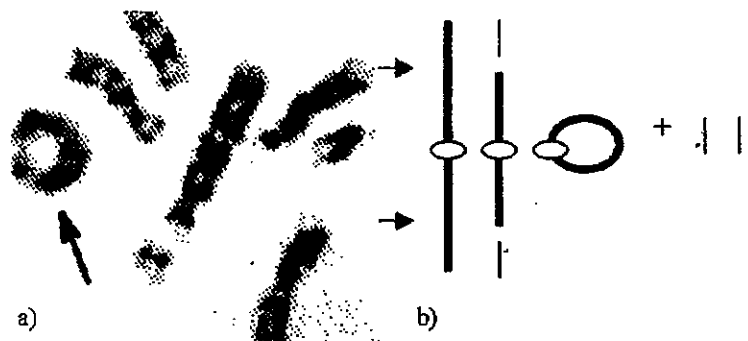
Terminalna delecija oba kraka hromosoma dovodi do formiranja tzv. prstenastog hromosoma ili ring-hromosoma (sl. 8.19). Ring hromosom nastaje kada se zapravo delecirani telomerni acentrični (bez centromere) dijelovi izgube. Ti dijelovi inače objezbjeđuju stabilnost hromosoma. Prstenasti hromosomi nemaju telomerne regije, pa su veoma često nestabilni u kasnijim diobama. Telomere se morfološki ne razlikuju od ostalog dijela hromosoma, one su neophodne za održavanje njihovog linealnog integriteta. Zato se prekinuti krajevi bez telomera spajaju međusobno u jednu prstenastu strukturu. Ova hromosomska aberacija je nađena u svim humanim hromosomima. Analizom ring hromosoma je pokazano da je najizrazitija fenotipska karakteristika ove hromosomske aberacije poremećaj rasta.

U najvećem broju slučajeva ring hromosom ne predstavlja deleciju već vjerovatno nastaju fuzijom telomernih regiona jednog hromosoma. Ovakav ring hromosom bez delecije utiče na ponašanje u diobi i pojavom kontinuiranih sekundarnih aneuploidija koje prouzrokuju smrt ćelije. Smrt ćelije dovodi do poremećaja rasta i mentalne retardacije. Ovaj fenotip se označava kao "ring-sindrom", jer ne zavisi od hromosoma od kojeg ring vodi porijeklo. Na

fenotipsku varijabilnost utiču:

- a) veličina deleciranog segmenta,
- b) stabilnost ring-hromosoma i
- c) vijabilnost ćelijskih linija sa aberantnim ring-hromosomom.

Nedostatak fenotipskih anomalija je vjerovatno uslovljen minutnim delecijama i stabilnošću ring-hromosoma (Prem Diklić, V. i saradnici, 1999.)



Slika 8.19 a) Ring -hromosom . b) Mehanizam nastanka ring-hromosoma

Dicentrični hromosomi

Dicentrični hromosomi nastaju kao posljedica prekida nakon čega dolazi do preraspodjele dijelova hromosoma i kao posljedica formiraju se hromosomi sa dvije centromere. Ove hromosomske aberacije zahvataju kako homologne tako i nehomologne hromosome. Mogu nastati spontano ili mogu biti indukovane nekim hemijskim agensima, posebno kada djeluju u G1 i G2 fazi ćelijskog ciklusa. Ako do prekida dođe na istom nivou sestara, hromatida jednog hromosoma nastaje izodicentrični hromosom koji predstavlja simetričnu palindromsku strukturu. Većina dicentričnih hromosoma nastaje nakon prekida u G2 fazi ciklusa nakon čega translociraju hromatide homolognih hromosoma ili nehomolognih hromosoma. Dalje u procesu mitoze u metafazi, zatim u anafazi odvajaju se dicentrične hromatide (sa dvije centromere), acentrične hromatide (bez centromere) i neizmijenjene hromatide.

U nekim slučajevima dicentrični hromosomi su stabilni u hromosomskom setu čovjeka. Stabilnost je objezbjeđena ako su centromere postavljene vrlo blizu pa hromosom funkcioniše kao normalan-monocentričan (sa jednom centromerom) ili ako se jedna centromera odmah inaktivira. U tom slučaju zapaža se samo jedno primarno suženje, ali se mjesta obje centromere obilježavaju C-trakama.

Priroda promjene u inaktivnoj centromeri još nije poznata. Ne zna se tačan momenat kada se druga centromera inaktivira, ali se to dešava vjerovatno vrlo brzo nakon formiranja dicentrika, jer hromosom sa dvije aktivne centromere ne preživljava sljedeće mitoze. U tom slučaju centromere migriraju na suprotne polove ćelije, između njih se formira anafazni most koji se može prekinuti na bilo kojem mjestu. Novonastale ćelije su aneuploidne ili je mitoza poremećena. U čovjeka su poznati stabilni dicentrični X i Y hromosoma.

Strukturne aberacije spolnih hromosoma

Strukturne promjene spolnih hromosoma znatno se rjeđe. Te promjene uključuju delecije, izohromosome i ring hromosome. Ove strukturne promjene uglavnom su opisane kod X hromosoma. Poznato je da osobe s Turnerovim sindromom imaju jedan X hromosom manje i da su zbog prisustva jednog X hromosoma Barr negativne. Međutim, poznati su i slučajevi s Turnerovim sindromom kariotipa 46, XX, tj. Barr pozitivne. Posjeduju dva X hromosoma od kojih je jedan znatno uvećan, usljed udvajanja dugog kraka i gubitka kratkog kraka. Ovaj izmijenjeni X hromosom je tipa izohromosoma. Kod nekih infertilnih žena sreće se ring hromosom nastao od X hromosoma.

Posebno interesantna strukturna promjena X hromosoma je "fragilno mjesto", nalazi se pri krajevima dugih krakova X hromosoma (Xq), krajevi ostavljaju utisak privjeska ili satelita (sl.8.20). Utvrđeno je da se fragilno X javlja u oko jedne trećine porodica u kojima se sreće nespecifičan oblik mentalne retardacije. Procjenjuje se da učestalost ovog sindroma varira, ali se smatra da pogađa jednog od 2000 muškaraca i jednu od 1250 žena. Bolest se ispoljava sporo u toku individualnog razvoja i u različitim nivoima mentalne retardacije i emotivnog stanja. Prisutne su, također, i fizičke promjene, više izražene kod muškaraca nego kod žena.

Danas je razjašnjena pojava fragilnog X na molekularnom nivou. Javlja se kao posljedica mutacije FMR-1 gena na hromosomu X. Mutacija obuhvata kratku sekvencu DNA u genu. Ovu sekvencu čine baze CGG. Gen se javlja u 200 kopija. Inače, gen je kloniran 1991. godine.

Nasljedivanje fragilnog X sindroma je kompleksno. Mutacija može egzistirati kroz nekoliko generacija u jednoj porodici bez pojave simptoma. U toku ove premutacione faze sekvence se ponove od 50 do 200 puta. Razvoj, veličina i broj premutacija se nasljeđuje postepeno kroz generacije. Prode preko 200 premutacija dok ne postanu potpune mutacije. Samo individue koje imaju potpunu mutaciju mogu imati FX sindrom. Individue s premutacijom, također, mogu biti identificirane ukoliko prođu kroz genetsko savjetovanje, odnosno odluče se za genetske testove i amniocentezu. U tom slučaju fragilno X se može otkriti prije nego dođe do njegovog ispoljavanja ili transmisije u potomstvu.

Fragilna mjesta su inače prekidi kontinuiteta obojenosti između dvije hromosomske jedinice koje se normalno graniče. Slični regioni su vidljivi u normalnim metafaznim ćelijama kao i u podvrgnutim različitom tretmanu.

Postoje dva tipa fragilnih mjesta neobična i uobičajena. Uobičajena fragilna mjesta su vidljiva u metafaznim ćelijama nekih individua u manjem procentu. Rijetka fragilna mjesta vidljiva kod nekih individua javljaju se 20% do 90%.

Pretpostavlja se da je moguća relacija nastanka fragilnih mjesta od replikacije do razmijene homolognih hromosoma pri čemu su naročito izraženi regioni koji učestvuju u razmjeni.

Slika 8.20 Fragilno mjesto na Xq27.3 hromosomu Xq27.3 sekvenca nukleotida na dugom kraku X hromosoma (označava sterilita) asocira sa X veznom retardacijom.



VARIJANTE U PROMJENI BROJA HROMOSOMA PROČITATI

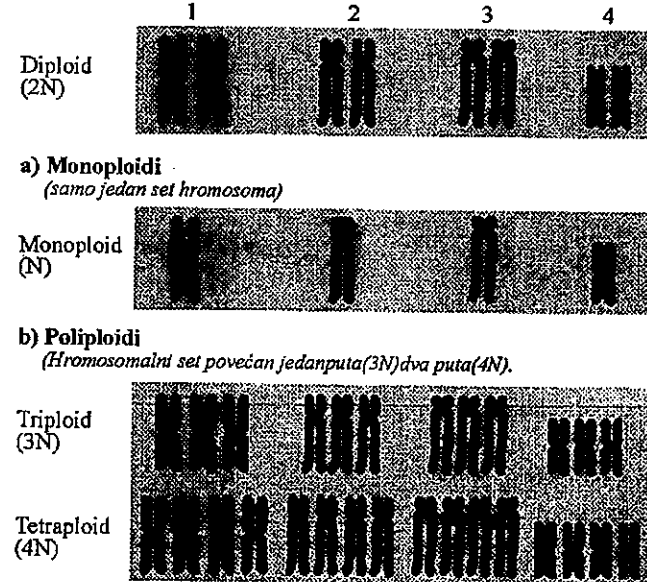
Razlikuje se više vrsta aberacija broja hromosoma: poliploidija, euploidija i aneuploidija. Poliploidija podrazumijeva promjenu broja hromosoma u somatskim ćelijama u kojima se osnovni diploidni broj (2n) povećava jedanput, dvaput i više puta (3n, 4n, itd.). Kod takvih organizama i haploidni broj iznosi 2n, 3n ili više. Pojava povećanja haploidnog seta hromosoma označena je kao euploidija. Povećanje broja pojedinačnih parova hromosoma za jedan, dva ili više od uobičajenog broja karakteristično je za vrstu, označeno je kao aneuploidija.

Poliploidija

Najčešće nastaje usljed nerazdvajanja hromosoma u anafazi mitotičke ili mejotičke diobe. Tako mogu da nastaju u mejozi gameti sa udvojenim (2n) brojem hromosoma i ako se spoje sa monoploidnim gametama, nastaju triploidni (3n) zigoti, ili tetraploidni (4n) ako dođe do spajanja dva diploidna gameta (sl. 8.21). Ovakav način nastanka poliploidije označen je kao autopoliploidija, jer roditeljske jedinice pripadaju istoj vrsti. Poliploidija može da nastane kao rezultat ukrštanja između organizama koji pripadaju različitim vrstama i označena je kao alopoliploidija. Pored morfoloških promjena (ovi organizmi su krupniji od diploidnih), poliploidija dovodi do promjene fiziološke prirode.

Poliploidija ima značajnu ulogu u evoluciji živog svijeta. Ovaj proces je jedan od načina povećavanja broja gena tokom evolucije vrste kao i mehanizam nastajanja novih vrsta. Ova numerička aberacija utiče na vijabilnost (sposobnost za život), kao i na fertilitet (plodnost). Poliploidija djeluje uglavnom letalno (smrtonosno) na čovjeka i druge sisare i onemogućuje postnatalno preživljavanje. (Npr. velika većina triploidija djeluje veoma štetno na embrione čovjeka i drugih sisara i većina triploidnih embriona umire u uterusu i odbacuje se spontanom pobačajem.)

Normalni hromosomski komplement

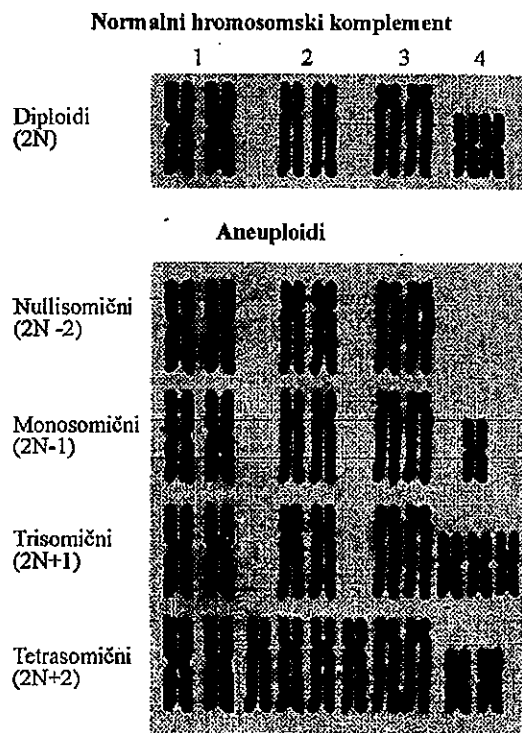


Slika 8.21 Varijante u broju kompletnih hromosomskih setova: a) Monoploidi (samo po jedan hromosom svakog homolognog para); b) Poliploidi (više od normalnog broja hromosoma).

Aneuploidija i tipovi nerazdvajanja

Aneuploidija se odnosi na promjenu broja pojedinačnih hromosoma u diploidnom ili haploidnom hromosomskom setu. U slučaju aneuploidije pri razdvajanju hromosomi nikada ne odlaze u jednakom broju u gamete pa se ova pojava još zove heteroploidija. Nullisomične aneuploidije podrazumijevaju gubitak jednog homolognog hromosomskog para: to je ćelija sa $2N-2$. Monosomične ćelije podrazumijevaju gubitak samo jednog hromosoma; to je ćelija sa $2N-1$ (naprimjer: 45, X). U slučaju kada se javi jedan hromosom više koji je obično homolog sa jednim parom hromosoma u diploidnoj garnituri, onda govorimo o trisomiji. Trisomična ćelija je $2N+1$ (naprimjer, 47, XXX). Tetrasomične ćelije obuhvataju ekstra hromosomalni par, rezultira u prezentaciji četiri kopije jednog hromosomskog tipa i dvije kopije svakog drugog hromosomalnog tipa. Tetrasomična ćelija je $2N + 2$ (vidi sliku 8.22). Aneuploidija je karakteristična i za somatske i generativne ćelije. Može nastati spontano ili kao rezultat djelovanja različitih fizičkih i hemijskih faktora. Mehanizmi koji dovode do aneuploidije su različiti. Najčešće su to poremećaji koji dovode do nerazdvajanja hromosoma u anafazi mitoze ili mejoze. Nerazdvajanje hromosoma može biti: primarno, sekundarno i postzigotno nerazdvajanje.

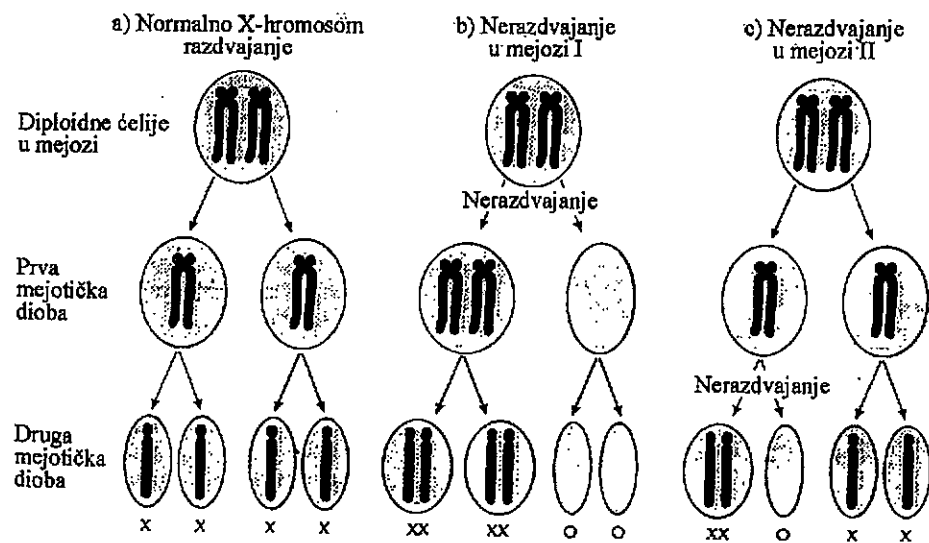
Slika 8.22 Normalni (teoretski) set metafaznih hromosoma u diploidnom organizmu ($2N$) i primjeri aneuploidije.



Primarno nerazdvajanje se odnosi na nerazdvajanje parova hromosoma za vrijeme gametogeneze (u stadiju oocita ili spermatocita) u normalnoj diploidnoj ćeliji u mejozi. U ovom slučaju se oba hromosoma datog homolognog para orijentišu prema istom polu u anafazi mejoze i raspoređuju se u isto jedro. Nakon toga se proizvode dvije vrste gameta: gameti sa jednim udvostručenim, prekobrojnim hromosomom ($n+1$) i gameti u kojima taj hromosom nedostaje ($n-1$). Nakon spajanja gameta

($n+1$) sa normalnim (n) za vrijeme oplodnje nastaje trisomični ($2n+1$) zigot ili nakon spajanja gameta ($n-1$) sa normalnim (n) gametama nastaje monosomični ($2n-1$) zigot.

Sekundarno nerazdvajanje se odnosi na slučaj kada se radi o trizomičnim ($2n+1$) ili monosomičnim ($2n-1$) oogonijama ili spermatogonijama. U slučaju diobe trisomične ($2n+1$) ćelije u diobi obrazuje se jedna ćelija sa dva hromosoma i jedna ćelija sa jednim hromosomom. Na kraju, polovina gameta ima po dva hromosoma (nenormalne gamete), a polovina po jedan hromosom (normalne gamete). U slučaju diobe i sazrijevanja monosomične ($2n-1$) oogonije odnosno spermatogonije, nakon I diobe, polovina gameta je bez hromosoma (nenormalne nulsomične gamete) i polovina sa po jednim hromosomom. Najveći broj hromosomalnih aberacija kod ljudi odnosi se na trisomije pojedinih hromosoma. Danas je pomoću tehnike traka moguće razlikovati svaki od hromosoma, tj. odrediti kod kojeg je hromosoma došlo do trisomije. Trisomije ne pogađaju podjednako sve hromosome. Dokazano je da nijedan slučaj spontanih pobačaja ne nosi trisomije hromosoma 15, 17 ili Y, dok 31, 4% nosi trisomiju hromosoma 16, dok kod živo rođene djece polovinu svih trisomija čine polni hromosomi ili 40% živo rođenih jedinki koje nose neku translokaciju odnosi se na 21 hromosom. Mehanizam primarnog i sekundarnog nerazdvajanja hromosoma u procesu mitoze i mejoze kod čovjeka je identičan i kod drugih vrsta. Slika 8. 23 prikazuje nerazdvajanje XX spolnog para hromosoma u prvoj i drugoj mejozi (primarno nerazdvajanje). Nerazdvajanjem XX hromosoma u mejozi žene, nastaju pored normalnih gameta (X) i nenormalne gamete; nulsomične (0) i disomične (XX) gamete, a mogu nastati i trisomične (XXX) i tetrasomične (XXXX) game.



Slika 8.23 Nerazdvajanje X hromosoma. Nerazdvajanje autosomalnih hromosoma i hromosoma u mejozi dešava se na sličan način. (a) Normalno odvajanje X hromosoma; (b) Nerazdvajanje X hromosoma u mejozi I; (c) Nerazdvajanje X hromosoma u mejozi II.

Postzigotno nerazdvajanje (mozaicizam) se odnosi na nerazdvajanje hromosoma u mitozu mladih embrionalnih ćelija. Jedinka koja se razvija iz XY zigota imaće dvije različite ćelijske linije. Dakle, pojava kada se jedan organizam sastoji iz dvije ili više tipova genetski različitih ćelija (mada svaki tip ćelija ima zajednički postanak, iz jednog zigota) označen je kao mozaicizam. Opisan je veliki broj primjera mozaicizma. Npr. u slučajevima Klinefelterovog sindroma, poznate su hromosomske konstitucije: XX/XXY , $/XXY$, $XXXY/XXXXY$, pa čak sa tri ćelijske linije. Mozaicizam je opisan i kod Turnerovog sindroma: XO/XX , $XO/XX/XXX$ itd. U slučaju Downovog sindroma s mozaicizmom nalaze se dvije populacije ćelija. Jedne imaju normalan hromosomski par 21, a druge imaju tri hromosoma 21. Znači, ako zigot ima dva X hromosoma i dode do nerazdvajanja hromosoma u mitozu, pa jedna kćer ćelija primi tri X hromosoma (XXX), a druga samo jedan X hromosom (XO), doći će do XO/XXX mozaicizma. Mozaicizam se javlja u slučaju ginandromorfizma kod *Drosophila melanogaster* koja se sastoji od dvije vrste ćelijskih linija, normalnih (XX) i monosomičnih (XO) ili normalnih XX i muške ćelijske linije XY .

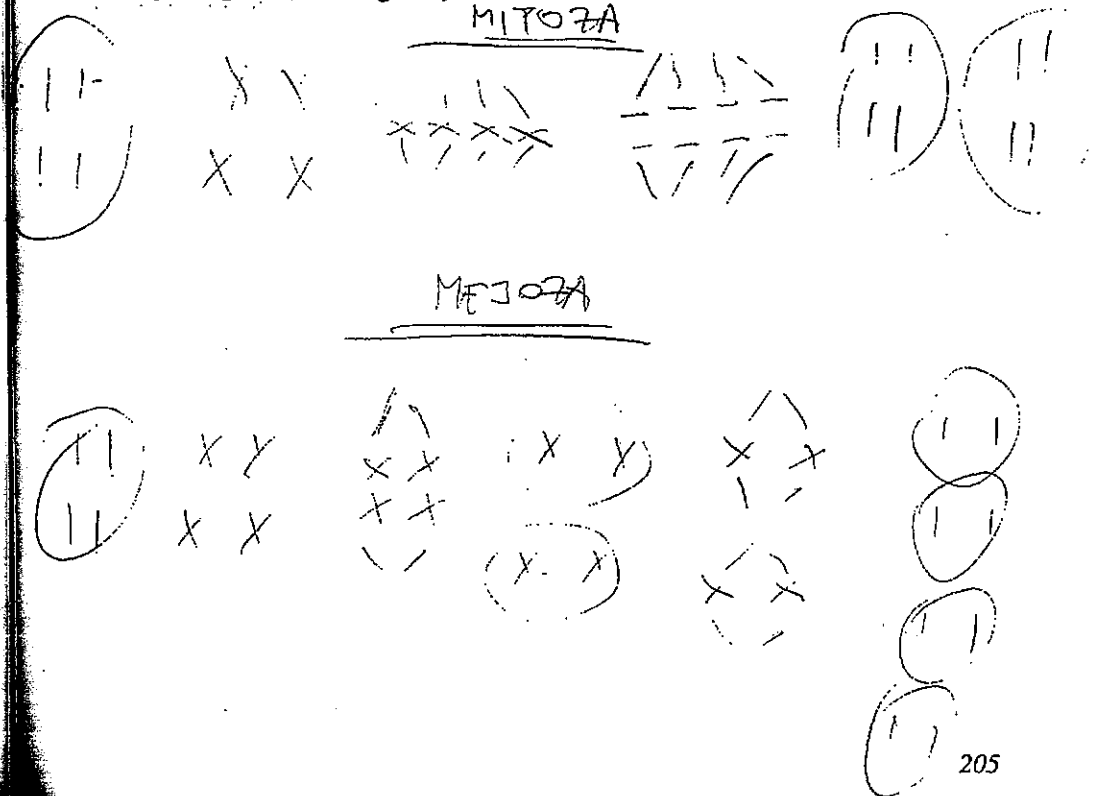
Postzigotnim nerazdvajanjem nastaju i himere. Između mozaičnog tkiva i himera postoji razlika. Pojava kada se jedan organizam sastoji iz dvije ili više tipova, genetski različitih ćelija, koje potječu od različitih zigota (dva jajeta oplodena sa dva spermija) označena je kao himerizam.

I u slučaju himera postoji više različitih ćelijskih linija. Ali dok su ćelije mozaika istog genetskog porijekla, u himerama ćelije imaju različito genetsko porijeklo, jer potiču od više različitih zigota. U čovjeka se sreću dvije vrste himera: dispermične i krvne himere. U prvom slučaju dispermičnih himera, dva različita spermatozoida oplode dvije jajne ćelije. Krvne himere nastaju razmijenom krvnih ćelija, putem placente, između dvojajnih blizanaca u toku intrauterinog života. Naprimjer, 90% ćelija jednog blizanca mogu imati XY spolnu hromosomku konstituciju, a 10% XX spolni hromosomski sadržaj. Najveći dio crvenih krvnih zrnaca muškog blizanca može imati krvnu grupu A, ali ostatak ćelija može imati krvnu grupu B. U isto vrijeme, njegova sestra blizankinja može imati 90% ćelija sa XX spolnom konstitucijom, a 10% sa XY spolnim hromosomima.

Himere su dobile ime prema grčkom mitološkom čudovištu koje je (prema Homeru) imalo glavu lava, tijelo jarca, a rep aždaha.

FUNKCIJE EUKARIOTSKOG HROMOSOMA DRUŽTO

Bitne funkcije hromosoma su: sabijanje ogromne dužine molekule DNA u vrlo mali volumen jezgre u ćeliji uz pomoć pete vrste histona H1. Značajna funkcija hromosoma je u čuvanju molekula DNA da osiguraju replikaciju DNA i prenosu informacije koje ove molekule sadrže, da ove informacije transkribuju pravovremeno i po određenom redoslijedu u specifične vrste RNA, te osiguraju biosintezu proteina. Hromatin hromosoma posjeduje mehanizme koji mogu u molekuli DNA popravljati oštećene dijelove molekule, pronaći grešku i izrezati oštećeni dio. Zatim sintetisati novi, pravilni redoslijed nukleotida i ugraditi ga na mjesto oštećenog redoslijeda DNA. Jedna od osnovnih funkcija hromosoma je i funkcija u procesu nasljeđivanja. Preko hromosoma se prenose nasljedna svojstva sa roditelja na potomstvo, što se ostvaruje procesom reprodukcije. Naime, hromosomi omogućuju reprodukciju vrste, spolnim putem, pri čemu u spolnim ćelijama dolazi do redukcije broja hromosoma sa diploidnog na haploidan broj, što se dešava u procesu mejoze. Pri tom procesu ne samo da se redukuje broj hromosoma na polovinu i ponovo vraća na diploidan broj oplodnjom već se objezbjeđuje velika raznolikost u izboru genetskih informacija koje se prenose na potomstvo. Da bi se ostvario prethodni proces dolazi do izražaja vrlo važna funkcija hromosoma u procesu formiranja homolognih parova hromosoma ili bivalenta (jedan hromosom potječe od oca drugi od majke) čime je omogućena rekombinacija genetskog materijala tj. roditeljskih gena (crossingover).



LITERATURA

Ključne ference

- Alberts, B. Brayan, D. Johanson, Lewis, J. Raff, M. Roberts, K. Walter: *Esencial Cell Biology*. Garland Publishing, Inc. New York. London, 1998.
- Cox, T. Sinclair: *Molekularna biologija u medicini*. Zagreb. 2000.
- Cooper, G.M.: *The Cell a molecular approach*. Boston. 2000.
- Fraser Roberts and Marcus Pembrey: *A interdiction to Medical Genetics*. Oksford. 1997.
- Hoffe, P. A.: *Medical molecular genetics*. 1998.
- Kraus, L.: *Concept Modern Biology*. 1993.
- Lodish, H. et. al.: *Molecular cell biology*. New York. 2001.
- Russel, J.P.: *Genetics*. New York. 1992.
- Watson, J.D. and Hopcins, N.H. et. al.: *Molekul biology of the gen*. 1987.

- Alberts, B. Brayan, D. Levin, H. and Watston, J.D.: *Molecular biology of the cell*. Third edition, Garland Publishing, Inc. 1994.
- Brayant, P.J.: *Biological Photoservice*, Harvard University, 1989.
- Buratowski, S.: *The basics of basal transcription by RNA polymerase II*. Cell, 1994.
- Berget, S.M.: *Exon recognition in vertebrate splicing*. J. Biol. Chem. 1995.
- Crick, F.H.E.: *Codon-anticodon pairing; The wobble hypothesis*. J. Mol. Biol. 1966.
- Comings, D.E.: *Mechanisms of chromosome banding and implications for chromosomes structure*. Ann Rev. Genet. 1975.
- Connor, M., Ferguson-Smith, M.: *Genetics*, 1987
- Eicher, E.M.: *Translocation*, Science. 1998.
- Green. R and Noller, H.F.: *Ribosomes and translation*. Biochem. 1997.
- Heck, M.M.S.: *Cell*. 1997.
- Konberg, R.D. and Lorch, Y.: *Chromatin structure and transcription*. 1992.
- Levin, H.L.: *It is prime time for revese transcriptasae*. Cell, 1997.
- Lewin, B.: *Genes*, Oxford, 1997.
- Luger, K. et. al.: *Nature*. 389-251. 1997.
- Matić, G.: *Osnovi molekularne biologije*. Beograd, 1997.
- Marinković, D., Tucić, N., Kekić, V.: *Genetika*. Beograd, 1991.
- Murray, A.W.: *How to compact DNA*. Science, 1998.
- Modrich, P.: *Strand-specific mismatch repair in mamalian cells*. 1997.
- Newman, A.J.: *The role of U5 snRNP in pre-iRNA splicing*. J. Biol. Chem. 1997.
- Saitoh, Yand Laemmly, U.K.: *Cell*. 1994.
- Tijan, R. and Maniatis, T.: *Transcriptional activation*. Cell, 1994
- Wood, R.D.: *Nucleotide excision repair in mammalian cells*. J. Biol. Chem. 1997.
- Watson, J.D., Gilman, M., Witkowski, J. and Zoller, M.: *Recombinant DNA*. 1992.

III

Reprodukcija i nasljede



- 9 Čelijski ciklus
- 10 Genetska determinacija razvića
- 11 Mendelijanska genetika i nasljede

PROČITO

Najveći broj ćelija u toku diobe obuhvata četiri povezana procesa: ćelijski rast, DNA replikacija, distribucija dupliciranih hromosoma u kćeri ćelije i ćelijsku diobu. Ćelijski ciklus eukariotskih ćelija je mnogo složeniji u odnosu na prokariotske ćelije. Prolazi kroz četiri faze. Ćelijski ciklus je kontinuiran proces, DNA se sintetiše u toku samo jedne faze ciklusa, a replikacija hromosoma i distribucija u nukleuse kćeri ćelija se dešava nakon serije složenih procesa u toku ćelijske diobe. Prevođenje jednog stadija u drugi u toku ćelijskog ciklusa je kontrolisano, evolucijski konzerviranim regulatornim aparatom koji ne samo da koordinira različite važne procese u toku ćelijskog ciklusa već povezuje ćelijski ciklus sa ekstracelularnim signalima koji kontrolišu ćelijsku proliferaciju.

FAZE ĆELIJSKOG CIKLUSA

Dioba jedne tipične eukariotske ćelije traje oko 24^h. Ciklus se odvija kroz dva osnovna dijela interfazu i mitozu. Mitoza (nuklearna dioba) je najsloženiji stadij ćelijskog ciklusa, korespondira odvajanjem kćeri ćelija i obično završava citokinezom. Međutim, mitozu i citokinezu traju samo oko jedan sat, približno oko 95% ćelijskog ciklusa se provede u interfazi- periodu između dvije mitoze. U toku interfaze hromosomi se dekondezuju i distribuiraju iz nukleusa, tako da se nukleus morfološki mijenja. Međutim, molekularni nivo u interfazi je vrijeme kada ćelije rastu i kada se DNA replicira. U interfazi se sintetiše DNA, a sinteza se odvija kroz četiri faze ćelijskog ciklusa (sl. 9.2). G1- faza korespondira interval između mitoze i početka DNA replikacije. U toku ove faze ćelija je metabolički aktivna i kontinuirano raste ali se ne replicira DNA. G1 -fazu prati S- faza (sinteze) u toku koje se replicira DNA. Kompletnu DNA sintezu prati G2 -faza u toku koje ćelija kontinuirano raste i sintetiziraju se proteini. M-faza korespondira mitozu koju obično prati citokineza.

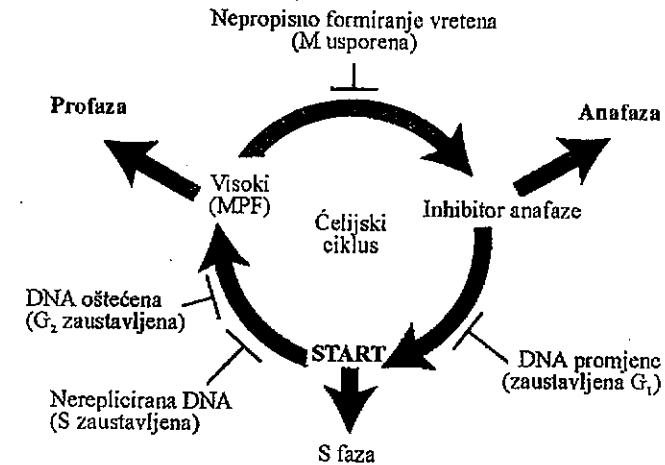
Vrijeme trajanja faza ćelijskog ciklusa je različito u različitim vrsta ćelija. Proliferacija humanih ćelija je brza i vrijeme trajanja G1 - faze je oko 11h, S-faza oko 8h, G2 oko 4h i M faze oko 1h. Različiti tipovi ćelija međutim, mogu se podijeliti mnogo brže, npr. ćelije kvasca mogu da se podijele za 90 minuta, neke ćelije za 30 minuta itd. Analiza ćelijskog ciklusa može se pratiti mikroskopski, a moguća je identifikacija npr. ugrađivanjem radioaktivnog timidina, posebno za DNA sintezu u različitim stadijima. Ćelije u različitim stadijima ćelijskog ciklusa mogu se razlikovati u sadržaju DNA. Naprimjer, životinjske ćelije u G1-fazi su diploidne (dvije kopije svakog hromosoma), tako je sadržaj DNA 2n (n-označava haploidni DNA sadržaj u genomu). U toku S-faze, replikacija povećava sadržaj DNA od 2n do 4n. DNA sadržaj ostaje 4n za ćelije u G2 i M fazi, a smanjuje se na 2n poslije citokineze. (Eksperimentalno, celularna DNA može biti određena pri inkubaciji ćelija sa fluorescentnom bojom, pri čemu se dobivaju obojeni bendovi DNA različitog inteziteta u različitim ćelijama u G1, S i G2 /M fazama ćelijskog ciklusa (King, 1994.)

REGULACIJA ĆELIJSKOG CIKLUSA U TOKU RASTA ĆELIJE I EKSTRACELULARNI SIGNALI

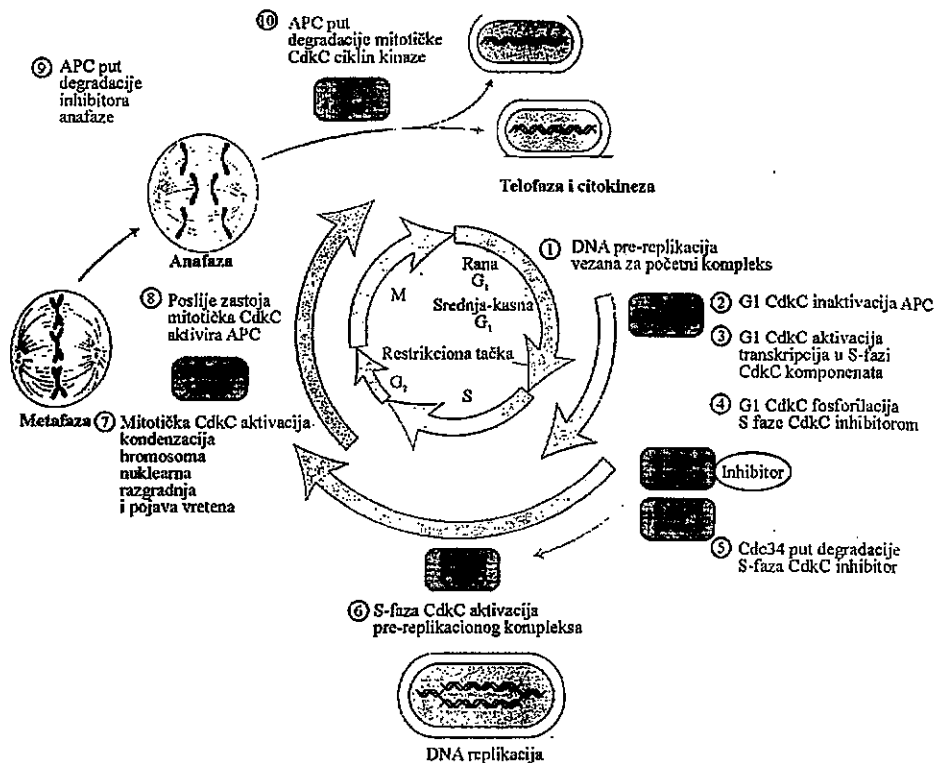
Prolaz ćelija kroz diobu ili ćelijski ciklus je regulisan ekstracelularnim signalima iz okoline isto kako i unutrašnji signali regulišu prelazak i povezivanje jedne faze u drugu u toku ćelijskog ciklusa. Naprimjer, u animalnim ćelijama, ćelijski ciklus reguliše ekstracelularni signal- faktor rasta. Uz napomenu, različiti ćelijski procesi; kao ćelijski rast, DNA replikacija i mitozu, svi moraju koordinirati u toku ćelijskog ciklusa. To se postiže serijom važnih regulatornih radnji kroz različite faze ćelijskog ciklusa.

Najviše regulatornih mjesta je u G1-fazi i kontrolna progresija je u G1+S fazi. Regulatorna tačka je definisana pri proučavanju ciklusa u ćelijama kvasca (*Sacharomices cerevisiae*) i označena kao *START* (sl. 9.1). Start signal korespondira sa DNA replikacijom i ćelijskom diobom. Kada ćelije prođu *START* moraju ući u S fazu i podijeliti se. Međutim, *START* je regulisan proces u ćelijama kvasca i kontrolisan je spoljašnjim signalima kao što su hranljive materije. *START* zapravo određuje da li raspoložive materije obezbjeđuju dalje napredovanje ćelijskog ciklusa. Neki polipeptidi u ćelijama kvasca su npr. signal o zaustavljanju ćelijskog ciklusa u *STARTU*, pri čemu se haploidne ćelije fuzionišu jedna sa drugom umjesto da napreduju u S fazu. Proliferacija ćelija je kontrolisana već u G1 fazi ciklusa. U kasnoj G1 fazi regulatorna tačka je definisana kao *restrikciona tačka ili checkpoint* (Hartwell, 1989.) u životinjskim ćelijama, a funkcioniše kao *START* u ćelijama kvasca (sl.9.2). Međutim, prolaz životinjskih ćelija kroz ćelijski ciklus je regulisan primarno ekstracelularnim faktorima rasta, što je signal za proliferaciju. Kod životinja je, naprimjer,

ćelijski ciklus kontrolisan u G2 fazi u oocitama. Oocyte vertebrata mogu provesti u G2 fazi dugi vremenski period (kod ljudi više dekada) dok se napredovanje u M fazu pokreće hormonskom stimulacijom. Ekstracelularni signali mogu kontrolisati i regulisati proliferaciju pri napredovanju G2 u M fazu tako dobro kao i pri prelasku G1 u S fazu ćelijskog ciklusa.



Slika 9.1 Stadiji kontrolisani checkpointom mogu proći kroz ćelijski ciklus. DNA je zaštićena od radijacije ili drugih hemijskih modifikatora pri ulasku u G1, zatim S fazu dalje u G2, a potom u mitozu. Mitotičko vreteno je zaštićeno od defekta, kao i vezivanja za kinetohore mikrotubula vretena višestrukim sistemom APC koji ima inhibitoryno djelovanje degradacije anafaze. Posljedica je: ćelije ne prelaze u anafazu dok svi kinetohori nisu vezani za mikrotubule vretena (Prema: A.Murray and T. Kunt.1993.)



Slika 9.2 Aktuelni model regulacije ćelijskog ciklusa u eukariotskim ćelijama. Prolaz ćelije kroz ciklus je kontrolisan u G1 i S fazi, i kompleksom ciklin-kinaza (CdkCs) istaknuto crno. Kompleks je graden od regulatorne jedinice ciklina i katalitičke jedinice ciklin-kinaze. Proteinski kompleks (oranž) u Cdc34 stazi i APC stazi su specifični supstrati sa inhibitorynom funkcijom u S fazi, anafazi i mitotičkom ciklusu. Ovaj direktni put ciklina je i reverzibilan za protein degradaciju. (Prema Cooper, G.M. 2000.)

Čekpoint ćelijskog ciklusa PROČITAJ

Događaji u toku različitih stadija ćelijskog ciklusa moraju koordinirati jedan sa drugim i moraju da se odvijaju određenim redom. Naprimjer, vrlo je važno da ćelija ne počne mitozu prije nego se završi kompletna replikacija genoma. U suprotnom, mogu biti krupni poremećaji u procesu diobe ćelije, pa i u ćelijama kćerima može nedostajati kompletna kopija genetskog materijala. U najvećem broju ćelija, koordinacija između različitih faza ćelijskog ciklusa ovisna je o sistemu čekpointa i fidbek kontrole prelaska iz jedne u drugu fazu ćelijskog ciklusa, tj. dok događaji iz prethodne faze budu kompletno završeni.

Jedna od najizrazitijih kontrolnih tačaka je u G2 fazi gdje sprečava inicijaciju mitoze dok se ne završi DNA replikacija. Čekpoint, prije svega, sprečava inicijaciju M faze prije kompletne S faze, pa ćelija ostaje u G2 fazi do replikacije kompletnog genoma. Oslobođena ćelija iz G2 faze inicira mitozu i podjelu repliciranih hromosoma u kćeri ćelije. Međutim, napredovanje ćelijskog ciklusa je ograničeno u G2 fazi čekpointom koji daje signal o promjenama DNA, koje su, naprimjer, rezultat radijacije što je istovremeno i znak za reparaciju oštećene DNA prije nego pređe u kćeri ćelije. DNA promjene se sprečavaju i u progresiji ćelije u G1 i S fazi.

Naprimjer, prekidi jednog ili više hromosoma, njihovo pravilno postavljanje u vreteno, uzrokuje mitotičko zaustavljanje metafaze, raniju segregaciju, raniju replikaciju hromosoma u kćerima ćelijama. Kao rezultat čekpointa hromosomi se ne odvajaju sve dok kompletni set ne bude organizovan za distribuciju u kćeri ćelije.

Dakle, u mnogim ćelijama koordinacija između različitih faza ćelijskog ciklusa regulisana je sistemom čekpointa i kontrolom fidbek sistema, tj. potpunom zaštitom pri prelasku jedne faze u sljedeću sve do posljednje. Značaj čekpointa za ćelijski ciklus jeste u održavanju integriteta genoma do kraja mitoze. Kontrolna tačka jeste monitorus hromosoma za mitotsko vreteno kompletnog seta hromosoma koji se distribuira u kćeri ćelije. Kontrolni i obezbjeđuje funkciju svih stadija ćelijskog ciklusa. Jedan čekpoint operiše u toku S i G2 faze kada ima ulogu u zaštiti aktivnosti MPF (razvojni promotor faktori) prije DNA sinteze. Drugi operiše u toku rane mitoze kada ima ulogu da zaštiti aktivnosti u inicijaciji anafaze, kompletnog sklopa od vezivanja kinetohora hromosoma za vreteno do njihovog pokretanja.

Regulacija progresije ćelijskog ciklusa

Jedno od najzbudljivijih otkrića u prošloj deceniji bilo je objašnjenje i osvjetljavanje molekularnog mehanizma kontrole progresije diobenog ciklusa u eukariotskim ćelijama. Rezultati su dobiveni na osnovu niza eksperimenata na različitim organizmima kao: vodozemci, kvasac, sisari itd.

MPF: Dimeri Cdc2 i ciklin *

Molekularna regulacija ćelijskog ciklusa je identifikovana na osnovu tri grupe eksperimenata. Prva grupa eksperimenata je izvedena na oocitama žabe kada je otkriven citoplazmatski faktor nazvan razvojni promotor faktor ili MPF (MPF-maturation promoting factor). MPF faktor je, također, prisutan i u sisarskim ćelijama u kojima inducira ulazak u M fazu mitotičkog ciklusa.

Drugi pristup razumijevanju regulacije ćelijskog ciklusa je na osnovu genetske analize ćelija kvasca. Ovim eksperimentima je otkriven protein nazvan protein-kinaza ili Cdc2 koji ima ulogu u regulaciji ćelijskog ciklusa.

Treća grupa istraživanja su bazirana na embrionalnim ćelijama sisara. Otkriveni su proteini Ciklina (Ciklin A i ciklin B) koji induciraju mitozu uz povremenu kontrolu ulaska i izlaska u i iz M faze. Ciklin A i B djeluju u toku kasne anafaze i degradiraju proteosome. Kompleks Cdk-ciklin svojom aktivnošću reguliše fosforilaciju, defosforilaciju i neke druge mehanizme u S fazi.

Molekularne karakteristike MPF ukazuju na to da je to konzervirani regulator ćelijskog ciklusa i sastavljen je od dvije subjedinice Cdc2 i ciklina B. Ciklin B je zapravo regulator subjedinice sastavljene od katalitički aktivne Cdc2 protein kinaze. Uloga ciklina B je u regulaciji MPF pri fosforilaciji i defosforilaciji Cdc2. U sisarskim ćelijama ciklin B se sintetise u S fazi, potom se akumulira u formi kompleksa Cdc2 kroz S i G2. Prenos dalje od G2 u M je aktiviranjem Cdc2/ ciklin B kompleksa, što rezultira defosforilaciju treonin-14 i tirozin-15 proteinfosfataze nazvane Cdc25.

Proliferacija ćelija nije regulisana samo faktorima rasta već i različitim signalima koji djeluju kao inhibitori ćelijskog ciklusa. Naprimjer, agensi koji mijenjaju DNA dovode do zaustavljanja ćelijskog ciklusa i mijenjaju vrijeme za repaer-ispravku oštećene DNA. Ćelije sadrže i različite ekstracelularne faktore koji djeluju kao inhibitori stimulacije proliferacije ćelija. Inhibitorski signali su, također, i u sastavu regulatornog mehanizma ćelijskog ciklusa, indukuju sintezu Cdk inhibitora. Naprimjer, protein p53 stimuliše ekspresiju Cdk inhibitora, a on inhibira nekoliko Cdk -ciklin kompleksa (Morgan, D.O. 1997.)

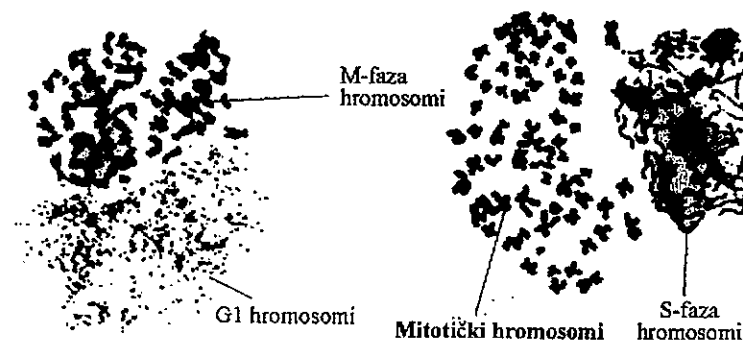
MITOZA PROČITO

Mitoza započinje kontrakcijom hromosoma, nestankom nukleolusa, jedrove membrane, nuklearna masa se dijeli, što rezultira ispuštanjem najvećeg dijela sadržaja nukleusa u citoplazmu. Na kraju mitoze, proces je reverzan: hromosomi se dekondezuju, nuklearni sadržaj re-formira oko mjesta podjele kćeri hromosoma. Nuklearna membrana se fragmentiše u vezikule, nuklearne pore se disociraju, a nuklearna lamina depolimerizira. Fosforilacija lamine je katalizirana Cdc2 protein kinazom. Kompleks nuklearnih pora, također, disocira u subjedinice, kao rezultat fosforilacije nuklearnih protein pora. Proteini integralne nuklearne membrane, također, fosforiliraju u mitozu i fosforilacija ovih proteina može biti važna kao u disocijaciji nuklearne membrane, hromosoma i nuklearne lamine.

* Re-formacija interfaznog nukleusa (kondenzacija hromatina)

Druga velika promjena u strukturi nukleusa u toku mitoze je kondenzacija hromatina hromosoma. U interfazi hromatin koji se nalazio u nukleosomima kondezuje se u forme kompaktnih hromosoma vidjenih u mitotičkim ćelijama.

Ova kondenzacija je potrebna za vezivanje hromosoma za diobeno vreteno, distribuciju hromosoma u kćeri ćelije. U ovom stanju kondenzacije nema transkripcije RNA. Molekuli H1 histoni su supstrat za Cdc2 protein kinazu i fosforilaciju u toku mitoze kod najvećeg broja ćelija ima ulogu u kondenzaciji mitotičkih hromosoma. H3 grupa histona ima, također, ulogu u fosforilaciji, kondenzaciji mitotičkih hromosoma, aktivnosti Cdc2 protein kinaze i direktno omogućava aktivaciju ove kinaze. Na kraju mitoze nastaju dva nova nukleusa sa odvojenim setovima hromosoma (sl. 9.4). Dekondenzacija hromosoma signalizirana je inaktivacijom Cdc2 protein kinaze. Inaktivacija Cdc2 kao degradirajuća regulatorna jedinica dovodi do defosforilacije proteina koji su bili fosforilizirani inicijatori mitoze odvajaju se od mitoze. Nukleus se, također, re-formira kao što se hromosomi dekondeziraju i počinje transkripcija rRNA gena nakon čega se ponovo formira interfazni nukleus. Inaktivacija Cdc2 protein kinaze je kraj mitoze, vodi ka re-formiranju nuklearne membrane, kondenzaciji hromosoma, re-formiranju nukleolusa, a nuklearni proteini se selektivno uvoze kroz nuklearne pore (sl. 9.3)



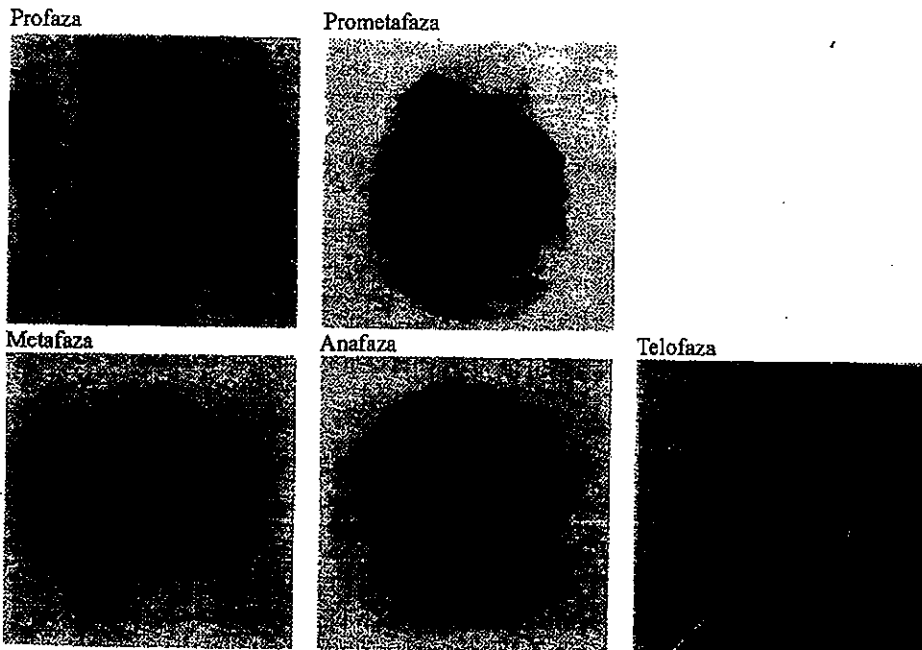
Slika 9.3 Uočljiva razlika između interfaznih i mitotičkih hromosoma. Hromosomi u G1 fazi interfaze; despiralizirane hromatinske niti u S fazi; maksimalno kondenzovani hromatin mitotičkih hromosoma (M-faza).

PROCES M FAZE PROČITO

M faza je najznačajniji period ćelijskog ciklusa, podrazumijeva reorganizaciju vitalnih ćelijskih komponenti. U toku mitoze (diobe jedra) hromosomalni sadržaj, nukleolarno jedro u najvećem broju ćelija se razgrađuje, citoskelet se reorganizuje u mitotičko vreteno, a hromosomi zauzimaju položaj na polovima vretena. Hromosomalno razdvajanje je obično praćeno diobom citoplazme (citokineza).

Stadiji mitoze

Detalji mitoze su različiti kod raznih vrsta organizama, ali u osnovi proces osigurava segregaciju sester hromatida u svim eukariotskim ćelijama. U osnovi proces mitoze obuhvata hromosomalnu kondenzaciju, formiranje diobenog vretena i vezivanje hromosoma za mikrotubule vretena. Sestre hromatide se odvajaju jedna od druge na suprotne polove vretena prateći formiranje nukleusa kćeri ćelija. Mitoza je konvencionalna dioba i odvija se kroz 4 stadija-profaza, metafaza, anafaza i telofaza, prikazane na slici 9.4. Početak profaze je označen kondenzacijom hromosoma, svaki sadrži dvije sestre hromatide (kćeri DNA molekula produkovanih u S fazi). Sestre hromatide su spojene na mjestu centromere za kinetohor za koje se vezuju i mikrotubuli centrosom koji se duplicira u toku interfaze, odvaja se i kreće bočno od nukleusa. Oni služe kao dva pola mitotičkog vretena, čiji je početak u toku kasne profaze. Pred kraj profaze degradira se nukleolus, jedrova membrana. Dalje, ćelija prelazi u prometafazu-period između profaze i metafaze. U toku ovog stadija kondenzovani hromosomi se vezuju za mikrotubule vretena. Kinetohor sa sestrama hromatidama se orijentiše prema ekvatorijalnoj ravni vretena. Ovaj stadij se naziva metafaza:



Slika 9.4 Nukleus u toku mitoze. Mikrografija ilustrira stadije mitoze. U toku profaze hromosomi se kondenzuju, nukleus iščezava, a jedrova membrana se razgrađi. Metafazni hromosomi su maksimalno kondenzovani i postavljeni u ravni vretena. Kćeri hromosoma (hromatide) se pokreću prema polovima vretena (anafaza). U toku telofaze hromosomi se dekondenzuju, a nukleus i nukleolus se re-formiraju.

Prevođenje metafaze u anafazu označeno je odvajanjem sestara hromatida (simultano) i njihovim kretanjem prema polovima. Taj se stadij završava kada hromosomi dopiju na polove. Za vrijeme kretanja hromosoma u ovom stadiju, započinje i dioba citoplazme po sredini ćelije (citokineza). Kraj mitoze je sa telofazom, kada se nukleus re-formira i hromosomi dekondenzuju. Citokineza započinje u toku kasne anafaze i u potpunosti se završava na kraju telofaze, a rezultat su dvije formirane kćeri ćelije.

MPF i progresija metafaze OPEP JAMO PPOČIKO 8-)

U procesu mitoze dešavaju se dramatične promjene mnogostrukih celularnih komponenti, obuhvatajući veliku reorganizaciju unutarnje strukture ćelije. Prethodno je objašnjena aktivnost MPF protein kinaze (Cdc2/ciklin B).

U toku mitoze interfazni hromatin se kondenzuje u kompaktne hromosome što se dešava u toku formiranja metafaznih hromosoma. Tako kondenzovan hromatin ne može se transkribovati. Kondenzacija fosforilacijom je direktno pod kontrolom Cdc2 protein kinaze. Hromosomsku kondenzaciju fosforilacijom redovno prate histoni grupe H1 koji su istovremeno supstrat za Cdc2.

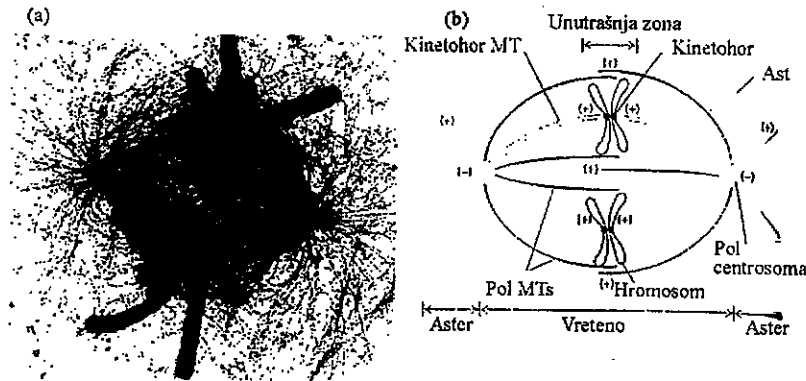
Razgradnja nuklearnog omotača je definitivno znak za aktivnost MPF. Cdc2 fosforilizira laminu (ispod nuklearne membrane) i direktno depolimerizira nuklearnu laminu, a ER i Goldžijev kompleks se fragmentišu u male vezikule, koje se distribuiraju u kćeri ćelije citokinezom. Reorganizacija citoskeleta kulminira u formiranju mitotičkog vretena. Povećanje aktivnosti MPF indukuje krupne promjene u dinamici mikrotubula.

Proteoliza i inaktivacija MPF; anafaza i telofaza

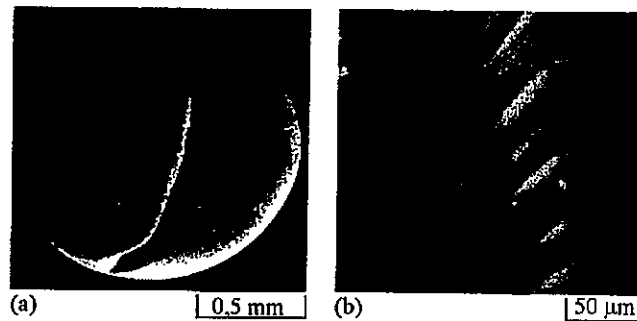
M je inicijalna aktivnost MPF (pokretački faktor diobe). Aktivacija MPF je odgovorna za kondenzaciju hromatina, razgradnju nukleusa, razgradnju endoplazmatskog retikuluma, Goldžijevog kompleksa i reorganizaciju mikrotubula mitotičkog vretena, njegovo vezivanje za vreteno i postavljanje sestara hromatida preko kinetohora u metafaznu ploču (sl.9.5).

Aktivacija sve prisutnih ligaza nazvanih anafaza-promotor kompleks je regulacioni ključ u degradaciji proteina pri prelasku metafaze u anafazu. Prisutni posrednički proteini iniciraju promotorni kompleks u anafazi koji je odgovoran za degradaciju veze lanaca između sestara hromatida -što dovodi do početka anafaze. Aktivacija anafaznog promotor kompleksa je, također, odgovorna za degradaciju ciklina B i inaktivaciju MPF, reformaciju nuklearnog

sadržaja, dekondezaciju hromatina i vraćanje mikrotubula u stanje interfaze. Inaktivacija MPF, također, pokreće-aktivira citoplazmu. U animalnim ćelijama citokineza rezultira kontrakcijom filamenata aktina i miozina (sl. 9.6).



Slika 9.5 (a) Elektronska mikrografija mitotičkog aparata u sisarskim ćelijama. Vide se mikrotubule vretena i veliki hromosomi. (b) Dijagram ilustrira centriole, kinetohore, polarne mikrotubule i hromosomske mikrotubule. (Prema McIntosh, J.R.1991.)



Slika 9.6 Citokineza u animalnim ćelijama, jaja žabe. (a) jaje se dijeli na dva dijela; (b) Detalj prikazuje konstrukciju brazdanja citoplazme. (Prema Beams, H.W.1976.)

MEJOZA ПРОЦЕСС

Prethodno je izložena mitozu koja rezultira diploidnim kćerima ćelijama sa identičnim genetskim komplementom. Mejoza je suprotan proces pri kojem se redukuje diploidni broj hromosoma na polovičan i rezultira produkcijom haploidnih kćeri ćelija. Jedan ćelijski eukariotski organizam, kao naprimjer, kvasac podvrgava se kako mitozu tako i mejozi. Kod multicelularnih organizama, međutim, rezultat mejoze su germinalne ćelije što je osnov spolne reprodukcije. Mitozom se vrši proliferacija somatskih ćelija dok se mejozom proizvode spolne ćelije ili haploidne gamete (spermiji ili jaja). Razvoj potomstva se inicira fuzijom ovih gameta -fertilizacijom (oplođnjom).

Proces mejoze I

Suprotno mitozu mejoza rezultira u diobi diploidnih parentalnih ćelija u haploidno potomstvo (gamete) od kojih svaka sadržava samo jedan član (hromosom) jednog homolognog para hromosoma. Redukcija broja hromosoma se postiže kroz dvije ćelijske diobe nukleusa (nazvane mejoza I i mejoza II) koje prati i dioba DNA-replikacija. U mejozi I roditeljski hromosomi se odvajaju, međutim, razlika je velika u odnosu na mitozu. U toku mejoze I, homologni hromosomi se prvo spare jedan sa drugim, potom se odvoje u različite kćeri ćelije. Sestre hromatide jednog hromosoma su zajedno. Kraj mejoze I rezultira u formiranju kćeri ćelija koje sadržavaju po jedan član svakog hromosomskog para (hromosom oca ili hromosom majke). Mejozu I prati mejoza II koja je slična mitozu, jer se odvajaju sestre hromatide jednog hromosoma i odlaze u različite kćeri ćelije. Kompletna mejoza II rezultira u produkciji 4 haploidne kćeri ćelije, svaka sadržava samo po jedan hromosom svakog homolognog para hromosoma (haploidne gamete). Mejoza I sadrži četiri citološka stadija : profaza I, metafaza I, anafaza I i telofaza I.

Profaza I. Sparivanje homolognih hromosoma (jedan od oca drugi od majke), nakon replikacije DNA, nije glavni ključ mejotičke hromosomske segregacije već je, također, važna rekombinacija između hromosoma koji potječu jedan od oca drugi od majke. Nakon što se razgradi jedrova membrana, nukleolus i formira diobeno vreteno, profaza se produžava u stadije: leptoten, zigoten, pahiten, diploten i diakinezu koji se karakteriziraju po obliku (sl. 9.7).

U toku leptotena hromosomi se sparuju na bazi sparivanja komplementarnih DNA lanaca. U ovoj ranoj profazi *leptotenu* hromatin je jako kondenzovan. Sestre hromatide su dobro vidljive i povezane centromerom. Broj hromosoma jednak je diploidnim ćelijama. Povezivanje homolognih parova hromosoma (sinapsis) počinje u toku *zigotena*. Svaki par homolognih hromosoma sadrži četiri hromatide i nazivaju se bivalenti ili tetrade. U toku ovog stadija, formira se proteinska struktura (model patenta zatvarača nazvan sinaptonemalni kompleks koji cijelom dužinom obuhvata sparane hromosome).

Ovaj kompleks drži homologne hromosome zajedno u paru i u sljedećem stadiju pahitenu. (U *zigotenu*-se sintetiše određena količina DNA, *zigotena* DNA). Ako se sinteza dugih sekvenci *zigotene* DNA inhibira, posljedica je odsustvo homolognog sparivanja hromosoma. U *pahitenu* hromosomi su dobro skraćeni. i u ovom stadiju se sintetiše određena količina kratkih sekvenci DNA (*pahitena* DNA) ako se inhibira sinteza *pahitene* DNA dolazi do fragmentacije hromosoma. Ova DNA iščezava pred kraj *pahitena*. Više su izražena mjesta spajanja homolognih hromosoma-hijazme. U toku *pahitena* je kompletna rekombinacija između homolognih hromosoma. Recipročna razmjena (crossingover) se odvija preko hijazmi između homolognih hromosoma. Crossingover proizvodi nove kombinacije gena. U *diplotenu* se razgrađuje

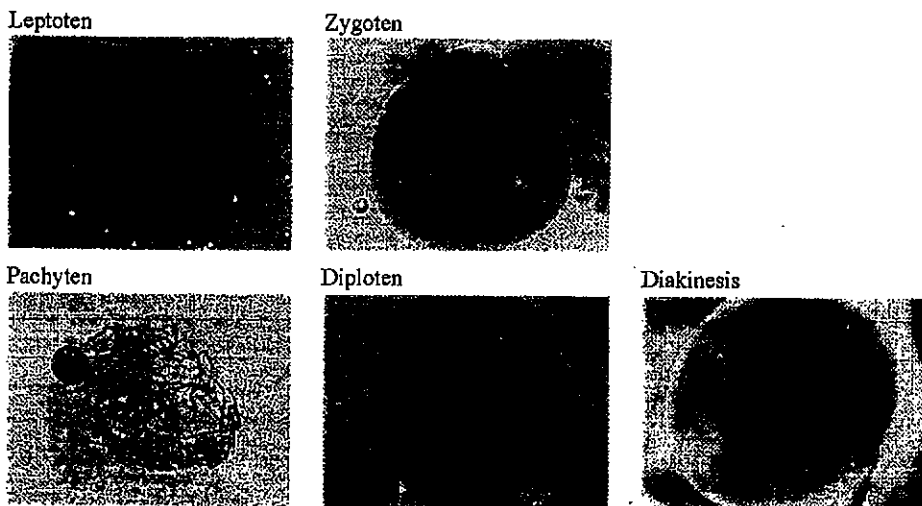
X
DNA
2264

sinaptonemalni kompleks, homologni hromosomi se više odvajaju mjestimično, a ostaju vezani na mjestima hijazmi, koje su dobro izražene. Hromosomi su kraći, kondenzovani i počinje njihovo pokretanje u aparatu strukture vretena. Kod najvećeg broja organizama diplonema prolazi brzo. Međutim, u mnogih životinja diplonema oocita može trajati duže vrijeme. Naprimjer, u žena oocita ide kroz mejozu po nekoliko mjeseci od fetalnog razvoja i može trajati po više godina. Dijakinezis je finalni stadij profaze i karakterističan je po maksimalnoj kondenzaciji. Bivalenti se pokreću prema ekvatorijalnoj ravni vretena.

Metafaza I. Homologni parovi hromosoma ili bivalenti postavljaju se u ravan diobenog vretena. Mikrotubuli jednog pola vretena dodiruju sestre hromatide jedne polovine homolognih parova, dotle mikrotubuli suprotnog pola vretena dodiruju sestre hromatide druge polovine homolognih parova. Zapravo, vezuju se za kinetohore pojedinačnih hromosoma.

Anafaza I. Suprotno anafazi mitoze u anafazi mejoze odvajaju se homologni parovi, nakon čega pojedinačni hromosomi svakog para biva vučen hromatskim nitima ka suprotnim polovima diobenog vretena. Anafaza zapravo, inicira pucanje-prekid hijazmi između homolognih hromosoma, kada se diploidni broj svodi na haploidni-polovičan. Nakon ovog procesa svaki pol ima haploidni komplementrekombiniranih hromosoma.

Telofaza I. Telofaza je identična telofazi mitoze. Hromosomi su na polovima struktuirani se jezgrina ovojnica, a istovremeno se ćelija podijeli citokinezom na dvije haploidne kćeri ćelije.



Slika 9.7 Stadiji profaze mejoze I. Mikrografija ilustrira morfologiju hromosoma u mejozi I. (Kleckner, N.1996.)

Mejoza II

U većini organizama haploidne ćelije nastale mejozom I zaobidu interfazu, odmah započinju drugu mejotičku diobu II. Mejoza II je slična opštoj mitozu. Profaza veoma brzo prelazi u metafazu II sa hromosomima u ravni diobenog vretena. Veza između sestara hromatida između centomera se prekida u anafazi II, nakon čega se sestre hromatide pokreću prema polovima vretena. Nakon prateće citokineze u telofazi II, nastaju haploidne kćeri ćelije-gamete (spermiji i jaja). Na kraju mejoze II nastaju haploidne ćelije od jedne originalne diploidne ćelije. Svaka ima po jedan hromosom homolognog para. Ovi hromosomi ipak nisu egzaktne kopije originalnih hromosoma, jer prolaze kroz crossingover između parova hromosoma u toku pahitena mejoze I.

MOLEKULARNI MEHANIZAM REKOMBINACIJE (CROSSINGOVER)

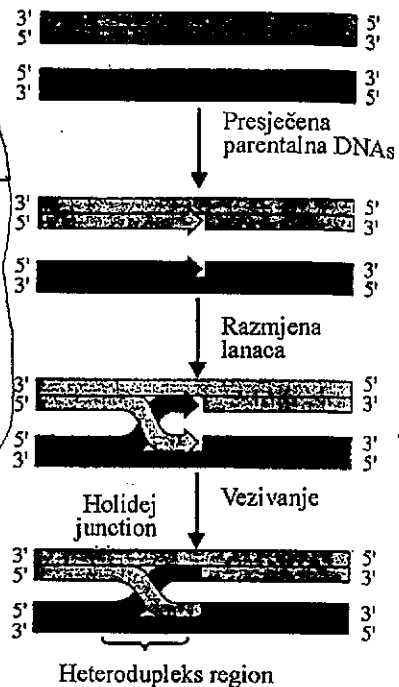
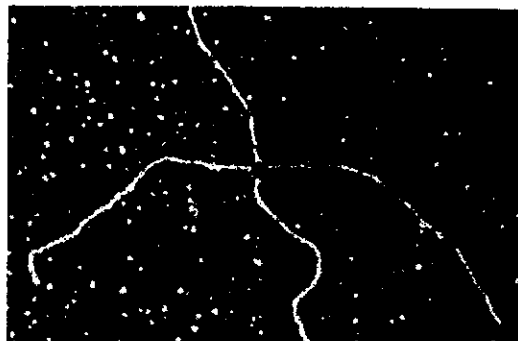
Homologna rekombinacija

U toku rekombinacije između homolognih molekula DNA (opšta homologna rekombinacija) dolazi do razmjene sparenih baza između komplementarnih lanaca DNA. Genetskom rekombinacijom smatra se svaka pojava koja iz dvaju postojećih genoma daje nove kombinacije gena. Razlikuje se homologna ili opšta rekombinacija koja se može dogoditi na bilo kojem mjestu između dvije homologne molekule DNA i nehomologna rekombinacija koja se događa između heterolognih molekula DNA. Naučnik Hollidej (1964.) postavio je model rekombinacije na osnovu rezultata dobivenih proučavanjem ovog procesa u gljivama i bakterijama. Hipoteza koju je postavio Hollidej i danas je osnovni model molekularnog mehanizma rekombinacije (sl. 9.8 i 9.9) Prema originalnoj verziji Hollidej modela, do početka prekida dolazi u okosnicama istosmjernih lanaca dviju roditeljskih molekula DNA. Nakon preloma prekinuti lanac se odvajaju od komplementarnog dijela DNA i spajaju se sa slobodnim krajem homolognog lanca. Hibridna DNA nastaje unakrsnim povezivanjem polinukleotidnih lanaca. Da bi se unakrsno povezani lanci oslobodili, mora doći do ponovnog prekida okosnica lanaca roditeljskih molekula DNA. Ukoliko se prekinu već prekinuti lanci neće doći do crossingovera iako obje molekule DNA sadržavaju dio hibridne DNA. Međutim, ako do prekida dođe u do tada neprekinutim lancima, nastat će dvije recipročne rekombinantne molekule DNA, sa promjenama u sva četiri lanca. Prema modelu Hollideja, u toku procesa rekombinacije uključen je po jedan lanac iz svake roditeljske molekule DNA, do unakrsnog povezivanja dvaju lanaca može doći bez gubitka jednog vodonikovog lanca između parova baza. Prema modelu, to je kružni proces u kojem obje dvolančane roditeljske molekule DNA istovremeno kruže oko

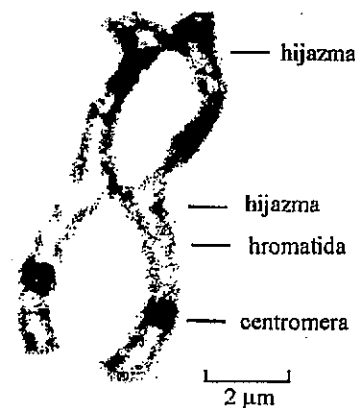
vlastite osi. Dužina hibridne DNA se povećava s vremenom, sve dok se unakrsna veza ne prekine. Hollidej model je modificiran (1975.) u vezi s eliminacijom poteškoća vezanih sa pitanjem inicijacije i inicijalnog mjesta rekombinacije. U ovoj modificiranoj verziji rekombinacija se inicira prekidom samo jedne roditeljske molekule (na jednom lancu). Još jedna modifikacija Hollidej modela rekombinacije sugerira da je rekombinacija inicirana dvostrukim prekidom lanaca tj. prekidima posebno svakog jednostrukog lanca DNA.

Slika 9.8 Holidej (Holliday) model homologne rekombinacije. Zasječaju se parentalni jednostruki lanci. Lanci se zasječaju na mjestima komplementarnih parova baza, potom slijedi vezivanje crossing-lanaca (razmijenjenih lanaca posredstvom Hollidej spajanje.).

Slika 9.9 Identifikacija Hollidej modela elektronskim mikroskopom. Elektronskom mikrografijom je otkriven Hollidej junkšen u toku rekombinacije DNA bakterije *E. coli*. Molekulska ilustracija Hollidej junkšen u otvorenoj konfiguraciji rotacije ukrštenih lanaca. (Uslužnošću Potter, H. and Dressler, D. 1976.)

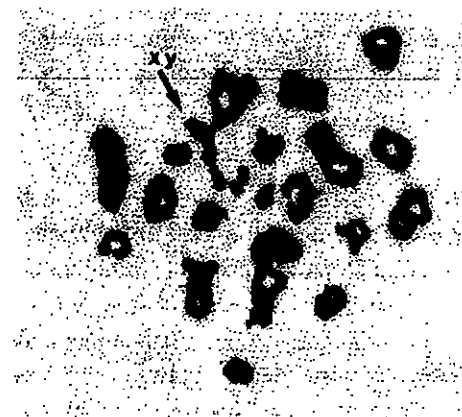


Osnovni preduslovi za rekombinaciju genetskog materijala ili crossingover su: sparivanje homolognih hromosoma, sinteza sinaptonemskog kompleksa i sinteza zigotene i pahitene DNA. Jedan od osnovni preduslova je sinapsis ili sparivanje homolognih hromosoma od kojih jedan vodi porijeklo od majke, a drugi od oca. Nakon sinapsisa između homolognih hromosoma uspostavlja se hijazma (sl. 9.10), tj. veza. To su mjesta preko kojih se vrši razmjena genetskog materijala između homolognih hromosoma (vidi sl. 9.11).



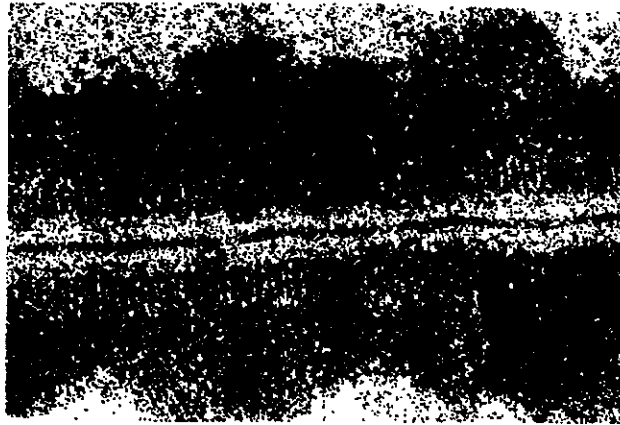
Slika 9.10. Fotomikrografija prikazuje po dvije hromatide svakog hromosoma povezane centromerom. Crossingover se dešava na dva mjesta gdje su hijazme. Crossingover zahvata samo po jednu hromatidu svakog hromosoma. (Prema Shinohara, A. 1995.)

Slika 9.11 Crossingover u diplotenu mejoze I. Strelica pokazuje XY bivalente. Bivalenti su spojeni sa hijazmama na mjestima gdje su crossoveri.



PROČITO

* Sinaptonemalni kompleks počinje da se struktura paralelno sa sinapsisom. To je morfološki vidljiva struktura u zigotenu, a prvi znaci formiranja kompleksa pojavljuju se za vrijeme leptotena. Krajem diplotena iščezava kao integralna cjelina. Fragmentiše se na manje dijelove, ostaju samo manji dijelovi lateralnih elemenata. Sinaptonemalni kompleks je univerzalna struktura koja se sastoji od dva lateralna elementa, centralnog prostora u kojem se nalazi centralni prostor (sl.9.12). Od lateralnih elemenata polaze bočne spone ili fibrile prema centralnom elementu. Lateralni elementi se sastoje od proteina i DNA. Sa vanjske strane nalazi se kondezovani hromatin homolognih hromosoma. Centralni element se sastoji od nebaznih proteina. Osnovna funkcija kompleksa je ujedinijenje homolognih hromosoma i njihovo održavanje u bivalentnom stanju. Iščezavanje kompleksa povezano je sa kontrakcijom hromosoma koja se odvija tokom čitave profaze i koja je jako izražena u diplotenu između dvije homologne hromatide.



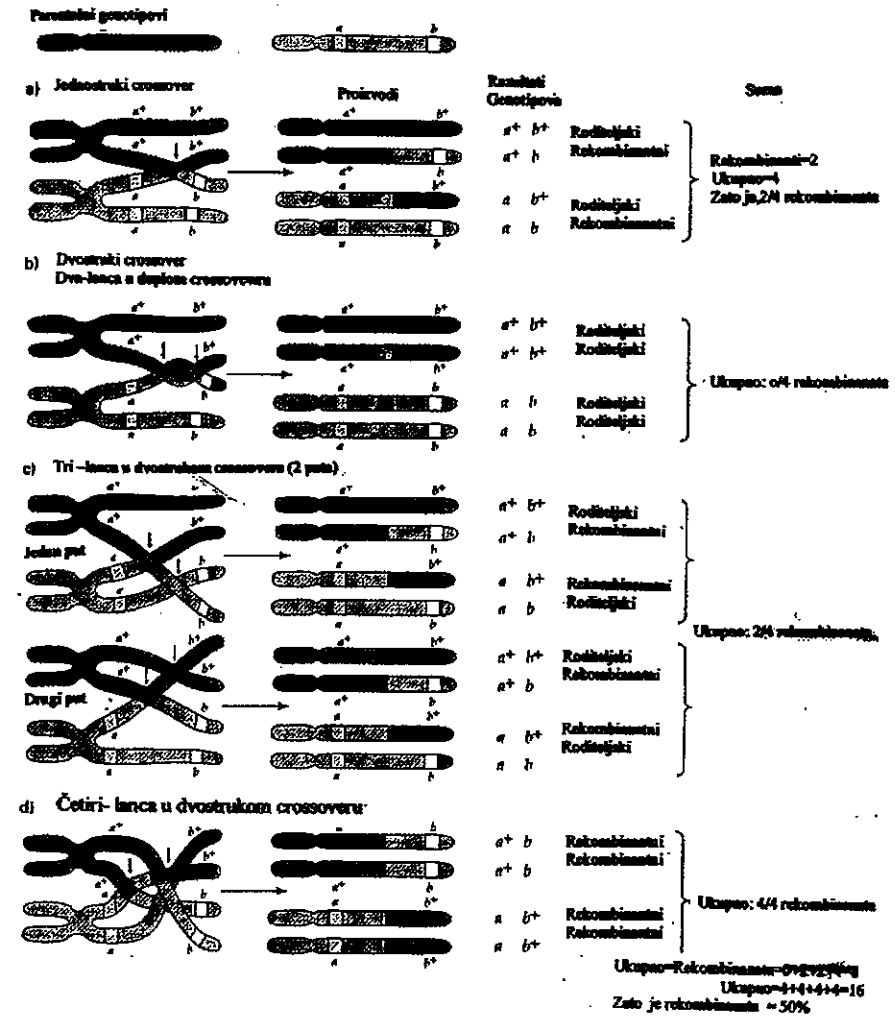
Slika 9.12. Mikrografija sinaptonemalnog kompleksa jednog para hromosoma u toku zigotnog stadijuma profaze mejoze I. (Russel, P.J.1992.)

Pracito

* Za vrijeme zigotena sintetiše se izvjesna količina DNA (zigotena DNA). Ova DNA sintetiše se u dugim sekvencama i u stanju je da "hibridizira" sa svim tipovima DNA (svih hromosoma), što ukazuje na odsutnost specifičnih mjesta za sintezu DNA u zigotenu. Ako se sinteza zigotene DNA inhibira, posljedica je odsustvo homolognog sparivanja hromosoma. DNA se sintetiše i u pahitenu (pahitena DNA). Za razliku od zigotene DNA, ova se sintetiše u kratkim sekvencama, a balansirana je sa degradacijom već postojeće DNA. Ako se sinteza ove DNA inhibira dolazi do fragmentacije hromosoma. Kratki lanci pahitene DNA iščezavaju krajem ove podfaze.

Multipla crossingover

Ako pretpostavimo da se crossingover dešava slučajno u mejozi duž hromosoma, može se pretpostaviti da se dešava više crossingovera od jednog u datoj regiji. Takve nazivamo multiplim crossingoverima. Dešavaju se simultano, pojedinačno i nezavisno jedan od drugog. Do crossingovera između nevezanih gena može doći na dva načina. Prvo, između nevezanih gena koji se nalaze na različitim hromosomima. Drugo, između nevezanih gena koji se nalaze na istom hromosomu ali su na većoj udaljenosti i između njih može doći do višestrukih crossingovera.



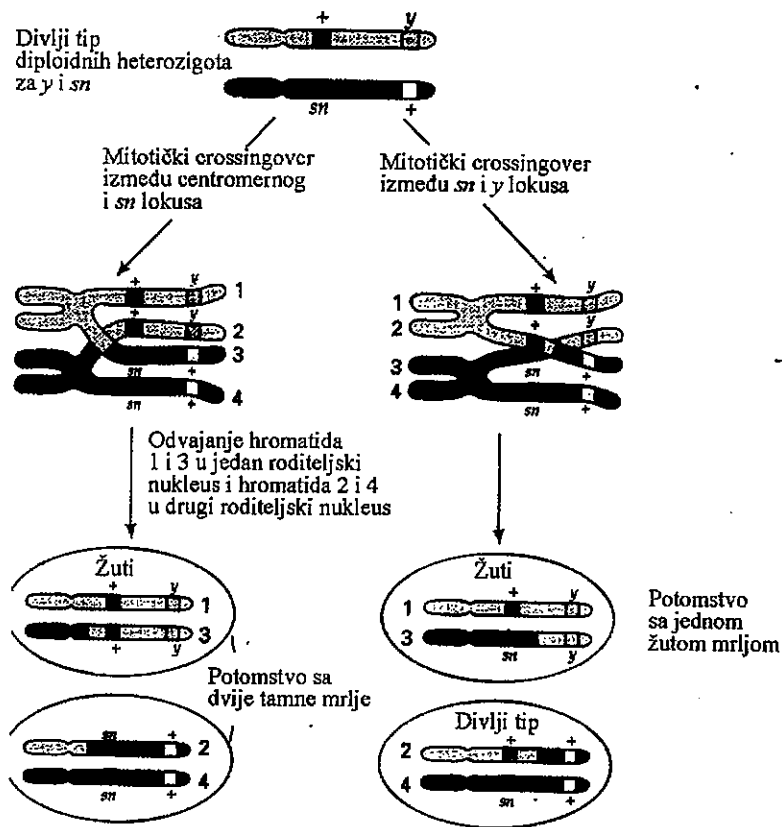
Slika 9.13 Crossingover između dva gena locirana na istom hromosomu. Strelice pokazuju mjesta koja su obuhvaćena crossingoverom: (a) nema crossingovera; (b) jednostruki crossingover; (c-d) tri tipa duplog crossingovera. (Prema, Russel, J.P.1992.).

Slika 9.13 prikazuje rezultate jednostrukog i dvostrukog crossingovera i produkciju roditeljskih i rekombinantnih hromatida. Jednostruki crossingover između nesestrinskih hromatida rezultira sa dvije roditeljske i dvije rekombinantne hromatide; odnosi se na dva lokusa sa 50 procenata rekombinacija. Dvostruki crossingover obuhvata dvije, tri ili sve četiri hromatide. Dvostruki crossingover između nesestrinskih hromatida produkuje zajedno jednu polovinu parentalnih (50%) i jednu polovinu rekombinantnih hromatida (50%). Frekvencija rekombinacija između nevezanih gena na istom hromosomu je limitirana sa 50 procenata.

Na osnovu frekvencije multiplog krosingovera vezanih gena kao i učestalosti mitotičkog krosingovera američki naučnik Morgan je konstruisao prve genske karte kod *Drosophila melanogaster*. Na temelju ovih saznanja i brojnih savremenih tehnika mapirani su genomi brojnih prokariotskih i eukariotskih organizama.

Mitotički crossingover

Eksperimentalno je evidentirano da se u nekih organizama crossingover dešava i u toku mitoze slično kao i u toku mejoze. Mitotički crossingover (mitotička rekombinacija) moguće je pratiti u diploidnim ćelijama (sl. 9.14). U toku procesa mitoze produkuje se potomstvo ćelija sa različitom kombinacijom gena u odnosu na diploidne roditeljske ćelije koje su ušle u mitotički ciklus. U toku mitoze svaki par homolognih hromosoma se replicira. Hromatide se postavljaju u metafaznu ploču.



Slika 9.14 Mitotički crossingover u diploidnim ćelijama.

Kada se hromatide odvoje svaka ćelija potomak primi jednu kopiju svakog roditeljskog homologa, tako svaka ćelija ima sličnu genetsku konstituciju kao parentalna ćelija. Slika prikazuje rezultate mitotičkog crossingovera između gena c i d u ćeliji. Nakon crossingovera odvajaju se po dva para hromosoma i migriraju nezavisno u metafaznu ploču, tj. orijentišu se prema jednom od dva moguća pravca.

Pojava somatskog crossingovera se dešava i u humanim ćelijama. Uglavnom se dešava u mladim embrionalnim ćelijama za vrijeme njihove mitotičke diobe. Kao rezultat mitotičkog crossingovera može nastati različito somatsko tkivo. Ukoliko se radi o heterozigotnim organizmima ili kod mikroorganizama, dobiva se fenotipski različito potomstvo, kao da se radi o ukrštanju. Crossingover somatskog tipa može nastupiti i u spolnim ćelijama, ali prije redukcije tj. u ovogonijama, što uslovljava velike genetske promjene kod potomaka.

U zaključku, kada su stvoreni svi preduslovi za rekombinaciju (sinapsis ili sparivanje homolognih hromosoma, sinteza sinaptonemalnog kompleksa i sinteza zigotene i pahitene DNA) homologna rekombinacija može da započne. Homologna rekombinacija se odvija na nivou četiri hromatide, mada se u izmjenju uključuju dvije nesestrinske hromatide. Na kraju su obrazovane dvije hromatide sa razmijenjenim i dvije sa nerazmijenjenim genetskim materijalom. Dvije izmjenjene hromatide su komplementarne. Razmjena genetskog materijala se izvrši preko hijazmi mjesta vezivanja sestara hromatida u pahitenu mejoze I.

U nekim slučajevima, naprimjer, ako se u području hibridne DNA nalaze mutacije u roditeljskim molekulama, pojavit će se nesparene baze u heterodupleksu, što uzrokuje djelimično odvajanje lanaca, to može biti prepoznato.

Enzimi uključeni u homolognu rekombinaciju

U procesu rekombinacije uključeno je više enzima identificiranih pri analizi rekombinacije kod bakterije *E.coli*. U procesu rekombinacije zastupljeni su specifični enzimi i proteini kao egzonukleaze, endonukleaze, DNA polimeraza, ligaza i jednolančani DNA vezani proteini). Centralni enzim RecA za homolognu rekombinaciju promovira izmjenu lanaca između homologne DNA uzrokujući heterodupleks formu. Da bi se obavila rekombinacija genetskog materijala, potrebno je da se "presječe" molekula DNA, da se izvrši sinteza molekula DNA da bi se povezali molekuli DNA koji se prenose sa jednog na drugi homologni hromosom. Na dvojnog spiralizovanom lancu DNA enzim endonukleaza prekida samo jedan lanac. Enzim dostiže maksimum aktivnosti na početku pahitena. Enzim egzonukleaza vrši dodatna isjecanja nukleotida sa istog lanca DNA molekule, a isto se dešava i na drugom naspramnom molekulu DNA. Tako na oba lanca DNA homolognog hromosoma postoje jednolančani krajevi za koje se vezuju proteini rasplitanja da se lanac ne bi dalje rasplitao. U pahitenu je sintetisana pahitena -DNA i ona popunjava nastale otvore uz pomoć

enzima DNA polimeraze. Isječeni i prebačeni dijelovi jednog lanca molekule DNA na drugi lanac DNA se spajaju DNA ligazom. Opisani proces rekombinacije dokazan je kod prokariota i virusa i uočen je čitav niz biohemijskih sličnosti sa analizom profaze mejoze i u eukariotskim ćelijama.

Nehomologna rekombinacija

Homologna rekombinacija rezultira u izmjeni gena između hromosomskih parova dovodeći do nove kombinacije gena u genomu. Nasuprot, drugi tip ove rekombinacije dovodi do preraspodjele genoma DNA. Neke od ovih rearanziranih DNA su važne u kontroli genske ekspresije u specifičnim ćelijskim tipovima. Otkriće da neki geni mogu mijenjati mjesto u različitim hromosomskim lokusima proizišlo je iz studija Barbare McClintock šezdesetih godina prošlog vijeka. Slučajno, na osnovu genetske analize, McClintock je opisala nove genetske elemente koji mogu mijenjati lokacije u genomu i mijenjati ekspresiju susjednih gena. Otkrićem ovih pokretnih elemenata u bakterijama radovi McC su bili u potpunosti rasvijetljeni i danas se prepoznaju i u prokariotskim i eukariotskim ćelijama. Ti elementi su danas poznati kao *insercijske sekvencije (IS)*, mogu se ugraditi u mnogo mjesta na hromosomu i prekinuti ekspresiju gena što dovodi do njegove inaktivacije. Ili, geni odgovorni za rezistenciju na bakterije mogu se premješati od jednog do drugog molekula DNA -nazvani su *transposoni (Tn)*. Nehomologna rekombinacija obuhvata specifičnu rekombinaciju između specifičnih mjesta (tačno određeni redoslijed baza) prisutnih na jednoj ili obje molekule DNA- i na nespecifičnu rekombinaciju koja se događa na bilo kojem mjestu između heterolognih molekula DNA.

Specifična rekombinacija naziva se ugradnja genetskih elemenata u hromosom bakterija ili bakteriofaga, neovisno o prisustvu produkta RecA gena koja se događa između specifičnih mjesta molekula DNA. Poznati su tipovi genetskih elemenata koji sudjeluju u specifičnoj rekombinaciji: lizogeni bakteriofagi, plazmidi, insercijske sekvencije i transposoni. Znači, da bi se ugradio bakteriofag, plazmid, virus lambda i faktor fertiliteta F u bakteriju E.coli, potrebno je prisustvo specifičnih mjesta na obje molekule DNA. I upravo najbolje opisani primjer specifične rekombinacije za koju je potrebno prisustvo specifičnih mjesta na obje molekule DNA jeste ugradnja bakteriofaga lambda u hromosom bakterije E.coli. U slučaju nespecifične rekombinacije nije potrebno prisustvo produkta RecA gena, ni specifično mjesto na jednoj ili obje molekule DNA. U ove događaje ubrajaju se spontane delecije, duplikacije hromosoma, kao i formiranje defektnih virusnih čestica u procesu neograničene transdukcije.

GAMETOGENEZA PROČITO

Gametogeneza podrazumijeva skup procesa koji se odigravaju u nediferenciranim, germinativnim ćelijama iz kojih nastaju visokodiferencirane spolne ćelije - gamete. Proces razvoja muških spolnih ćelija-gameta označen je kao spermatogeneza, a proces razvoja i sazrijevanja ženskih spolnih ćelija-gameta, oogeneza. Proces gametogeneze dešava se u ćelijama tkiva spolnih žlijezda, u sjemenicima i jajnicima, testisima i ovarijima. Iako se gametogeneza odvija u svih životinja na istoj osnovi, ipak se u raznih vrsta organizama pojavljuju za vrijeme ovog procesa veće ili manje razlike. U čovjeka, naprimjer, spolne ćelije dozrijevaju u jajnicima i sjemenicima, a kod mnogih vrsta se to dešava u jajovodima i sjemenovodima. Sam proces gametogeneze prolazi kroz tri karakteristične faze: faza umnožavanja, faza rasta diploidnih ćelija i faza redukcije i sazrijevanja. U fazi umnožavanja iz primordijalnih ćelija (ćelije zametnog epitela) mitotskom diobom nastaju ogonije odnosno spermatogonije. U fazi rasta ogonije ili spermatogonije se povećavaju - izrastaju u znatno krupnije ćelije, primarne oocite odnosno primarne spermatocite. U procesu oogeneze u ovoj fazi se razlikuje period previtelogeneze (sinteza nukleinskih kiselina i prekursora vitelusa) i period vitelogeneze (akumulacije hranljivih materija vitelusa). U fazi rasta primarne oocite i primarne spermatocite imaju krupnu jezgru bogatu hromatinom, jer se neposredno pred formiranje primarne oocite i spermatocite DNA replicira i genetski materijal učtverostruči (previtelogeneza). Faza sazrijevanja primarnih oocita i primarnih spermatocita podrazumijeva proces diobe, tj. mejozu I i II, u okviru koje se dešava i razmjena genetskog materijala ili crossingover i redukcija broja hromosoma sa diploidnog na haploidni broj.

OOGENEZA

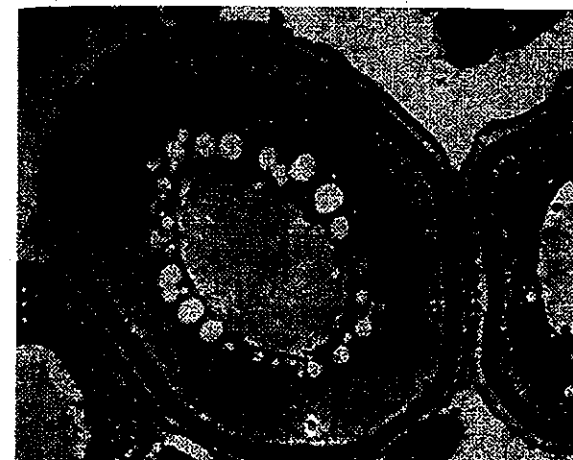
Umnožavanje i rast jajne ćelije

Proces postanka jajeta naziva se oogeneza, a nastaje u ženskoj rasplodnoj žlijezdi - ovarijumu. Karakteristično je za oogenezu mnogih životinja i čovjeka da na kraju mejoze nastane samo jedno, za oplodnju sposobno jaje iako prvom i drugom mejotskom diobom nastanu najprije dvije, a zatim četiri kćeri ćelije. Za nastanak samo jednog jajeta potrebni su: "Lampbrush" hromosomi sa svojim hromatinskim petljama na kojima se vrši transkripcija iRNA (informaciona RNA), amplifikacija ribosomalnih gena na DNA (udvostručavanje ribosomalnih gena nekoliko hiljada put) koji uslovljavaju sintezu ribosomalne RNA, a ova je strukturni element ribosoma. Svi ovi elementi se pohranjuju u jednoj jajnoj ćeliji, kada bi ovi elementi bili razdijeljeni između četiri ćelije ne bi bilo dovoljno za rane stadije razvitka. Ostale tri ćelije bivaju odbačene kao polocite ili polarna tijela. Žena za vrijeme 25-godišnjeg reproduktivnog

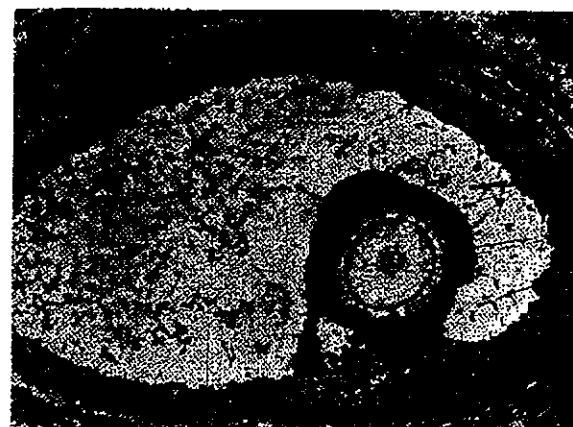
dijela života proizvede samo nekoliko stotina jaja za razliku od muškarca koji za to isto vrijeme proizvede nekoliko biliona spermatozoida. Proces oogeneze u čovjeku počinje, zapravo, dok se ženski embrio nalazi u majčinoj utrobi. U ženskom embrionu starom tri mjeseca nalaze se dvije vrste ćelija u ovarijumu. To su oogonije i folikularne ćelije nastale mitotskom diobom. Oko petog mjeseca embrionalnog razvoja formira se populacija od oko sedam miliona oogonija. Neke od njih prestaju da se dalje dijele mitozom već izrastaju i diferenciraju se u primarne oocite, a od folikularnih ćelija formira se, oko primarne oocite, primarni folikul. U sedmom mjesecu trudnoće skoro su sve oogonije transformisane u oocite, ostale oogonije koje nisu ušle u ovu fazu razvika podliježu degeneraciji (atrezija folikula). Tako u momentu rođenja neki ovarijumi sadrže oko 2.000.000 oocita. Inače, proces degeneracije se i dalje nastavlja. U pubertetu se pomenuti broj svede na oko 300.000, proces degeneracije se, međutim, dalje nastavlja. Svakog mjeseca nekoliko oocita podliježe okončavanju mejoze, druge se degenerišu. Kod žene, tokom pedesetak godina (koliko traje reproduktivna faza života) samo 400 - 500 jajnih ćelija će ovulirati ili biti pripremljeno za oplodnju.

Sazrijevanje jajne ćelije.

Faza sazrijevanja oocita sisara počinje još u toku fetalnog života. Primarne oocite (nastale izrastanjem oogonija) ulaze u mejozu I. U profazi (u stadijumu diplotena) proces oogeneze zaustavlja se i primarne oocite ulaze u stadijum "mirovanja" (diktioteni stadijum). Za ovaj stadijum karakterističan je "četkast oblik hromosoma". U stadijumu diplotena oocite ostaju sve do spolne zrelosti (doba puberteta) kada se proces mejoze nastavlja. U ovarijumu mogu se naći jajne ćelije koje su zaustavljene u mejozi više godina (sa dugim stadijumom diplotena) za koje se smatra da mogu biti uzrok različitih anomalija kod djece. Primarni folikul u pubertetu počinje da sazrijeva i da se dijeli. Od primarnih folikularnih ćelija formira se debeli sloj - stratum granulozum. Membrana oocite - plazmolema ili oolema postaje gušća. Iznad plazmoleme nalazi se prozirna opna-zona pelucida (sl. 9.15). Neposredno na zonu pelucidu naliježu ćelije korona radijata koje su preko protoplazmatičnih produžetaka što se pružaju kroz zonu pelucidu povezane sa citoplazmom oocite i na taj način omogućuju njenu ishranu u toku rasta i sazrijevanja. Iznad stratum granulozum je vezivni omotač-theka folikuli (sl. 9.16) koja se diferencira u dva sloja, spoljašnji fibrozni i unutrašnji membranozni, prožet krvnim sudovima. U ovoj su fazi najvažnije citološke promjene koje se događaju na ćelijama granuloznog sloja i ćelijama theke interne. Pomenute ćelije akumuliraju lipide u citoplazmi i zadobijaju poligonalni oblik. To su luteinske ćelije, a jajni folikul nosi sada naziv korpus luteum koji luči progesteron.



Slika 9.15 Ovociti, zona pellucida i sloj folikularnih ćelija u toku razvika jajnika riba. (Uslužnošću Pantić, R.V.1997.)



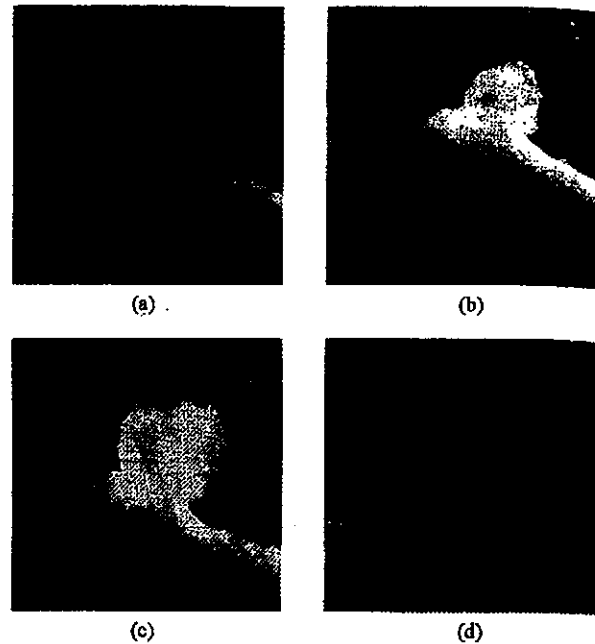
Slika 9.16 Folikul (a) u razviku ovocite, (b) ćelije zone granuloze, (c) folikularna šupljina i (d) teka folikuli jajnika štakora. (Hirschfeld, A.N. 1998.)

Sekundarni folikul (sl.9.16) znatno je većih dimenzija od primarnog. Sekundarni folikul prepoznaje se još po šupljinama nepravilnog oblika koje se javljaju između ćelija stratum granulozum. Formirane šupljine antrum ispunjene su folikularnom tečnošću. U vrijeme pojavljivanja antruma prestaje rast oocite. Međutim, i sam folikul prestaje da raste. Oocita zauzima ekscentričan položaj u odnosu na čitav folikul. Smještena je na jednom kraju-izvratu folikularnih ćelija-cumulus opharus.

Tercijerni folikul (De Grafov folikul) ili zreli folikul maksimalne je veličine. Veličina je dostignuta 14-og dana menstrualnog ciklusa (računajući od prvog dana po menstruaciji). Zreli se folikul nalazi na površini ovarijuma. Neposredno prije pucanja zrelog folikula formirana je sekundarna oocita i polarno tijelo procesom mejoze I. Nakon mejoze I, De Grafov folikul prska (ovulacija), izbacuje se sekundarna oocita opkoljena ćelijama corona radijata u ovidukt.

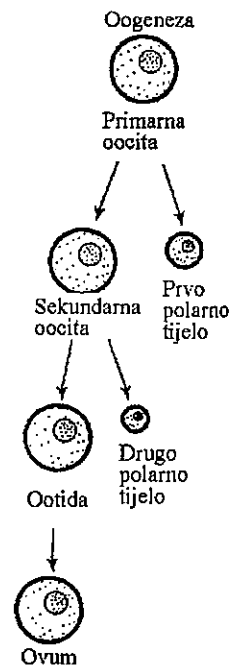
Kad sekundarna oocita i primarna polocita pređu u ovidukt, nastupa mejoza II. Mejoza II se ne završava već ostaje na stadijumu metafaze do momenta fertilizacije, odnosno oplodjenja. U toku metafaze II oocita se postepeno spušta niz jajovod. Ukoliko dođe do oplodjenja, hromatinski materijal se podijeli na sličan način kao kod mejoze I. Prvo polarno tijelo (primarna polocita) podliježe fragmentaciji i zatim iščezava. Drugo polarno tijelo (sekundarna polocita) formira se jedino ako je ćelija oplodena. Ukoliko ne dođe do oplodjenja, sekundarna polocita biva apsorbirana u stadiju metafaze II. Vijek oocite koja je sposobna da primi spermatozoid iznosi oko 24 sata ili manje. Slika 9.17 prikazuje proces ovulacije.

Slika 9.17. Ovulacija (a) Sekundarna oocita vidljiva kao mala mrvica, počinje se pojavljivati iz folikula ovarijuma. (b, c) Punom snagom razbija se folikul i biva opkoljen svijetlim krugom ćelija korona radijata. (d) Osloboden je kompletan folikul, a oocita počinje putovati prema oviduktu. (Iz Barnes C. 1989.)



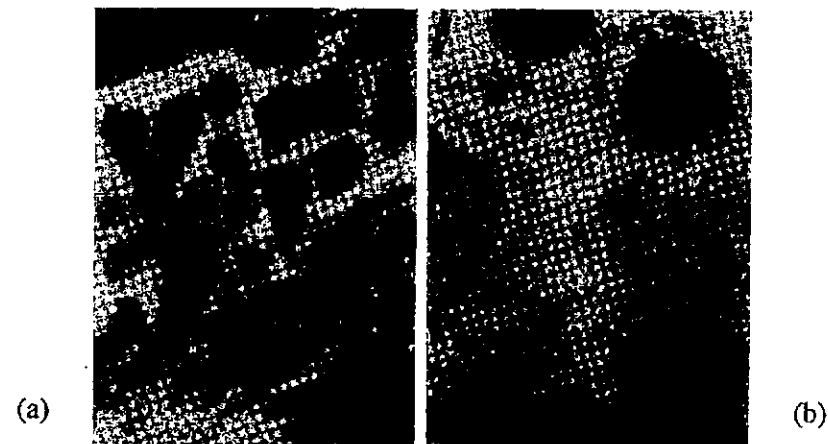
U zaključku, oogeneza šematski mogla bi se izložiti na sljedeći način (sl.9.18): iz germinativnih epitelnih ćelija ovarijuma mitotičkom diobom nastaju oogonije. Nakon nekoliko uzastopnih mitotičkih dioba oogonije izrastaju-povećavaju se u primarne oocite. Nakon što se primarne oocite podijele redukcionom diobom (mejoza I) , u jednoj ćeliji ostaje skoro sva citoplazma sa haploidnim brojem hromosoma-sekundarna oocita. Druga se ćelija naziva primarna polocita, ima malo citoplazme i haploidno jedro. Poslije diobe (mejoza II) sekundarne oocite nastaje: ootida, velika jajna ćelija i jedina sposobna za oplodnju. Primarna polocita može se podijeliti na dva polarna tijelašca. Međutim, sva tri polarna tjelešca se razgrađuju i resorbuju.

Slika 9.18 Oogeneza šematski u ćelijama sisara



SPERMATOGENEZA

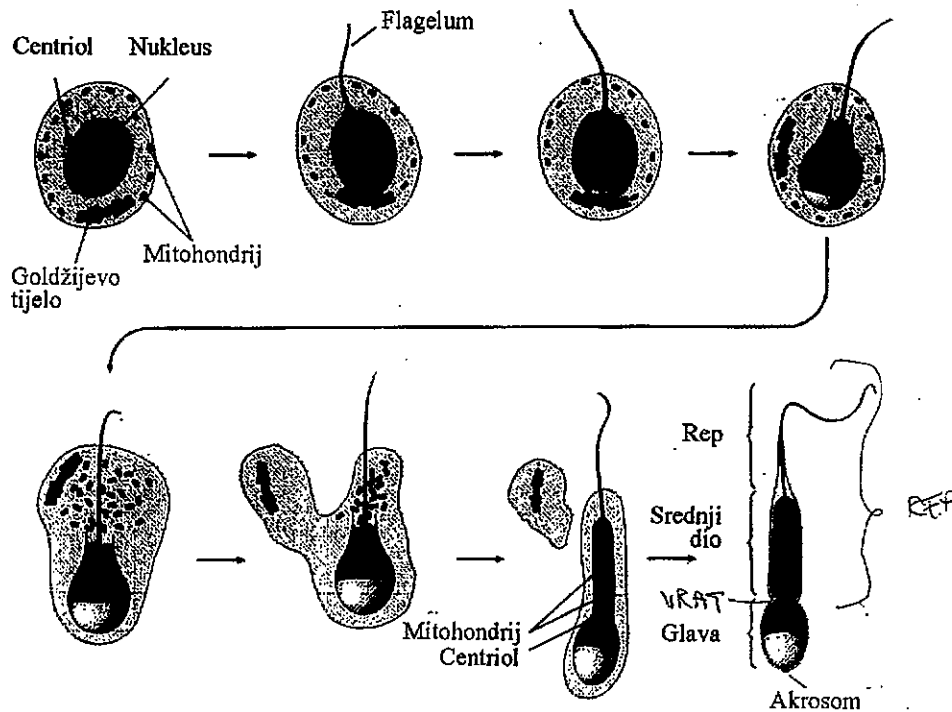
Proces razvoja i sazrijevanja muških spolnih ćelija, spermatozoida ili spermija naziva se spermatogeneza (sl. 9.19a). Proces započinje u doba spolne zrelosti (puberteta) muškaraca. Tada se aktiviraju muške spolne žlijezde testisi i počinje proizvoditi spolne ćelije - spermije i izlučivati velike količine testosterona. Hormon testosteron utiče na ispoljavanje muških sekundarnih spolnih karakteristika (dublji glas, jača muskulatura, rast dlake, brade i brkova) koje su obilježja muškog fenotipa. Spermatogeneza se odvija u brojnim kanalićima testisa (tubuli kontorti). U epitelnom sloju koji čini potpurnu membranu kanalića nalaze se brojne Sertorijeve ćelije, potporne ćelije i spolne praćelije- spermatogonije. Spermatogonije je lako prepoznati u odnosu na Sertorijeve ćelije, jer su okrugle, zapravo imaju okruglast nukleus koji dobro prima boju. Nakon niza uzastopnih mitotičkih dioba diploidne spermatogonije izrastaju, povećavaju se u primarne spermatocite (spermatocite I reda). Primarne spermatocite (faza rasta ćelija) su krupne ćelije sa velikim nukleusom bogatim hromatinom. Sa njima zapravo započinje faza rasta u procesu spermatogeneze. Primarne spermatocite imaju diploidan broj hromosoma i one procesom mejoze I i daljom diferencijacijom daju spermatocite II reda ili sekundarne spermatocite. Sekundarne spermatocite (faza umnožavanja ćelija) imaju haploidan broj hromosoma. Znatno su manje od primarnih spermatocita. Teško se uočavaju jer se odmah nastavljaju dijeliti (mejoza II) na spermatide. U procesu diferencijacije od primarne spermatocite sa diploidnim brojem hromosoma nastaju četiri spermatide (redukcijskom diobom-mejoza I i II) sa haploidnim brojem hromosoma. Spermide (sl. 9.19b) su male, okrugle i nepokretne ćelije. Nastankom spermida završava se faza umnožavanja ćelija u procesu spermatogeneze, a započinje faza sazrijevanja (spermiogeneza) kada nepokretne spermide prelaze u pokretne spermije.



Slika 9.19 (a) Spermatogeneza u sjemenom kanaliću (b) spermide u toku spermiogeneze sa kondenzovanim hromatinom i formiranjem akrozoma (strelica). (Prema Pantić V.P.1997.)

Spermiogeneza

Spermiogeneza (faza sazrijevanja ćelija). U procesu spermiogeneze spermatide bez ikakve diobe preobraćaju se u spermatozoide. Preobražaj spermatide u spermatozoid započinje redukcijom citoplazme. Spermatida se izdužuje na jednu stranu ćelije, povlači se nukleus na drugu stranu citoplazme. Od nukleusa se formira glava spermija, od nešto citoplazme srednji dio (vrat) i od ostatka citoplazme rep. (sl. 9.20 i 21). Glava spermija je građena od gusto kondenzovanog hromatina. Na prednjem dijelu glave spermija nalazi se akrosom nastao kao posljedica funkcije Golgijeva aparata. U ovom dijelu se nalaze brojni enzimi npr. hijaluronidaza koji razgrađuju hijaluronsku kiselinu, a ova se nalazi u omotaču jajne ćelije. I drugi enzimi prisutni u akrosomu omogućavaju spajanje spermija sa jajnom ćelijom. U vratu spermija se nalaze centrioli sa jednim parom mitohondrija.

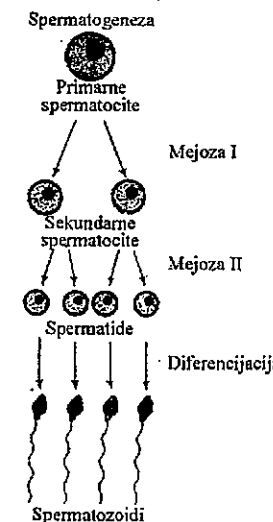


Slika 9.20 Od spermatogonija do spermatozoa Glava zrelog spermija adriži najveći dio ćelijskog nukleusa. Dio citoplazme se produžava u dugački rep. Mitohondriji proizvode energiju. Akrosom sadrži enzime koji prodiru kroz zaštitne slojeve oko oocite (Ricki LeWis, 1999.)



Slika 9.21 Humani spermij (a) Skenirana elektronska mikroskopografija spermija u humanim ćelijama. (b) Kada je humani spermij bio prvi puta viden pod mikroskopom, mislilo se da su to infektivni mikrobi. Ova ilustracija prezentira drugu raširenu ideju o ulozi sperme. Neki ljudi su mislili da oni nose preformirane humane spermije, takozvane homuncus.

Rep je složene građe, jer se njegovom dužinom mijenjaju različite strukture. Rep spermija je duga nitasta tvorevina obavijena tankim slojem citoplazme. Rep ili bič se dijeli na srednji, osnovni i terminalni dio. Srednji dio obuhvata dio biča u kome se nalaze spiralno raspoređene mitohondrije, koje obezbeđuju energiju za kretanje spermatozoida. Na poprečnom presjeku zapažaju se tri prstena: spoljašnji prsten sastavljen od devet krupnih fibrila, unutrašnji prsten sastavljen od devet dvostrukih fibrila i centralni prsten stavljen od dvostruke centralne fibrile uklopljene u matriks. Osnovni dio biča obuhvata najveći dio spermatozoida. U ovom dijelu bič je obavijen proteinskim omotačem. Na poprečnom presjeku razlikuje se spoljašnji prsten i centralna fibrila. Pri kraju ovog dijela iščezava spoljašnji prsten. Terminalni dio se sastoji od unutrašnjeg prstena i centralne fibrile. Opoljen je ćelijskom membranom, a nedostaje mu proteinski omotač. U pubertetu započeta spermatogeneza traje do duboko u starost, pa se u životu muškarca stvori enormni broj spermija. U spolnom aktu muškarac izlučuje od 3 do 6 ml sjemene tekućine u kojoj ima 5 do 10×10^7 spermija (ml ejakulata). Otprilike 3-4% u muškaraca je sterilno ili neplodno. Iako je teorijski za oplodnju jajne ćelije potreban samo jedan spermij, sterilitet nastaje kad se broj spermija u ejakulatu muškarca smanji ispod vrijednosti $1,5 \times 10^7$ spermija (ml ejakulata). Zbog velike i svakodnevnne spermatogeneze uvijek može nastati malen broj abnormalnih spermija. Međutim, ako je u ejakulatu manje od 50% pokretnih i više od 50% nenormalnih spermija, javlja se sterilitet u muškarca. Spermatogeneza šematski prikazana je na slici 9.22.



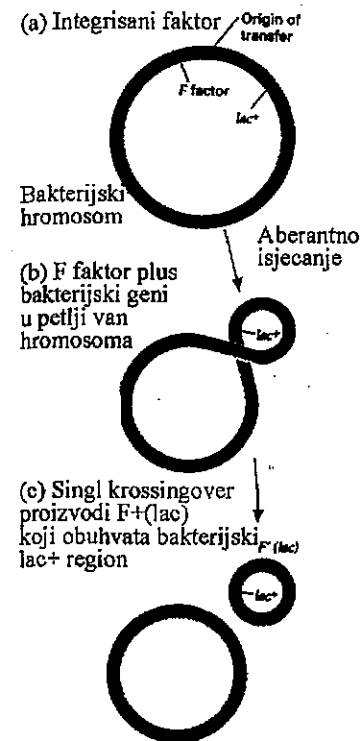
Slika 9.22 Spermatogeneza šematski Nakon nekoliko uzastopnih mitotičkih dioba spermatogonija, one izrastaju u primarne spermatocite. Primarne spermatocite ($2n$) se dijele mejozom I (redukuje se broj hromosoma) i svaka daje po dvije spermatide (n). Spermatide se nastavljaju dijeliti mejozom II. Svaka spermatida daje po dvije prespermatide koje metamorfozom prelaze u spermije sa n hromosoma.

REPRODUKCIJA I GENETSKA REKOMBINACIJA BAKTERIJA I VIRUSA

Neke vrste bakterija imaju osim hromosomske DNA, malu cirkulaturnu DNA, poznatu kao plazmid. Plazmidi koji imaju između 1.000 i 30.000 pari baza, uglavnom kodiraju proteine koji nisu bitni za rast ćelija, a mnogi od njih kodiraju proteine neophodne za rezistenciju na antibiotike ili toksine. Plazmid označen kao faktor fertiliteta F u bakteriji E.coli određuje razliku između muške i ženske ćelije a kodira i proteine za vrijeme parenja između ćelija, tj. konjugacije. Bakterije vrste Esherihiya coli se najčešće koriste kao model za izučavanje procesa replikacije i rekombinacije genetskog materijala u prokariotskoj ćeliji kao i za izučavanje genoma eukariotskih ćelija. Korištena je kao objekt za proučavanje procesa sinteze proteina u eukariotskim ćelijama. Proučavanjem ovog procesa, zapravo je otkriven mehanizam za reparaciju oštećene DNA u eukariotskim ćelijama. Za prve eksperimente u području tehnologije rekombinantne DNA korištena je opet bakterija E. coli. Ove prokariotske ćelije imaju hromosom (genom), a regulacija gena je kontrolisana mehanizmom operona. Grupe od dva ili tri gena se simultano uključuju ili su represirane u skladu sa mogućnostima bakterija za njihovo razmnožavanje.

KONJUGACIJA BAKTERIJA

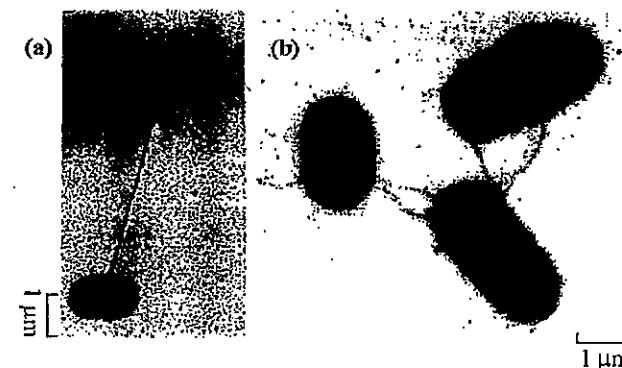
Pored direktne diobe neke bakterije se dijele i procesom konjugacije. Ovim procesom vrši se razmjena gena, a potom i rekombinacija genetskog materijala između dvije bakterije. Proces se odvija između muške i ženske ćelije preko protoplazmatičnog mosta. Spolnu razliku između muške i ženske bakterije određuje prisustvo specifičnog (genetskog) faktora koji se naziva F faktor (sl. 9.23) ili *fertilizacioni faktor*. Kada je ovaj faktor prisutan u ćeliji, ćelija je muška (F+), a kada je odsutan, ćelija je ženska (F-). Faktor F se javlja u dva stanja: kao integralni dio hromosoma, npr. kod bakterije E.coli ili kao vrlo mali slobodni hromosom koji se replicira jednom tokom ćelijske diobe. U ovom slučaju su F+ ćelije samo potencijalno muške ćelije, jer ne mogu da prenesu svoje gene u F- ćeliju. Jedino u slučaju kada je faktor F integralni dio hromosoma muške ćelije, može doći do konjugacije i razmjene genetskog materijala između F+ i F- ćelije. Dakle, do konjugacija dolazi (sl. 9.24) nakon priljublivanja dvije ćelije kada dio hromosoma ćelije davaoca (donora) F+, prelazi kroz citoplazmatski most u ćeliju primaoca (recipijenta) F-. Kada se genomi F+ i F- nađu zajedno u ćeliji primaoca među njima dolazi do razmjene i rekombinacije gena. U ovim slučajevima rekombinacija se dešava mnogo rjeđe. Međutim, dobivena je linija Hfr+ koja se rekombinuje mnogo češće.



Slika 9.23 Produkcija F faktora (a) bakterijski hromosom u kojem je F faktor integrisan; (b) F faktor i bakterijski geni se u vidu omči izdvajaju od hromosoma (lac⁺geni); (c) isjecanje jednostrukim crossingoverom između petlje-van DNA segmenata i ostatka bakterijskog hromosoma.

Pri konjugaciji Hfr+ i F- bakterija u ovu drugu najčešće hromosom Hfr+ prelazi najvećim dijelom u ćeliju primaoca F-, a nekada i cijeli hromosom sa faktorom polnosti F koji se nalazi na kraju hromosoma, tj. prelazi posljednji. (sl. 9.25). Pri konjugaciji linealno raspoređeni genom donora Hfr+ ulazi u F- bakteriju kroz konjugacionu cjevčicu istim redom i uvijek određenim krajem iz F+ u F- ćeliju. Svojstvo donora pripisuje se posredniku faktoru F. U svakoj F+ ćeliji prisutan je u 3-4 kopije. Produkcija F faktora prikazana je na slici 9.23. Pri ćelijskoj diobi faktor F prenosi se u samo jednu kćer ćeliju, pa dio potomstva nema faktor F i postaje F-, što dokazuje neovisnu replikaciju faktora F u odnosu

na bakterijski hromosom. Faktor F je opisan kao prvi primjer samostalnog genskog elementa sposobnog da u bakterijskoj ćeliji opstaje neovisno o bakterijskom hromosomu, ti elementi su nazvani *plazmidi*. Neki plazmidi se mogu ugraditi u bakterijski hromosom, kao faktor F, pa se još nazivaju epizomi.



Slika 9.24 Elektronska mikrografija konjugacije u ćelijama E.coli.

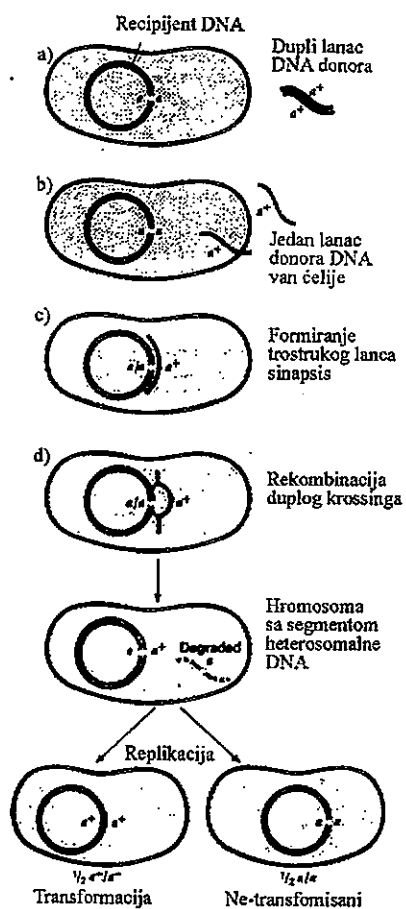
a) Duža F+(muška) ćelija i manja F- (ženska), između njih je uspostavljen konjugacioni most. Geni na F plazmidu determinišu sintezu konjugacionog mosta. Na F+ ćeliji nalaze se brojni citoplazmatski nastavci. b) Elektronska mikrografija simultane konjugacije između donje ćelije sa dvije gornje (Iz Keeton, 1986.)

Transformacija

Prenos genetskog materijala transformacijom kod pneumoocca (*Streptococcus pneumoniae*) opisao je još 1928. godine Griffith. To je otkriće ubrzo postalo osnova moderne genetike. Transformacijom je prvi puta dokazano da se nasljedni materijal može prenositi iz jedne bakterijske ćelije u drugu i da je nosilac genetske informacije u organizmu molekula DNA. Standardne metode transformacije su različite ovisno o vrsti bakterija i provode se kroz nekoliko faza (sl. 9.27): izoliranje, fragmentiranje i prečišćavanje DNA donora. Izoliranje, prečišćavanje i fragmentiranje započinje lizom ćelije pomoću enzima lizozima. Oslobodena DNA se taloži alkoholom, pri čemu se molekule DNA nakupljaju između sloja alkohola i vode. Istaložena DNA se pažljivo namota na stakleni štapić i otapa u vodi. Prečišćavanje se vrši pomoću enzima ribonukleaze i različitim hemijskim sredstvima. Prečišćena DNA se fragmentiše (15-20 fragmenata). Transformacijom se iz jedne bakterije u drugu prenosi vrlo mali broj gena. Drugi faktor koji utiče na učestalost pojavljivanja rekombinacija u procesu transformacije jeste kompetentnost ćelije recipijenta (primaoca). To je fiziološko svojstvo ćelije da primi i veže dijelove prečišćene DNA u tačno određenom stadiju rasta. Prodiranje i vezivanje dijelova DNA sa ćelijama recipijenta je specifičan proces.

Ćelije recipijenta ne razlikuju vlastitu DNA od strane DNA. One vežu bilo koju dvolančanu DNA bez obzira na to što je u procesu transformacije aktivna samo homologna DNA. Nakon ulaska dijelova dvolančane DNA u ćeliju recipijenta, DNA prelazi u jednolančani oblik. Jedan lanac DNA se ugrađuje u hromosom recipijenta dok se drugi razgrađuje i nestaje. U fazi replikacije integrisanog fragmenta DNA donora i fragmenta DNA recipijenta, hibridna DNA nastala na taj način, dijeli se na roditeljski i rekombinantni genotip.

Slika 9.27 Transformacija u bakterija (a) bakterija sa a+DNA recipijenta i linealni fragment a+DNA donora; (b) jedan lanac donora je van ćelije (c) transformirana DNA donora i fragment u sinapsisu sa homolognim regionom na bakterijskom hromosomu; (d) dupli crossingover rezultat izmjene homolognih DNA segmenata i na kraju replikacija a+ transformanata. (Prema Roberts M. 1990.)



MOLEKULARNA GENETIKA VIRUSA

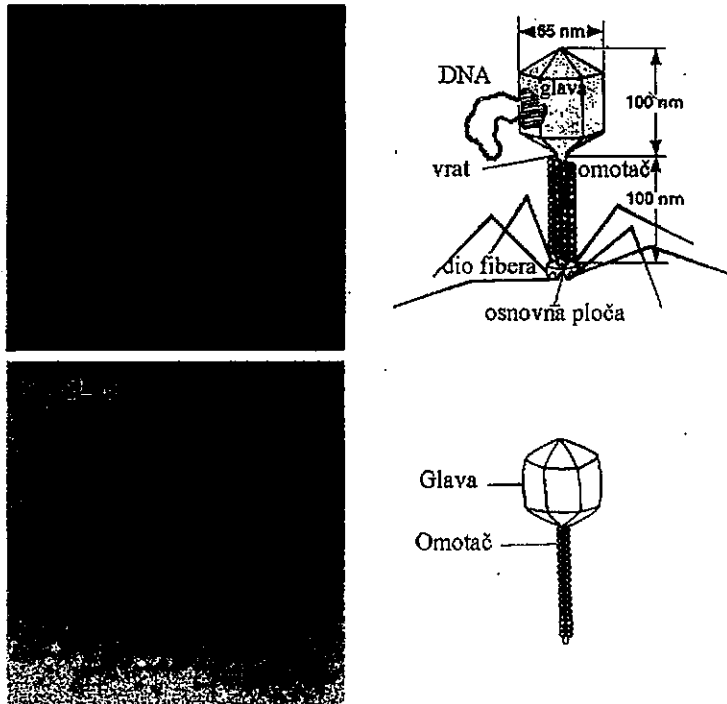
Naziv virus znači štetno dejstvo u organizmu. Potiče iz latinskog jezika i označava otrov životinjskog porijekla. Virusi su čestice sa visokim stepenom entropije, te mogu egzistirati jednako kao paraziti. Van ćelije su potpuno inertni, svoj broj povećavaju jedino ulaskom u ćeliju, bilo biljnu, životinjsku ili bakterijsku. Klasifikacija virusa izvršena je na osnovu njihove strukture. Dijele se na dvije grupe: lipoproteinske viruse u čiji sastav ulaze bjelančevine, nukleinske kiseline, šećeri, lipidi i neke druge komponente. Krupni virusi posjeduju fermente i osjetljivi su na dejstvo antibiotika i sulfonamida (virusi gripa). Sitni virusi su indiferentni na ove supstancije. Drugu grupu čine nukleoproteinski virusi u čiji sastav ulaze samo nukleinske kiseline DNA i RNA i proteini uključujući i enzim lizozim u bakteriofagama. Prema organizmu u kojem parazitiraju dijele se na: viruse bakterija (bakteriofagi), posjeduju uglavnom dvolančanu DNA ili jednolančanu RNA i proteinski omotač. Biljni virusi, obično sadržavaju jednolančanu RNA i proteinski omotač i virusi paraziti životinja i čovjeka, građeni od DNA i RNA i proteina. Virusi sadrže esencijelne nukleinske kiseline obavijene proteinskim omotačem, ali nemaju citoplazmu niti druge ćelijske elemente. Međutim, oni mogu da se prenose iz ćelije u ćeliju. Kada virusna DNA uđe u ćeliju (proteinski omotač ostaje van ćelije) obustavlja sintezu DNA ćelije domaćina, koristeći se biosintetskim aparatom ćelije za sintezu proteina i nukleinskih kiselina potrebnih za strukturiranje mladih virusa, nakon čega se u ćeliji domaćinu direktno produkuju novi virusi. Nukleinske kiseline virusa-viralni hromosom može biti DNA ili RNA, jednolančana ili dvolančana, cirkulatorna ili linijska. Neki veći virusi imaju po 5.400 nukleotida u svom hromosomu. Jednostruki lanac DNA T-bakteriofaga ima 174-180.000 nukleotida. Virusni hromosom kodira sintezu proteina omotača virusa i kodira jedan ili više enzima. Na ovaj način virus ne uništava samo genetski materijal ćelije domaćina već vrši dezintegraciju cijele ćelije. Ciklus infekcije je kompletan i završen kada su nukleinske kiseline obavijene novosintetisanim proteinskim omotačem i virusne čestice izašle van ćelije domaćina spremne da inficiraju nove ćelije.

Virusi bakterija (bakteriofagi: fag T4 i fag)

Virusi koji se razmnožavaju u bakterijama nazivaju se bakterijski virusi ili bakteriofagi (skraćeno, fagi). Neki fagi se ne razmnožavaju uvijek kada uđu u bakterijsku ćeliju. Umjesto toga njihov hromosom se integriše na određenom mjestu u hromosom domaćina te se udvostručava zajedno sa bakterijskim hromosomom. Fag koji je integrisan sa hromosomom ćelije domaćina naziva se profag, a bakterija koja sadržava profag lizogena bakterija. Fenomen ugrađivanja fagnog hromosoma u bakterijski hromosom naziva se lizogenost.

Struktura faga je jednostavna (sl. 9.28) Sastoje se od glave i repa. U glavi se nalazi genetski materijal (DNA i RNA). Nalaze se u jednom hromosomu obavijenim proteinskim omotačem. Glava ima prizmatičan oblik. Razlike u broju i organizaciji proteina daju fagama karakterističan izgled. Posjeduju posebne nastavke za pripajanje, a ćelija domaćina ima na svojoj membrani specifična mjesta, lokalizovane receptore za koja se fagi pripijaju. Na vrhu repa nalazi se 6 dugih savitljivih vlakana preko kojih se vrši kontakt sa ćelijama domaćina. U ćelijama repa sintetiše se enzim lizozim, pomoću kojeg fag razlaže zid bakterijske ćelije i ubacuje svoju DNA, a proteinski omotač ostaje van ćelije.

a) T4 phage



Slika 9.28 Elektronska mikrofografija i dijagram dva bakteriofaga: (a) T4 fag, koji je reprezent T-faga; (b) λ fage. (Wood, W.H. and Revel, H.R. 1990.)

Najveći broj bakterijskih vrste ima specifične fage. Naprimjer, E.coli je osjetljiva na infekciju DNA-faga T2, T4, T5 i (lambda) i još mnoge druge. Slika prikazuje elektronsku mikrofografiju i šeme dva faga koji imaju veliki genetski značaj, to su T4 (a) i λ fag (b). Fage T4 pripadaju seriji sličnih faga (T2, T4 i T6) nazvane zajedničkim imenom T - jednake fage. Imaju određen broj zajedničkih komponenti : imaju genetski materijal, nožice, osnovnu ploču, rep sa vlakancima. Glava i druge komponente sadrže proteine.

Lizogeni ciklus i rekombinacioni mehanizam

Životni ciklus T4 faga i λ faga nije identičan. Litički ciklus T4 faga započinje time što, fag djelimično dodiruje površinu bakterijske ćelije i fagni hromosom se injicira u bakteriju. U toku serije aktivnosti dolazi do kontrakcije faga. Djelovanjem fag-specifičnog enzima bakterijski hromosom se u potpunosti razgrađuje, a fagni hromosom se replicira. Ekspresijom fagnih gena strukturiraju se fagne komponente. Formirano potomstvo faga na kraju se oslobada nakon lize bakterijskog zida. Oslobodena suspenzija potomstva sadržava lizogene fage. Životni ciklus T4 faga nazvan je litički ciklus. Fage koje uvijek prate ciklus kada inficiraju bakteriju nazvane su virulentne fage.

Životni ciklus lambda faga prikazuje slika 9.29 i znatno je složeniji od T4 faga. Fag lambda ima strukturu sličnu T4 faga. Kada se DNA ugradi u E.coli, mogu se pratiti dva dijela ciklusa lambda faga. Jedan put je litički ciklus, najbliži T fagama. Drugi put je lizogeni. U lizogenom putu lambda hromosom se replicira umetanjem (integracija) sebe fizički u specifičan region ćelijskog hromosoma, slično integraciji F faktora. U ovom stadiju integracije fagni hromosom je nazvan profag. i u litičkom i lizogenom procesu ćelijski hromosom se replicira, a nekada se i integrisani lambda hromosom replicira.

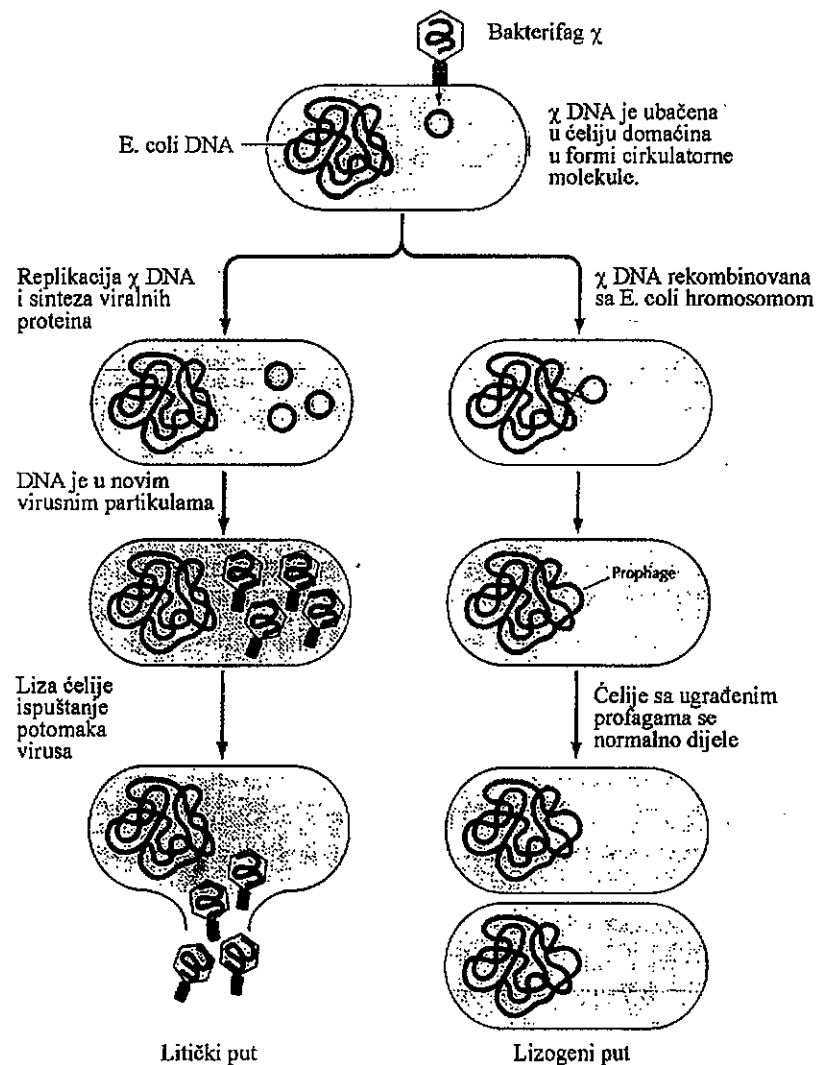
Fage mogu birati između litičkog i lizogenog puta nazvane umjerene fage.

Povremeno mehanizam profaga može biti defektan. Litički ciklus može biti induciran različitim faktorima kao što su UV zraci ili rentgenski zraci.

Kad virusna DNA uđe u ćeliju ona predstavlja vegetativni fag koji obustavlja sintezu DNA ćelije domaćina i, kako je prethodno opisano, koristi se biosintetskim aparatom ćelije za sintezu svojih proteina i DNA. Za kratko vrijeme u ćeliji domaćina se namnoži 100-200 zrelih faga. Membrana bakterijske ćelije pod dejstvom virusnog enzima lizozima se razgrađuje (liza ćelije), zreli fagi se oslobadaju i napadaju druge lizogene bakterije. Lizogenost je, inače, stabilno nasljedno svojstvo ovih bakterija. Lizogene bakterije posjeduju na svojim mjestima lokuse na kojima se ugrađuje genetski materijal faga. Pretpostavlja se da su ovi lokusi pripajanja komplementarni određenom regionu molekule DNA faga i između njih dolazi do rekombinacije. Mutirane fage, naprimjer, koje ne posjeduju ovaj lokus ne integrišu se jer ne mogu da "prepoznaju" lokus pripajanja. Do integracije i rekombinacije DNA faga dolazi putem razmjene između hromosoma domaćina i cirkulatornog hromosoma faga. Prije integracije hromosom virusa obrazuje krug koji se poslije vezuje za određeni region (lokus pripajanja) bakterijskog hromosoma. Oba hromosoma (faga i bakterije) se raskidaju, a zatim povezuju tako što se raskinuti krajevi virusnog hromosoma umjesto sa svojim DNA lancem, povezuje sa prekinutim krajem DNA lanca bakterije. Na taj način je profag integrisan u hromosom bakterije.

Postoje fagi koji ne liziraju ćeliju domaćina već se sinhrono reprodukuju sa domaćinom kroz više generacija. Ovo je tip zavisnog umnožavanja za razliku

od nezavisnog umnožavanja kada se fagi ne ugraju u bakterijski hromosom. Kako virusi nisu razdijeljeni u muške i ženske čestice, to kod njih nema tipične mejoze, pa se i rekombinacija genetskog materijala razlikuje od rekombinacije u mejozi.



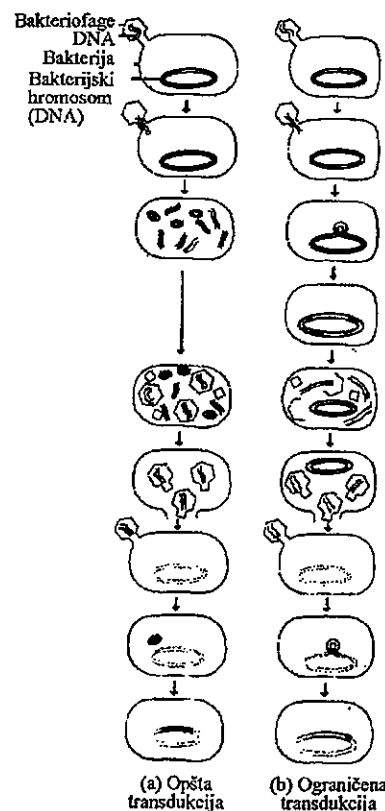
Slika 9.29 Litički i lizogeni put bakteriofaga. Bakterija *E. coli* inficirana sa DNA lambda, u formi cirkulatornog molekula u ćeliji. U litičkoj infekciji, DNA se replicira i direktno sintetizira viralne proteine. Potom se viralna DNA ugrađuje u viralne potomke koji se oslobadaju iz ćelije lizom. U lizogenoj infekciji, DNA rekombinira se sa genom domaćina u obliku profaga integrisanog u *E. coli* hromosom. Integrisana DNA ne sintetizira direktno potomstvo virusa, ali umjesto toga replicira se dalje sa ostatkom bakterijskog genoma. (Prema Curtiss R. 1989.)

Transdukcija

Transdukcija je proces pri kojem se prenosi genetski materijal između bakterijskih vrsta posredstvom bakterijskih virusa (bakteriofaga) koji inficiraju bakterije (sl. 9.30). Ne samo da se virusni geni ponekada ugraju u bakterijski hromosom, mogu se desiti i obnuti slučajevi.

Kada se profag nađe u bakterijskoj ćeliji, reprodukuje se, daje mlade virusne, u kojima mogu da budu ugrađeni mali fragmenti bakterijskog hromosoma. Međutim, geni koje oni nose od prethodnog domaćina, nakon infekcije novih bakterija, mogu se inkorporirati u hromosom novog domaćina. Ovisno o prenetim genima mogu se otkriti rekombinacije gena. Ovaj proces se naziva opšta transdukcija, jer praktično gen može biti prenet ovim mehanizmom u domaćina. Kada su profage oslobodene od hromosoma domaćina injiciraju litički ciklus, nakon čega mogu slične fragmente ponjeti sa sobom. Hromosom svakog novoformiranog faga može da sadrži obje DNA, domaćina i viralnu DNA.

U ovom slučaju DNA domaćina nije izabrana slučajno kao što je slučaj sa neumjerenim fagama, sasvim je specifična, ograničena proteinima hromosoma domaćina i potiče sa mjesta gdje su fagna DNA i bakterijska DNA bile spojene (restrikciono mjesto). Otuda, ovaj proces je poznat kao specifična ili restrikciona transdukcija.



Transdukcija ima sličnosti sa konjugacijom bakterija jer vrši transfer bakterijskih gena od jedne do druge bakterije. Razlikuje se u vektoru u ovom slučaju, to je virus. Kretanje gena od jedne do druge bakterije preko virusa nije ograničeno samo na bakterije. To ukazuje na mogućnost da neki geni koji imaju važan fenotipski efekat u čovjeka mogu biti preneti u humani hromosom preko virusa. Ovi geni mogu biti preneti u drugog čovjeka ili čak u drugu vrstu organizama i za posljedicu mogu imati transformaciju normalne ćelije u tumorsku. Virus, također, mogu da se ugrade i u ćelijske organele kao npr. u nukleus ćelije.

Slika 9.30 Dva tipa transdukcije. (a) Opšta transdukcija kada bakteriofage inficiraju bakteriju i podvrgnu ih litičkom ciklusu. (b) Ograničena ili restrikciona transdukcija kada bakteriofage inficiraju bakterije i ulaze u lizogeni ciklus. (Prema, Curtiss, R. 1989.)

Bez obzira na kojem se stupnju složenosti nalazi, svaki organizam nastaje iz jedne zametne ćelije. I najprostija živa bića - jednoćelijska vode porijeklo od samo jedne ćelije. Viši organizmi razvijaju se uglavnom iz jedne specijalizirane ćelije koja nastaje spajanjem reproduktivnih ćelija dvaju različitih spolova - muškog i ženskog.

OPLODENJE

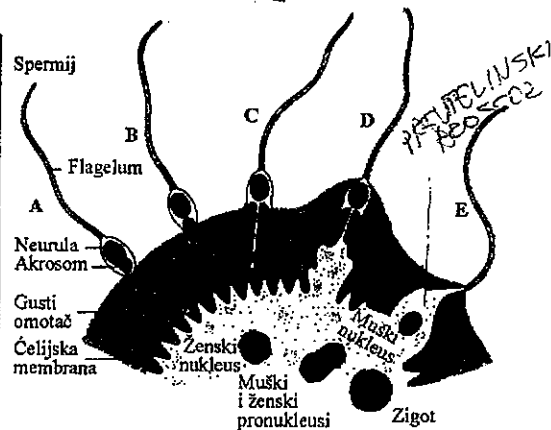
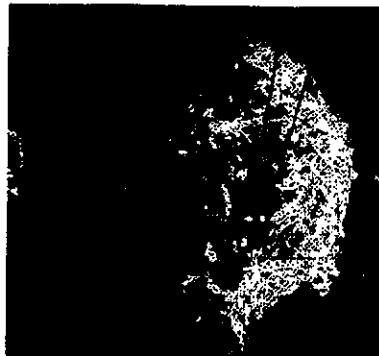
Oplodjenje jajne ćelije - fertilizacija je inicijalni proces u razviću svih vrsta živih organizama i karakteriše ga spajanje visokospecijaliziranih haploidnih polnih gameta muških i ženskih u diploidnu ćeliju - zigot. Jasno je da zigot posjeduje sve osnovne ćelijske strukture očevog i majčinog gameta, zatim faktore nasljeđa oba roditelja, te sve faktore koji determinišu tok razvitka novog organizma. Da bi uopšte došlo do oplodnje spermij se mora vezati za jaje, ta reakcija je specifična za svaku vrstu. Pretpostavlja se da se u spermijima nalaze proteini prepoznavanja (bindini), a na jajetu proteinski receptori. Muške i ženske gamete posjeduju aktivne materije koje omogućavaju njihov međusobni kontakt. Prema Hartmanu ove materije (gamoni) se dijele na ginogamone (antifertilizin) koji stimulišu kretanje spermija (luče ih jaja) i ginogamone II (fertilizin) koji ih aglutiniraju. Androgamone luče spermiji i oni koče dalju pokretljivost spermija, a enzim hijalorudinaza olakšava ulazak spermija u jaje, jer razlaže jajnu opnu.

Interakcija između gameta u procesu oplodnje

Da bi spermatozoid prodro u jajnu ćeliju potrebno je da niz biohemijskih procesa omogući specifične aktivnosti za vrijeme penetracije spermija u jaje.

To su: lučenje sadržaja akrozoma egzocitozom, nakon čega oslobođeni proteini olakšavaju povezivanje spermatozoida sa vitelusom koji se nalazi van plazma membrane ovocita, eksplozivnom polimerizacijom (akrosomska reakcija) aktin filamenti izbace vezikule akrosoma (oslobada se enzim hijalorudinaza koji razara jajnu ovojnici) koji omogućuju spermiju da prodre kroz zonu pelucidu i pride plazma membrani. Spajanjem plazma membrana spermija i jajeta filamenta aktina se razdvajaju i jedro spermija ulazi u ovocit. Vrh akrosomske tubule spaja se sa primarnom ovojnicom ćelije i sprečava ulazak većeg broja spermija u jajnu ćeliju (zastupljena je monospermija). Reakcija kortikalnih granula se dešava na mjestu dodira spermatozoida i jajne ćelije. Počinje prskanje krupnih vezikula ispunjenih glikoproteinskim granulama ispod primarne opne jajne ćelije (cortex). Oslobođeni sadržaj kortikalnih granula razara plazma membranu i stvara previtelinski prostor ispunjen tečnošću na čijoj se površini stvara nova oplodna ili fertilizaciona opna. Fertilizaciona opna (izgrađena od tri gušća sloja i dva rjeđa, debljine 500Å) formira se istog momenta kada prvi spermatozoid dodirne površinu jajne ćelije i sprečava ulazak većeg broja spermatozoida. Na mjestu dodira spermatozoida i jajne ćelije stvara se ispupčenje (atraktivni konus) na površini jajeta pomoću kojeg se glava i vrat spermatozoida pasivno uvlače u jajnu ćeliju (sl. 10.1).

Amfimiksiz je proces miješanja muškog i ženskog pronukleusa (muško i žensko jedro) kada nastaje amfinukleus (segmentaciono jedro). Put kretanja spermatozoida kroz citoplazmu jajne ćelije naziva se staza ulaska u citoplazmu dok se put kretanja pronukleusa u toku međusobnog približavanja naziva staza kopolucije. Položaj diobenog vretena određuje pravac diobe zigota i naziva se staza segmentacije (centrosom i diobeno vreteno zigota predstavljaju produkte spermatozoida, jer jajna ćelija ne posjeduje centrosom).



Slika 10.1 Fertilizacija (A) Spermiji u kontaktu sa vanjskim gustim zidom jajne ćelije. (B) Membrana akrosoma se fuzioniše sa plazma membranom, dolazi do rupture, počinje akrosomska reakcija uz učesće enzima. (C) Od membrane se formira tuba koja prolazi kroz zid jajeta. (D) Tuba se fuzioniše sa mikrovilima jajne ćelije, otklonjena je membranska barijera između sadržaja spermija i jajeta. (E) Pronukleusi spermija i jajeta se fuzionišu i daju zigot. (Prema Keeton, 1986.)

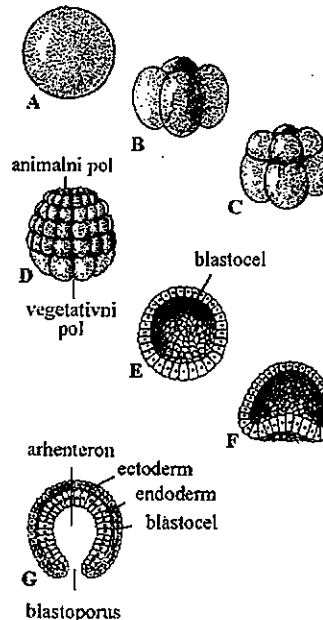
EMBRIONALNI STADIJUMI

Nakon spajanja pronukleusa, oplodjenje je gotovo, novi nukleus sada sadrži diploidan broj hromosoma, zahvaćen je procesom intezivne diobe-mitoze, nakon čega veoma brzo raste broj prvih embrionalnih ćelija. Sam proces diobe naziva se brazdanje, zbog velike količine citoplazme u kojoj ima dosta rezervnih materija (sl. 10.2).

Diobom zigota prvobitno nastaju dvije nove ćelije, njihovom podjelom četiri, a zatim 8, 16 ćelija itd. Kada se nakon nekoliko uzastopnih dioba formira skupina loptaste forme u obliku duda (grčki morus-dud), nastaje morula, koja može imati 16-32 blastomere. Ova formacija predstavlja kompaktnu sferičnu višeslojnu tvorevinu u kojoj nema nikakvih međuprostora među blastomerama ili pukotina, duplji. Daljim diobama blastomera ćelije centralnog dijela morule se razmiču prema periferiji embriona i dolazi do formiranja centralne duplje ispunjene tečnošću (blastocel) ograničene slojevima blastomera (blastoderm).

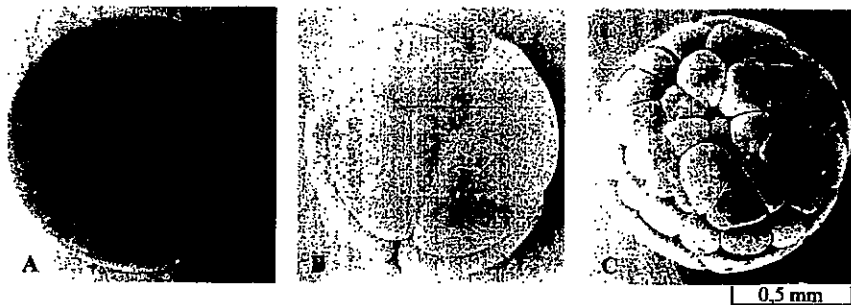
Embrionalni stadijum, također, u obliku lopte je blastula. Sastoji se iz centralne duplje ispunjene tečnošću (blastocel) koja se progresivno povećava i površinskog sloja blastomera (blastoderm). Blastula je najčešće morfološki polarizovana, na jednom polu smještene su sitne pljosnate blastomere-animální pol, a na drugom krupne blastomere snabdjevene vitelusom (vegetativni pol). Prema izgledu i načinu formiranja može se razlikovati više vrsta blastula: amfblastula sastavljena od mikromera na animalnom i makromera na vegetativnom polu. Blastocel je discentričan, pomjeren prema animalnom polu; celoblastula ima blastoderm + povećani blastocel; disceloblastula je u obliku diska koji leži na vitelusu od koga je

odvojen malom pukotinom blastocelom, smještenom ispod embrionalnog diska; periblastula javlja se kod organizama koje karakteriše superficijelan tip segmentacije, blastocel ispunjen vitelusom; plakula-dvije priljuljene ploče ćelija sa reduciranim blastocelom i sferoblastula kod koje blastocel nije izražen. U embrionalnim stadijumima u kojima je izražen blastocel vrši se intezivno pokretanje ćelijskih masa i njihovo transformisanje što dovodi do formiranja epiblasta i hipoblasta, a od njih se formiraju endoderm, mezoderm i ektoderm.



Slika 10.2 Rani embrionalni stadijumi (A) Zigot. (B-D) Rani stadijumi u procesu brazdanja-kulminiraju blastulom. (E) Longitudinalni presjek kroz blastulu pokazuje blastocel. (F-G) Longitudinalni presjek kroz ranu i kasnu gastrulu. Na vegetativnom polu gastrule su invaginirane krupnije ćelije (Barnes, 1992.)

Ćelije ektoderma ostaju uvijek na površini dok ćelije endoderma imaju sposobnost savijanja i nabiranja prema unutrašnjosti. Paralelno sa tim odvija se proces hemijske diferencijacije klicinih listova javlja se afinitet i odbojnost između različitih klicinih listova. Prema tom kretanju ćelijskih masa razlikuje se više tipova gastrulacije. Gastrula se formira putem invaginacije kada se blastoderm vegetativnog pola uvlači (invaginiše) u blastocel, usljed čega nastupa redukcija ove duplje. Obrazuje se nova duplja gastrocel ili arhenterom. Nastaje dvoslojna peharasta gastrula sa spoljašnjim slojem od ektoderma i unutrašnjim koji se invaginiše od endoderma tj. od epiblasta i hipoblasta. Otvor preko koga gastrocel komunicira sa spoljašnjom sredinom naziva se blastoporus. Prstenastog je oblika i sastoji se od četiri zone: dorzalne, ventralne i dvije lateralne usne blastoporusa koje će u daljem razviću formirati usni otvor (kod amfioksusa). *Imigraciona gastrula* je ona kod koje primarni klicini listovi nastaju migracijom pojedinih ćelija blastoderma u blastocel. Diobom ovih ćelija nastaje endoderm, dok se periferni dio diferencira u ektoderm. *Epibolistička gastrula* nastaje putem epibolije. Formira se tako što dolazi do intezivnih dioba mikromera na animalnom polu i njihovog postepenog prerastanja preko makromera vegetativnog pola. Vegetativni pol pasivno ulazi u unutrašnjost embriona obrazujući endoderm, dok se od mikromera animalnog pola na površini embriona formira ektoderm kod nekih organizama. *Delamiciona gastrula* nastaje formiranjem primarnih ćelija blastoderma tangencionalnom diobom kada se obrazuje dvoslojna gastrula sastavljena od površinskog sloja ektoderma i unutrašnjeg endoderma što predstavlja prvu fazu gastrulacije kojom se završava embrionalni razvoj svih diploblastula nižih organizama. U drugoj fazi formira se mezoderm koji se postavlja između primarnih klicinih listova (ektoderma i endoderma). Razlikuju se dva osnovna načina postanka mezoderma. Enterocelni mezoderm nastaje evaginacijom zida primarnog crijeva u blastocelu. Ove evaginacije u početku komuniciraju sa gastrocelom, kasnije se odvajaju, zatvaraju i obrazuju šuplje miješkove. Duplja mezodermalnih miješkova predstavlja začetak sekundarne tjelesne duplje (celom). Teloblastični mezoderm nastaje migracijom izvjesnih ćelija sa granične zone primarnih klicinih listova na zadnjem kraju tijela embriona u blastocel gdje se intezivno dijele i obrazuju sloj blastomera između ektoderma i endoderma (formira se začetak celoma i horda). Slika 10.3 prikazuje neke rane razvojne stadijume jajeta žabe.



Slika 10.3 Skening mikrofotografija jajeta žabe i neki rani razvojni stadijumi (A) Nefertilizirano jaje. (B) 8-ćelijski stadijum. (C) 32-64 ćelijski stadijum. Sve tri mikrofotografije su povećane 46 puta (Keeton, 1986.)

Brazdanje-segmentacija (tipovi brazdanja)

Jajne ćelije se međusobno razlikuju po količini vitelusa i njegovom rasporedu u citoplazmi. Prema količini vitelusa razlikuje se više tipova jajnih ćelija: oligocentrični tip sadrži malu količinu vitelusa, mezolecitni sadrži umjerenu količinu vitelusa, i polilecitni tip sadrži veću količinu vitelusa.

Prema rasporedu vitelusa u citoplazmi razlikuje se, također, više tipova jajnih ćelija: homolecitni tip sadrži manju količinu vitelusa, ravnomjerno raspoređenog u citoplazmi; telocitni tip sadrži vitelus na vegetativnom polu ćelije i centrolecitni tip jajnih ćelija ima vitelus u centru ćelije.

Brazdanje podrazumijeva niz intezivnih mitotičkih dioba kojima se jednoćelijski zigot razvija u višećelijski embrion sastavljen od embrionalnih ćelija blastomera. Prva segmentaciona brazda pruža se duž meridijana zigota (od animalnog ka vegetativnom polu) formirajući dvije blastomere, a druga se pruža duž meridijana novonastalih blastomera. Treća ekvatorijalna brazda se pruža duž ekvatora četiri blastomere. Poslije stadija od osam blastomera, blastomere se dijele naizmjenično meridionalnim i ekvatorijalnim brazdama. U toku segmentacije dolazi do promjene zapreminskog odnosa između jedra i citoplazme (veličina jedra ostaje skoro ista kao i na početku brazdanja, dolazi do povećanja količine nukleoplazme). Tip brazdanja zavisi od količine vitelusa koji se nalazi u jajnoj ćeliji, zatim od aktivacije jedra i citoplazme (tzv. aktivni dio). U osnovi mogu se razlikovati dva tipa brazdanja: totalno brazdanje-cjelokupna jajna ćelija ulazi u proces segmentacije; parcijalno brazdanje, brazda se samo jedan dio ćelije (najčešće se to odnosi na jedro).

Totalno (potpuno) brazdanje karakteristično je za holoblastični tip jajnih ćelija koje su siromašne vitelusom, dijeli se cjelokupna jajna ćelija. Nastaju blastomere jednake po veličini (izomere). Totalno brazdanje može biti totalno ekvalno kada nastaju blastomere jednake po veličini-izomere (oligolecitna jaja amfioksusa, sisara, bodljokožaca; homeolecitna jaja morskog ježa, nematoda) i totalno inekvalno u kojem slučaju se treća ekvatorijalna brazda pruža iznad nivoa ekvatora, tako da se na animalnom polu stvaraju mikromere, a na vegetativnom polu makromere (kod amfiba).

Parcijalno brazdanje dovodi do brazdanja samo dijela jajne ćelije gdje se nalazi aktivna citoplazma sa jedrom. Dijeli se na parcijalno diskoidalno brazdanje kada se brazda samo citoplazma sa jedrom na animalnom polu u obliku diska, dok se vitelus na vegetativnom polu ne brazda i parcijalno superficijalno brazdanje počinje u centru gdje je smještena aktivna citoplazma sa jedrom. Podijeljena jedra migriraju prema periferiji i obavijaju se perifernom citoplazmom koja počinje da se dijeli srazmjerno broju jedara.

Neurulacija

Na proces gastrulacije nastavlja se neurulacija. Procesom neurulacije nastaje neuralna cijev, osnova živčanog sistema. Neurulaciju inducira horda dorzalis. Na početku procesa neurulacije, ćelije ektoderma koje su bile približno jednake znatno se izdužuju. Na taj način središnji dio ektoderma postaje deblji i gradi tzv. neuralnu ploču koja svojim rubovima prelazi u epidermu ili epitel kože. Dalje, ćelije neuralne ploče se sužavaju prema površini, a prema bazalnoj strani proširuju (sl. 10.4). Na kraju se cijela neuralna ploča deformiše, preko neuralnog žlijeba prelazi u zatvorenu neuralnu cijev. U ovom stadijumu zametak se naziva neurula. Mjesto između visokih ćelija neuralnog žlijeba i niskih ćelija epiderma naziva se greben. U tom području umnožavaju se ektodermalne ćelije i migriraju u pravcu glave gdje grade primitivno vezivno tkivo, zatim u područje trupa gdje se diferenciraju u nervne ćelije ganglija, ćelije kore nadbubrežne žlijezde i u pigmentne ćelije (melanocite), satelitske ćelije i druge. Dakle, od ektoderma se formira epidermis, mliječne žlijezde, ameloblasti, neuroektoderm (mozak, medula i ćelije neuralnog grebena), a od ćelija neuralnog grebena: ganglije (spinalne i vegetativne), satelitske ćelije osjetnih ganglija. Zatim, švanove ćelije perifernih nerava, adrenalna medula, melanocite, kornea, dio mezenhima, glave, kosti glave, srčani trakt.

Dvojput
X



Slika 10.4 Neurulacija (A) Progresivni razvoj mezoderma i neuralne tube. (B) počinje invaginacija neuralne ploče. (C) Evaginacijom unutrašnjeg zida i invaginacijom ektoderma počinje formiranje kičmenice. (D) U kasnijem embrionu i spina i mezoderm dobijaju definitivnu formu.

Organogeneza

Nakon perioda kada se odvija intezivna dioba blastomera, njihovo formiranje i povećanje broja nastupa drugi period organogeneze. Ovaj period počinje formiranjem epiblasta i hipoblasta, a od njih do formiranja endoderma, ektoderma i mezoderma. Klicini listovi predstavljaju osnove iz kojih će se dalje u toku razvika razviti tjelesni organi. Proces organogeneze se sastoji u osnovi od uvrtanja (invaginacija) epitelnih slojeva ili od višestrukog uzastopnog pupanja i

granjanja epitelnih ćelija. Te morfološke promjene temelje se i na promjeni broja, rasporeda i funkcionalnog stanja mikrotubula i mikrofilamenata u ćelijama. Mitotičke diobe, također, predstavljaju sastavni dio ovog procesa kojim se osigurava broj ćelija koje se premještaju iz prvobitnog položaja.

Od endoderma se formira nekoliko struktura: epitel crijeva, jetra, pankras, epitel urinarnog trakta, epitel respiratornog sistema, tireoidna žlijezda, paratireoidea, timus, epitelijum prednjeg uha. Srednje crijevo je drugog porijekla i povezivanjem sa prednjim i zadnjim crijevom uspostavlja se crijeva cijev cijelom dužinom tijela. Mezoderm produkuje mnogobrojne unutrašnje organe. Mezodermalnog porijekla je skeletna miškulatura, mišići tjelesnog zida, srce, sve vrste vezivnog tkiva uključujući hrskavičavo i koštano tkivo, koštanu srž, slezenu, limfne žlijezde, spolne žlijezde, kora nadbubrežne žlijezde itd.

REGULACIJA PROGRAMIRANE ĆELIJSKE SMRTI

Apoptoza

Regulacija programirane ćelijske smrti je rezultat integracije aktivnosti različitih signalnih puteva, neki aktiviraju indukciju ćelijske smrti a drugi unapređuju ćelijsko preživljavanje.

Za proces organogeneze karakterističan je i proces propadanja i odumiranja ćelija. Naprimjer, u sisara u ranom embrionalnom razvoju bez obzira na genetski spol određen prilikom oplodnje, razvijaju se osnove i za muške i za ženske organe. Kasnije u zametku muškog spola propadaju osnove za ženske spolne organe i obrnuto. Propadanje ćelija ili apoptoza je programirana smrt pod genetskom kontrolom. U toku procesa apoptoze ćelija pod dejstvom spoljašnjih ili unutrašnjih faktora pokreće kaskadu biohemijskih događaja kojima sistematski oštećuje svoju strukturu i funkciju, a da ne utiče negativno na normalne ćelije, odnosno tkiva. Apoptoza je programirana fiziološka degeneracija ćelija-proces znatno konzerviran u toku evolucije i postoji u svim multicelularnim organizmima. Ima poseban značaj za održavanje balansa između ćelija koje su pod normalnim uslovima prekobrojne. Naime, u odraslih programirana ćelijska smrt je odgovorna za ravnotežu ćelijske proliferacije i za održavanje konstantnog ćelijskog broja. Naprimjer, oko 5x10¹¹ ćelija krvi se eliminiše pri programiranoj ćelijskoj smrti u čovjeka. Programirana ćelijska smrt obezbjeđuje odbrambene mehanizme pri kojima oštećene ćelije i potencijalno opasne ćelije mogu biti eliminisane za dobrobit organizma kao cjeline. Virusne infekcije često induciraju programiranu smrt ćelija, što predstavlja zaštitu od produkcije novih virusnih partikula i njihovog spredovanja kroz organizam. Drugi tip povreda koji može, također, inducirati programiranu ćelijsku smrt su promjene DNA. U slučaju DNA promjena programirana ćelijska smrt može eliminisati štetne mutacije obuhvatajući i ćelije sa mutacijama koje mogu dovesti do razvoja raka.

U toku razvoja programirana ćelijska smrt ima važnu ulogu u eliminaciji neželjenih ćelija različitih tkiva. Karakterističan primjer programirane ćelijske smrti je u razvoju nervnog sistema mamalija. Neuron se proizvodi u suvišku i oko 50% od razvijenih neurona se eliminiše pri programiranoj ćelijskoj smrti. Oni koji prežive selekciju imaju korektnu vezu sa ciljanim ćelijama čiji su sekreti faktori rasta signal ćelijskog opstanka i preživljavanja neurona programirane ćelijske smrti.

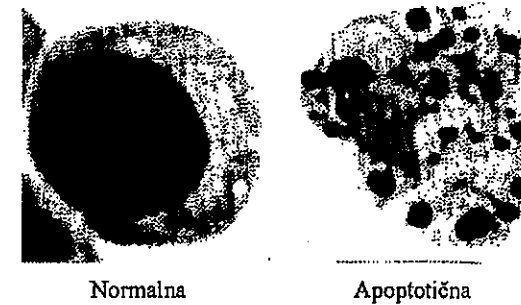
Opstanak mnogih drugih tipova ćelija u životinja je slično ovisan o pripadajućem faktoru rasta ili kontaktu sa susjednim ćelijama ili ekstracelularnim matriksom, tako programirana ćelijska smrt igra važnu ulogu u regulaciji povezivanja između ćelija u tkivima.

Funkcionalna, programirana degeneracija se odvija za vrijeme migracije, diferencijacije i organogeneze svih vrsta ćelija, odnosno tkiva i organa. Označava se i kao aktivna ili "ćelijska smrt". U apoptozi ćelija podliježe morfološkim promjenama (sl. 10.5) koje uključuju promjene u jedru, citoplazmi i ćelijskoj membrani i to: gubitak kontakta sa okolinom; kidaju se međućelijski spojevi, nabira se plazma membrana zbog gubitka vode, povećava se gustina citoplazme, ćelija se smanjuje. Kondezuje se hromatin jedra i koncentrira uz unutrašnju starnu jedrovog omotača. Dolazi do fragmentacije jedra i ispućenja ćelijske membrane, a ćelija zadržava integritet sve do smrti kada biva fagocitovana od strane makrofaga susjednih ćelija. Apoptoza se javlja u ćelijskim populacijama koje se stalno obnavljaju da bi se održala ista veličina populacije (eksfobijacija epitela, selektivno gubljenje ćelija putem apoptoze, morfogeneza fetusa sisara, insekata i amfiba).

Mehanizam apoptoze

Postoje dva centralna puta koja vode ćeliju u apoptozu: pozitivna indukcija ligamentima koji se vezuju za receptore smrti na ćelijskoj membrani i negativna indukcija koja se javlja kao posljedica gubitka supresornih aktivnosti, odnosno odsustva anti-apostatičkih faktora. Oba puta vode aktivaciji cistein proteaze interleucina (ICE), što ima za posljedicu kaskadu biohemijskih reakcija, morfoloških promjena i konačnu smrt ćelije. Za morfološke promjene koje se dešavaju u ćeliji tokom apoptoze odgovorne su tri grupe enzima: endonukleaze (enzimi odgovorni za promjene u jedru), proteaze (odgovorni za oštećenja citoskeleta, što dovodi do nabiranja ćelijske membrane i promjene oblika ćelije), transglutaminaze (odgovorne za sintezu citoplazmatskih proteina što dovodi do zgušnjavanja citoplazme i smanjenja volumena ćelije). Na osnovu najnovijih saznanja iz područja sekvenciranja gena, smatra se da je mehanizam apoptoze regulisan genima koji pripadaju grupi proto-onkogeni (čija aktivnost uzrokuje nekontrolisani rast ćelije). Članovi familije za transkripcionu regulaciju Bcl-2 i

tumor supresorni geni su direktno vezani za indukciju apoptoze. Pored pomenutih gena u mehanizmu apoptoze uključeni su i drugi proteini, posebno receptori plazma membrane ("receptori smrti"), te mitohondrije (ekspresija anti-apostatičkih faktora Bcl-2 proteina na njihovoj membrani)



Slika 10.5 Apoptoza Svjetlosna mikrografija humane normalne ćelije i ćelije u apoptozi u toku leukemije. Mikrografija ilustrira kondenzaciju hromatina i fragmentaciju nukleusa u toku apoptoze (Cooper, G.M.:2000.)

EMBRIONALNA INDUKCIJA

Enbrionalna indukcija označava vezu između pojedinih dijelova embriona u procesu diferencijacije. Otkrio ju je njemački embriolog Spemann proučavajući razviće oka. Naime, u procesu embriogeneze sva tkiva i organi nastaju kao rezultat dijelovanja između embrionalnih ćelija, a koja se kasnije raspoređuju u tačno određeni prostor. Znači, kada dva tkiva različitog embrionalnog porijekla (npr. tkivo ektoderma i mesoderma) dođu u međusobni dodir. Tkivo koje se nakon indukcije diferencira u određenom pravcu naziva se reaktant, a tkivo koje indukuje diferencijaciju u određenom pravcu naziva se induktor (induktor I, II, III, IV i V reda). Postoji više vrsta međućelijskih indukcija: među istovrsnim ćelijama, među raznovrsnim ćelijama i među ćelijama i međućelijskim materijama. Sposobnost indukcije među ćelijama iste vrste vjerovatno je zasnovana na specifičnom afinitetu ili privlačnosti koja postoji među istovrsnim ćelijama. Npr. ako se embrionalne ćelije u eksperimentu odvoje, a zatim pomiješaju, istovrsne ćelije će se pronalaziti, skupljati se u skupine koje pripadaju istom embrionalnom tkivu. Pretpostavlja se da je fenomen prepoznavanja među embrionalnim ćelijama povezan s osobinama ćelijske membrane. Naime, utvrđeno je da na površini ćelije postoje glikoproteini koji pokazuju visok stepen specifičnog afiniteta prema glikoproteinima na površini istih ćelija, a slab afinitet prema površini ćelija druge vrste.

U daljem procesu embriogeneze međućelijska indukcija se odvija između različitih slojeva ćelija ili klicinih listova: ektoderma mezoderma i endoderma.

Indukcija između raznovrsnih ćelija podrazumijeva pojavu uticaja jedne grupe ćelija na drugu grupu ćelija izazivajući diferencijaciju njezinih ćelija u određena tkiva. Prva indukcija u procesu embriogeneze odvija se u predjelu nervne ploče pod djelovanjem hordomezodermalnog tkiva (induktor I reda) koje posjeduje sposobnost formiranja cijelog organizma (organizacioni centar prvog reda). Dokazano je da se vrlo različita tkiva (jetre, bubrega, koštana srž) ponašaju kao induktori i indukuju stvaranje različitih tvorevina (tkivo jetre indukuje formiranje mozga dok koštana srž indukuje formiranje horde i elemente krvi). Proces indukcije je vremenski ograničen (jedno tkivo može da indukuje diferencijaciju susjednog tkiva u tačno određenom vremenu embriogeneze).

Npr. ako se pod ektoderm mlade gastrule presadi očni pehar starijeg embriona, ovaj predio ektoderma reaguje stvaranjem očnog sočiva, dok na stadiju kasne gastrule samo onaj dio koji u normalnoj embriogenezi formira sočivo sposoban je odgovoriti na indukciju. Mehanizam indukcije nije ni do danas u potpunosti razjašnjen. Pretpostavlja se da su u normalnoj embriogenezi induktori uglavnom molekuli iRNA, dok se u eksperimentalnim uslovima kao induktorima koristi različitim steroidima, kancerogenima i organskim kiselinama. Embriionalna indukcija se može podijeliti na: primarnu indukciju (indukcija osnovnog plana grade) koja nastupa nakon gastrulacije i indukuje neurulaciju (gastrula se pretvara u neurulu), tako što se mezoderm (primarni induktor) uvlači kroz dorzalnu usnu blastoporusa (primarni organizator embriona). Interesantan eksperiment izvršen je presađivanjem dorzalne usne blastoporusa pod epidermis ventralne strane pod čijim uticajem je došlo do stvaranja nervne cijevi u ventralnom dijelu embriona. Slični rezultati se dobiju ako se dio gornje usne blastoporusa gastrule presadi u blastocel drugog embriona. Na primarnu indukciju nastavlja se sekundarna indukcija i obuhvata stvaranje pojedinih dijelova mozga i kičmenice (indukcija između dva prvobitna embriionalna tkiva epitela i mezenhima-mezodermalnog porijekla). Sukcesivna indukcija je uočena u procesu formiranja oka. Ako se ukloni očno sočivo, ektoderm se neće diferencirati u rožnjaču, a ako se ukloni očni pehar, neće doći do formiranja očnog sočiva ni rožnjače. Ako se prekine lanac indukcije, istovremeno se prekida i diferencijacija određenog organa.

Naveli smo da postoje indukcije među ćelijama i međućelijskim tvarima. Međućelijske tvari uglavnom luče ćelije mezenhima i ove se tvari sintetišu najčešće u embriogenezi. Tako se kolagen sintetiše već za vrijeme brazdanja. U procesu diferencijacije jedna ista embriionalna ćelija može sintetisati različite tipove kolagena, što ukazuje na njihovu različitu funkciju u procesu razvoja. Kolagen zajedno sa proteoglikanima predstavlja supstrat po kojem embriionalne ćelije migriraju s jednog mjesta zametka na drugo. Mehanizam ove vrste indukcija se vjerovatno zasniva na vezivanju međućelijskih tvari za receptorska mjesta (neki protein) na površini ćelija, što se sve povezuje sa citoskeletom ćelije u jednu funkcionalnu cjelinu.

NUKLEOPLAZMATSKE REAKCIJE U PROCESU EMBRIOGENEZE

Embriionalni razvoj počinje od jedne ćelije koja se dijeli više puta. Do izvjesnog stadija sve su ćelije vrlo slične. Zigot i blastomere koje od njega nataju dijele se mitotičkom diobom. Suština ove diobe je ravnomjerna raspodjela genetskog materijala od majke ćelije na kćeri ćelije. U izvjesnom stadiju pojavljuju se ćelije različite po obliku i drugim karakteristikama. Dolazi do diferencijacije ćelija. Različite ćelije različito se ponašaju. U tom periodu mnogi geni postaju aktivni ili se inaktiviraju što zavisi od perioda embriogeneze. Zapravo se aktiviraju različite grupe gena koje kontrolišu sintezu specifičnih proteina za taj period razvoja.

Osnovne komponente oplodene jajne ćelije su jedro i citoplazma. Odnos jedra i citoplazme nije isti kao i u drugim ćelijama. U jajnoj ćeliji odnos je: 1:550. Kako procesi brazdanja postaju sve manji i manji, to se u procesu gastrulacije omjer svodi na normalan 1:6. To znači da se u jajnoj ćeliji nalazi znatno više citoplazme nego u drugim ćelijama. I upravo za određene životinjske vrste je vrlo važna količina citoplazme u obrazovanju embriona. Ulogu jedra i citoplazme u procesu diferencijacije embriionalnih ćelija pokušalo se objasniti nizom eksperimenata na jednoćelijskim i na višćelijskim organizmima. Jedan od prvih eksperimenata u tom cilju izveden je sa oplodnim jajnim ćelijama amfiba. Naime, iz oplodene jajne ćelije izvađeno je jedro, nakon čega je u plazmu ćelije uneseno jedro od blastule ili gastrule. Jajna ćelija se normalno brazdala i razvijala. Naprimjer, u acetabularije pokušalo se, također, dokazati interakcija jezgre i citoplazme u toku diferencijacije i morfogeneze. Dokazano je da je proces formiranja klobuka (kape) ove vrste pod kontrolom jedra. Ovaj proces je specifičan za vrstu i pripisuje se morfogenetskim tvarima koje se nalaze u citoplazmi. Da se u citoplazmi zaista nalaze molekule koje djeluju na aktivnost jedra pokazuje nam sljedeći eksperiment: djelovanjem citohalazina B jedro je izolovano iz jedne ćelije i inplantirano u citoplazmu druge ćelije. Nakon čega je bilo moguće proučavati uticaj citoplazme na aktivnost jedra i obrnuto. Interakcija jedra i citoplazme proučavana je i u oocitama vodozemaca. Naime, oocita sintetizira velike količine RNA. U njenoj citoplazmi aktiviraju se jezgre somatskih ćelija koje su stranog porijekla. Naprimjer, kada se u oocitu injicira oko 200 jedara HeLa ćelija ljudskog porijekla, ćelije preživljavaju u citoplazmi i drastično se mijenjaju. Ili, dokazano je da se somatske ćelije u kulturi pod uticajem umrtvljenog virusa Sendai stapaju-fuzionišu. Nakon toga nastaje heterokarion (ćelija sa više jedara). Na ovaj način mogle su se fuzionisati ćelije različitih vrsta na različitim stupnjevima diferencijacije, npr. čovjeka i pticeili čovjeka i drugih sisara. U takvim ćelijama moguće je neaktivne ćelije ponovo aktivirati za sintezu RNA i DNA, npr. ako su jedra fuzionisana sa ćelijama koje su aktivne u sintezi ovih molekula. Može se zaključiti da u citoplazmi jajne ćelije postoje materije koje mogu aktivirati jedro, tj. aktivirati gene koji do tog momenta nisu bili aktivni.

Citoplazma jajne ćelije se po svojoj strukturi razlikuje kod mnogih organizama. U nekim jajnim ćelijama se neposredno nakon oplodnje mogu uočiti različita područja citoplazme. Ta se područja razlikuju po kondenzaciji citoplazme, po količini RNA, rasporedu organela i biohemijskim procesima. U nekim jajnim ćelijama RNA je prisutna u cijeloj citoplazmi ali joj koncentracija opada od pola do pola itd. U određenim područjima citoplazme kod nekih organizama lokalizovani su faktori odgovorni za morfogenezi i diferencijaciju pojedinih dijelova zametka. To su determinatori razvitka. Citoplazmatski determinatori kao i svi ostali sastojci jajeta sintetiziraju se još za vrijeme oogeneze u jajniku majke, što je rezultat aktivnosti majčinih gena. U jajnim ćelijama sisara nije dokazana prisutnost determinatora razvića.

U ranim fazama embriogeneze kod sisara značajni su momenti proliferacije tj. povećanja broja ćelija brazdanjem i diferencijacija blastomera istog genotipa u dvije fenotipski različite grupe ćelija, to su trofoblasti (buduća placenta) na površini i embrioblasi (budući zametak) u unutrašnjosti blastociste. Sve do 8-ćelijskog stadijuma brazdanja svaka blastomera se može razviti u cijeli zametak. Kod drugih organizama već prve dvije blastomere mogu da se razlikuju po svojim razvojnim sposobnostima. Može se reći da stadijum od 8 blastomera predstavlja prekretnicu u najranijem razvitku sisara (sl. 10.3). Tada započinje proces kompakcije zametka: okrugle blastomere pretvaraju se u ćelije slične epitelnim. Među ćelijama uspostavljaju se međućelijske interakcije (gap-junction). Kako se polaznost kod sisara javlja tek u stadijumu od 8 blastomera, to od tog stadijuma pa nadalje preovlađuju međućelijske interakcije, a rezultat interakcija je diferencijacija blastomera u površinski sloj trofoblasta i unutrašnji sloj embrioblasta.

U zaključku, nukleocitoplazmatske reakcije obuhvataju eksport sekvencijskih informacija iz jedra u toku genske ekspresije i import iz citoplazme preko niza molekularnih signala. Važnu ulogu u odvijanju procesa nukleocitoplazmatske reakcije igraju citosol-receptori proteini koji imaju sposobnost da za sebe selektivno vezuju aktivne steroidne hormone (samo one ćelije koje u citoplazmi imaju specifične receptorne proteine mogu "shvatiti" poruku receptornog signala i reagovati na nju). Novostvoreni kompleks steroidni hormon-citosol-receptorni protein ulazi u jezgru uslovljava prepisivanje novih informacija sa dotad neaktivnih gena. Značajnu ulogu u ovom procesu imaju enzimi fosfoproteinske kinaze i nuklearne kinaze čijom aktivnošću se odvija proces fosforilacije kao ključni preduslov za aktivaciju gena.

MOLEKULARNE AKTIVNOSTI U EMBRIONALNOM RAZVOJU

Aktivnost jedra ovocita

Prethodno je napomenuto da se citoplazma animalnog pola kvalitativno razlikuje od citoplazme vegetativnog pola. I upravo je kvalitativno različita citoplazma prvi znak za početak različite biosinteze u različitim ćelijama. U procesu sazrijevanja jajne ćelije izražen je proces rasta koji se odvija prije početka prve diobe sazrijevanja.

U citoplazmi ovocita nakupljaju se hranljive materije, prvenstveno vitelus koji sadrži fosfoproteine, DNA, RNA i enzime. Ovocit sintetiše i sopstvene nukleinske kiseline kojima se koristi kasnije u toku oplodjenja i brazdanja. U profazi prve diobe ovocit sintetiše dovoljno ribosoma i razne RNA, kao i iRNA za rano razviće embriona.

U stadiju pahitena ovocit u jedru ima dvije vrste DNA: rastresitu DNA i gušću DNA. Gušća DNA sadrži parne sekvencije nukleotida za ribosomalne prekursore. Ovih gena je mnogo više nego u somatskim ćelijama. Povećanje broja gena ne znači i povećanje broja hromosoma. Povećanje broja gena tj. amplifikacija gena četkastih hromosoma u diplotenu ovocite omogućava brzu sintezu velike količine ribosomalne RNA. Broj sintetisanih RNA na petljama lambruš hromosoma je raznovrstan: iRNA, rRNA, tRNA, a upotrebljava se tek kasnije u procesu embriogeneze.

Procesi biosinteze u zigotu

Odmah nakon ulaska spermatozoida u jajnu ćeliju dolazi do sazrijevanja jajne ćelije. Sazrijevanjem jajeta mijenja se aktivnost jedra: smanjuje se transkripcija RNA, a naglo se pojačava sinteza DNA. Povećava se količina genetskog materijala, haploidni broj prelazi u diploidni broj hromosoma. Ubrzo se determiniše spol jedinke, a zatim se uspostavljaju gradijenti koji određuju prednji i zadnji dio embriona. Uspostavlja se bilateralna simetrija, odvaja se fertilizaciona opna. Oplodnjem oslobadaju se odgovarajući enzimi (proteaze) koji razgrađuju proteinski omotač molekula iRNA koji ih je činio inaktivnim. Oslobodena iRNA vezuje se za ribosome u polisome i time počinje sinteza strukturalnih i drugih proteina, nakon čega počinje proces brazdanja. Počinje sinteza DNA (raste geometrijskom progresijom) od početka brazdanja zigota, povećava se i količina rRNA koja je, inače, najviše zastupljena od svih vrsta RNA. Sinteza proteina se povećava i do 20-30 puta na početku brazdanja da bi se kasnije smanjila na konstantan nivo u toku brazdanja. Diobe su veoma brze. Svaka nova blastula ima istu količinu DNA, kao i zigot. Tako embrion od 50 blastomera ima 50 puta više DNA u odnosu na zigot. Proces gastrulacije je

različit kod različitih vrsta. Broj blastomera je, također, različit, ali su morfogenetski procesi slični. U procesu gastrulacije predomina genom embriona. Neposredno pred gastrulaciju transkripcija različitih RNA se povećava, sintetise se nova iRNA te prema tome i novi proteini. Kod organizama kod koji nije bilo nukleolusa u blastomerama sada se pojavljuje i time počinje transkripcija rRNA. U fazi neurulacije dominiraju procesi indukcije. U induktivnim tkivima povećava se količina RNA. Pretpostavlja se da upravo ova RNA čini induktivnu supstancu. Transkribuje se nova iRNA za nove proteine karakteristične za taj tip ćelije. Npr. očni pehar je induktor za biosintezu kristalina u ćelijama ektoderma, budućeg očnog sočiva. U fazi morfogeneze sve više se diferenciraju embrionalne ćelije. Sve više se ćelije međusobno razlikuju iako imaju isti genom naslijeđen od zigota. Geni embriona se postupno aktiviraju i aktivnost gena je drugačija u različitim embrionalnim ćelijama. Ovo je period kada dolaze do izražaja i mutirani geni.

1 Proliferacija, 3 diferencijacija i 2 determinacija ćelija

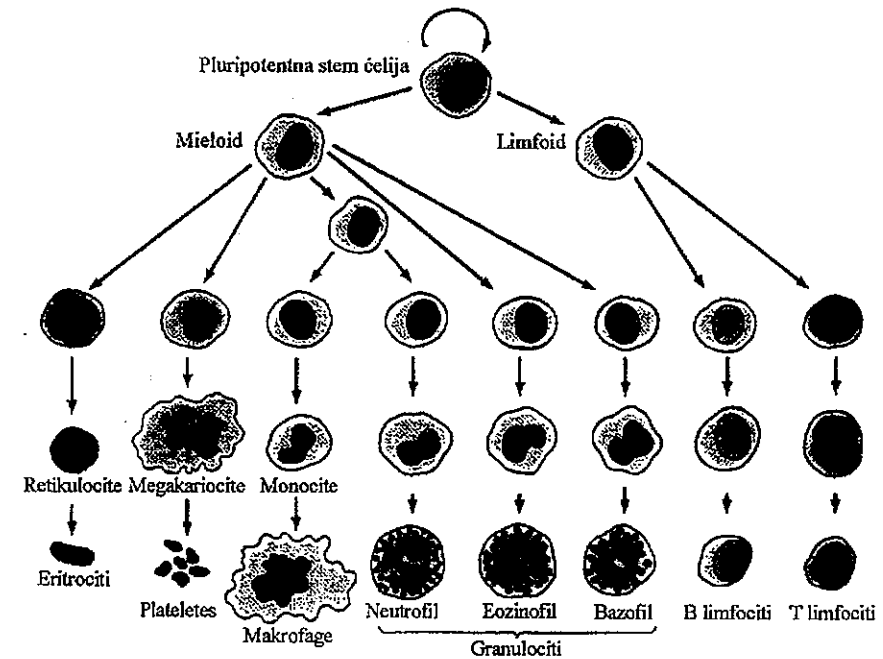
Rani razvoj karakteriše brza proliferacija embrionalnih ćelija koje se potom diferenciraju i proizvode mnoge specifične tipove ćelija za tkiva i organe višecelijskih organizama. Malo tipova ćelija nakon što se diferencira ponovo se ne podijeli, ali najviše ćelija nastavlja proliferaciju kao potrebu za nadoknadu ćelija koje su nestale kao rezultat ozljeda ili ćelijske smrti. Ćelijska proliferacija prije svega balansira sa ćelijskom smrću regulišući konstantan broj ćelija u zrelih tkivima i organima.

Ćelije odraslih organizama mogu se grupisati u tri opšte kategorije u odnosu na proliferaciju ćelija. Neki tipovi diferenciranih ćelija npr. srčane, mišićne ćelije u ljudi dugo su sposobne da se dijele. Ove ćelije se proizvode u toku embrionalnog razvoja, diferenciraju se i takve se zadržavaju u toku života organizma. Ako se smanji njihov broj zbog oštećenja ili smrti ćelije, ponovno se vrši njihov replasman.

U drugom slučaju, najviše ćelija odraslih organizama ulazi u G stadijum ćelijskog ciklusa, proliferacija se ponavlja i nastavlja neprekidno, jer je potrebno obnavljati izgubljene ćelije. Ćelije ovog tipa induciraju kožu, fibroblaste, glatke mišićne ćelije, endotelne ćelije, ćelije krvi, epitelne ćelije unutrašnjih organa (jetre, pankrassa, prostate itd.).

Treća grupa ćelija se obnavlja preko proliferacije što se odnosi na ćelije krvi, epitelne ćelije kože i epitelne ćelije digestivnog trakta koje imaju kratak životni vijek i moraju neprekidno da se obnavljaju u odraslom organizmu. U ovom slučaju se radi o manje diferenciranim ćelijama i one ne mogu sebe proliferirati ali mogu se izmjeniti preko proliferacije. Zapravo obnavljaju se preko proliferacije ćelija nazvanih stem ćelije. Stem ćelija proizvode kćer ćeliju koja se

može diferencirati u jednu ili drugu ćeliju ili može ostati kao stem ćelija i time služi kao izvor za produkciju i diferencijaciju ćelija u toku života. Dobar primjer kontinuirane proliferacije stem ćelija je u slučaju diferencijacije krvnih ćelija sa specijaliziranom funkcijom (eritrocita, granulocita, makrofaga, fagocita, limfocita i dr.). Sve ove ćelije imaju ograničen vijek trajanja, postoje vrlo kratko, ali se kontinuirano proizvode od strane jedne pluripotentne stem ćelije (vidi sliku 10.6).



Slika 10.6 Formiranje ćelija krvi Svi različiti tipovi ćelija krvi razvijaju se od pluripotentne stem ćelije. Prekursor za diferencijaciju ćelija prolazi kroz više krugova ćelijske diobe, sve dok ćelije ne sazriju. Ćelijska proliferacija prestaje kada se izdiferenciraju završni stadijumi. (Uslužnošću Morrison, S.J. 1998.)

Poznato je da jajna ćelija posjeduje velike razvojne mogućnosti (potence) s obzirom na to da od nje nastaju raznovrsni oblici ćelija jednog organizma (totipotentnost jajne ćelije). Blastomere u prvim fazama embriogeneze posjeduju, također, relativno široke razvojne mogućnosti (pluripotentnost jajne ćelije). Međutim, u daljem toku embrionalnog razvoja na ćelijskim membranama dolazi do hemijskih promjena (počinje diferenciranje ultrastrukturnih karakteristika i sinteza novih tipova RNA i novih makromolekula proteina), potence embrionalnih ćelija se smanjuju i ograničavaju na samo jedan razvojni pravac (unipotentnost embrionalnih ćelija). Ovo ograničavanje potenci (umjerenost razvoja) u određenom pravcu u toku kojeg ćelije primaju "trajne instrukcije"- signale i gube pluripotentnost naziva

se *determinacija*. U toku ovog procesa dolazi do ireverzibilnih promjena u strukturi ćelija, po kojima se one razlikuju od drugih ćelija i sinteze specifičnih ("luksuznih") proteina. Razlike kojim se odlikuju specifične vrste ćelija nisu odraz razlika u strukturi genoma (svaka nastala embrionalna ćelija sadrži isti genetski materijal) već u razlikama koje su u vezi sa ekspresijom različitih gena istog genoma. Kao rezultat ekspresije različitih skupina gena u ćelijama se sintetišu specifični proteini (npr. u eritrocitima hemoglobin), što ih čini specifičnim za određenu funkcionalnu aktivnost. Postoje brojni eksperimenti koji objašnjavaju proces determinacije ćelija i tkiva. Ako se mladoj gastruli tritona isječe dio ektoderma od kojeg bi se u daljoj embriogenezi formirala nervna cijev i presadi u predio trbušnog epidermisa drugog embriona, zapaženo je da se ektoderm nervne ploče uključuje u epidermis trbušnog zida i formira epidermis. Međutim, ukoliko se dio ventralnog epidermisa jedne tamne vrste tritona presadi u predio nervne ploče svijetle vrste tritona, trbušni epidermis učestvuje u formiranju nervne cijevi. Ovaj ogled pokazuje da u periodu rane gastrulacije ćelije ventralnog epidermisa u predjelu nervne ploče nisu determinisane (Tomson, 1998.)

Na stadiju kasne gastrule ćelije ventralnog epidermisa u predjelu nervne ploče diferenciraju se u ćelije epidermisa, a ćelije nervne ploče u predjelu ventralnog epidermisa diferenciraju se u nervnu cijev, što ukazuje na završetak procesa determinacije.

Tokom formiranja od zigota do definitivnog organizma, zametak prolazi kroz razne oblike i stepene diferencijacije. Hemijska diferencijacija nastupa veoma rano već u samoj jajnoj ćeliji ili u periodu ranog brazdanja. Blastomere stiču nova biohemijska svojstva (razlike u kvalitetu metabolizma), što prethodi formiranju primarnih klicinih listova, ektoderma i endoderma. Hemijska diferencijacija je preduslov kinetike embrionalnih ćelija i morfogenetskih procesa na raznim etapama ovog procesa. Histološka diferencijacija obuhvata promjene oblika i strukture ćelija usljed čega se javlja razlika između pojedinih tipova ćelija (razlika u histološkim osobenostima između ćelija ektoderma i endoderma-oblik i veličina ćelija). Morfološka diferencijacija podrazumijeva uobličavanje i formiranje raznih organa. Moguća je jedino po neposrednom uzajamnom dejstvu raznih organskih začetaka što omogućava pravilno formiranje pojedinih organa i istovremeno skladan razvitak embriona.

Funkcionalna determinacija nastaje kada morfološki izmjenjene ćelije počinju da vrše specifične funkcije (kontrakcija mišićnih ćelija) i obuhvata proces sticanja definitivnih funkcionalnih karakteristika za dati organ (završni oblik diferencijacije).

DIFERENCIJACIJA GENETSKIH AKTIVNOSTI U PROCESU EMBRIOGENEZE

Ulogu gena u procesu embriogeneze i diferencijacije djelimično pokazuju eksperimenti od kojih su već neki navedeni, kao npr. transplantacija nukleusa iz blastule žabe u jaja čiji su nukleusi bili odstranjeni ili inaktivirani. Ovakva jaja su završavala svoj embrionalni razvoj, što je ukazalo na to da su nukleusi blastule neizdiferencirani i jednaki sa nukleusima zigota na početku razvoja. Međutim, kada su uzeti nukleusi ćelija iz embriona sa kasnim razvojnim stadijumima gastrule, embrioni koji su nastali na određenom stadijumu nisu se razvijali i ispoljili su vidljiv nedostatak izvjesnih tipova ćelija. Dalji eksperimenti pokazali su da jedra kasne gastrule nisu jednaka sa jedrima jajeta ili blastule. Teorija o epigenetskom djelovanju gena u procesu embriogeneze, tj. o različitoj genetskoj aktivnosti u različitim fazama embriogeneze temelji se na nizu dokaza, jedan od tih je i pojava "paffova" kod politenih hromosoma *Drosophile*, što rezultira amplifikacijom ribosomalnih gena potrebnih za tu fazu embriogeneze ove vrste. Ovaj fenomen je citološki dokaz represije i depresije gena u različitim fazama embriogeneze. Još jedan važan fenomen je embrionska indukcija, u toku koje jedno tkivo ima determinišući uticaj na diferencijaciju drugog tkiva. Upravo se indukcija zasniva na genskom proizvodu jedne ćelije koji difundujući iz pomenute ćelije indukuje promjene u susjednim ćelijama. U toku razvika organizma jedne vrste stvaraju se razne vrste proteina u različitom broju i količini. Za jednu vrstu sisara, naprimjer, karakteristično je prisustvo hemoglobina u eritrocitima, inzulina u ćelijama pankrassa, dok je drugu vrstu karakteristično prisustvo drugih proteina. U kasnim stadijima razvika efekat gena je mnogostruk i ispoljava se kroz endokrini sistem, proces regulacije rasta itd. Geni koji su, naprimjer, aktivni u stadijumu gastrule, ne moraju biti aktivni u postembrionalnim stadijima, odnosno, tada mogu imati funkciju reosora. Isto tako, geni koji su u embrionalnom stadiju neaktivni, kasnije mogu biti aktivni i usmjeravati određene procese razvoja.

U toku razvika ostvaruje se epigenetsko djelovanje gena. Radi se o regulaciji aktivnosti pojedinih grupa gena, što omogućava da se u određenim ćelijama stvara veća količina jednog tipa proteina u odnosu na druge mada su prisutna oba gena. Epigenetska kontrola (diferencijalna aktivacija gena) označava vremensku (razvojnu) kontrolu ekspresije gena koja se ostvaruje u toku intrauterinog i postnatalnog razvoja. Zasniva se na informacijama koje se nalaze u sve ukupnom hromatinu, a koje specifične RNA polimeraze mogu prepoznati i prepisivati (prepisuju se samo određeni geni, izbori, od sveukupnog genoma). Programi ekspresije pojedinih gena ostvaruju se u odgovoru na međućelijske signale. U osnovi genetski program ekspresije gena obuhvata dva bitna momenta: selektivna ekspresija gena, kontrola u ćeliji na različitim nivoima ćelijskog metabolizma (mehanizam diferencijalne aktivnosti gena) i razvojno-programirana diferencijacija ekspresije gena. Fenomen koordiniranog redosljeda ekspresije gena u fazi diferencijacije, rezultira sintezom

specifičnih proteina "luksuznih proteina" u konačno diferenciranim ćelijama. Dakle, genetski materijal ćelije u toku razvića se mijenja. Ta promjena se ostvaruje na nivou promjene aktivnosti gena i na nivou promjene broja gena.

Promjena aktivnosti gena u toku razvića tj. epigenetsko djelovanje gena je najbolje proučeno na sintezi različitih tipova hemoglobina kod ljudi. Geni za sintezu pojedinih tipova hemoglobina aktivni su ili neaktivni u različitim periodima embrionalnog razvoja. U ranoj fazi embriogeneze prvo se sintetizira epsilon lanac a odmah za njim počinje i sinteza alfa (α) lanca. Alfa lanac se prvo kombinuje sa epsilon lancem čineći HbG₀₂, dok γ lanac produkuje Hb-F (hemoglobin fetusa) glavni tip hemoglobina u toku intrauterinog života. Sinteza beta (β) lanca počinje oko osme nedelje intrauterinog razvoja a poslije 36 nedelje naglo se intenzivira, dok sinteza χ polipeptida počinje naglo da opada, a HbF (hemoglobin fetusa) u odraslih osoba svodi se na minimum - samo u tragovima.

Promjena broja gena može, također, dovesti do promjene aktivnosti gena u različitim fazama razvića. Promjena količine genetskog materijala može da se javi kao posljedica somatičke poliploidije i parcijalne duplikacije. U prvom slučaju ćelije u procesu diferencijacije prestaju da se dijele ali nastavljaju sa sintezom DNA i odvajanjem hromosoma. Somatička poliploidija je obično posljedica endomitoze (dioba hromoneme bez diobe citoplazme), čime se zaustavlja mitozu u ranoj profazi.

REGULACIJA GENETSKIH AKTIVNOSTI U PROCESU EMBRIOGENEZE

Poznato je da je isti genski sastav embrionalnih ćelija. Postavlja se pitanje kako i zašto u različitim embrionalnim ćelijama dolazi do različitih aktivnosti gena. Koji su mehanizmi koji se uključuju u određenom momentu i aktiviraju ove gene koji će determinisati sintezu specifičnog proteina, hormona, vitamina, enzima itd. Izvjesnu grupu proteina sintetiziraju sve vrste ćelija, kao respiratorne enzime i sl., dok druge specifične enzime sintetiziraju samo određene vrste ćelija. Karakteristični su eritrociti sisara u kojima se sintetizira 90% proteina-hemoglobina. Kako u ćelijama nema jedra, hemoglobin se sintetizira zahvaljujući stabilnoj iRNA koja je transkribovana u vrijeme kada je DNA jedra bila aktivna. Znači, diferencirana ćelija je specifična po sintezi specifičnog proteina i po ulozi koju ima u višećelijskom organizmu. Krajnji produkt diferencirane ćelije je tip proteina, a ne količina. Naprimjer, za prenošenje nervnih impulsa sa jedne nervne ćelije na drugu potrebno je veoma mala količina medijatorne supstance, a tu supstancu produkuje samo nervna ćelija, dakle, aktiviraju se različiti geni u različitim tipovima ćelija, transkribuju se specifične iRNA i sintetiziraju se specifični proteini. Pretpostavlja se da se genetska aktivnost u procesu embriogeneze reguliše na nivou transkripcije RNA i na nivou translacije (prenosa) genetske informacije.

Regulacija na nivou transkripcije

Novija istraživanja govore da histoni kao sastavni dio DNA imaju veoma važnu ulogu u regulaciji genetske aktivnosti. Poznato je da ukoliko se DNA oslobodi histona dolazi do povećanja sinteze RNA. Što znači da u inaktiviranim hromosomima histoni inhibiraju RNA sintezu. Oni zapravo inhibiraju aktivnost gena, pa se njihovim odstranjivanjem geni aktiviraju i sinteza RNA se ostvaruje. Druga grupa supstanci za koje se pretpostavlja da imaju ulogu regulacije genetske aktivnosti su hormoni, posebno grupa steroida u koje spadaju: kortizon, estrogen, androgen ili hormonirasta i drugi. Dritten i Davidson su postavili hipotezu o regulaciji genetske aktivnosti u eukariota gdje su uključene repetitivne sekvencije DNA. Prema ovoj hipotezi genom eukariota ima četiri grupe sekvencija DNA. Prvu grupu sekvencija DNA čine geni produktori. Kako se u ćeliji produkuju različiti proteini to se u njoj nalaze i različiti geni produktori. Svi geni produktori su aktivni u isto vrijeme. Kontrola svih gena je uskladena tako da u datom trenutku transkribuju svoje iRNA. U genomu ćelije nalaze se na različitim hromosomima. Uz svaki gen produktor nalazi se dio DNA sekvencija koje predstavljaju receptorno mjesto. Znači, svi produktori imaju skup istih sekvencija koje predstavljaju receptorsko mjesto. Taj skup sekvencija se ponavlja više puta u genomu. Receptorsko mjesto preuzimaju molekule aktivatori. Tek nakon toga receptorsko mjesto se veže za produktor, gen produktor se aktivira i počinje da transkribuje a molekul aktivator može da bude i neka RNA. Molekule aktivatori se transkribuju sa gena *integratora*. Međutim, gen integrator je prvobitno u represiji. Uz njega se nalazi dio DNA koji predstavlja *senzorni* gen. Senzorni gen prepoznaje određeni molekul i time aktivira gen integrator koji se sa transkribovanom RNA na njemu vezuje za receptor uz gen produktor i time aktivira ovaj gen.

Regulacija na nivou translacije

Smatra se da veći značaj u regulaciji genetske aktivnosti u procesu razvoja kod eukariota imaju procesi koji se dešavaju poslije izlaska iRNA iz jedra, tj. na nivou translacije genetske informacije. Brojni eksperimenti su pokazali da ćelije sadrže pored aktivnih polisoma (poliribosoma) u kojima se sintetiziraju proteini i određene forme neaktivnih kompleksa ribosoma i iRNA. Takvi neaktivni polisomi sadrže proteine koji mogu da inhibiraju proces translacije i svoju specifičnu kombinaciju iRNA. Regulacija se ne odvija na jednom nivou procesa već kroz više etapa.

Prva etapa na kojoj djeluje regulatorni mehanizam bi bila na nivou sinteze RNA, po matrici DNA, gdje se vrši transkripcija. Prema tome, molekuli iRNA treba da pređu iz jedra u citoplazmu. Zna se da mnogi iRNA molekuli nikada ne napuštaju jedro. Mehanizmi na samoj jedrovoj membrani odabiraju molekule iRNA koje prolaze u citoplazmu. U drugoj etapi udaljuju se ili "sijeku"

nepotrebni dijelovi rRNA, a neophodni dijelovi rRNA za određenu funkciju ćelije se "prebacuju" u citoplazmu.

Treća etapa se odvija na nivou "citoplazmatske" rRNA koja se može zadržati u neaktivnoj formi. Posljednja etapa je na nivou translacije genetske informacije. Za dalji proces potrebni su slobodni ribosomi, jer u suprotnom slučaju sinteza ne može da počne. Potrebno je, također, da u citoplazmi postoje svi potrebni faktori inicijacije, elongacije i terminacije a molekule RNA moraju da se oslobode proteinske komponente koja ih štiti od enzimske razgradnje.

DETERMINACIJA SPOLA

Rano u procesu oplodjenja u zigoti se determiniše spol muški, odnosno ženski. Iz zigota se razvija diploidna individua koja ima po dva identična hromosoma (jednaka po obliku i veličini jedan od majke drugi od oca). Kod najvećeg broja vrsta spol je odvojen, odvojene su muške i ženske individue, a hromosomi muškarca i žene se neznatno razlikuju. Naime, kod jednog i drugog spola ima po jedan par hromosoma koji se razlikuje po veličini i obliku. Ovo je spolni par hromosoma koji ima fundamentalnu ulogu u determinaciji spola individua, ispoljavaju specifične spolne efekte moždanih ćelija, endokrinih žlijezda, gonada itd. Dakle, razlikuju se dvije vrste spolnih hromosoma, jedna vrsta su X hromosomi, a druga vrsta su Y hromosomi. U normalnim humanim ćelijama žena su dva X (XX) hromosoma, a muškaraca jedan X i jedan Y (XY) hromosom. Dok je, na primjer, kod *Drosophila* ukupno devet hromosoma (4 para), ženka ima tri para autosoma i jedan X spolni hromosom. Ali mužjak ima tri para autosoma i jedan par spolnih hromosoma X i Y.

Kod produkcije jajnih ćelija u mejozi sve jajne ćelije sadrže po jedan tip autosomalnih hromosoma plus jedan X spolni hromosom, kod muškaraca u mejozi, jedna polovina spermija sadrži po jedan hromosom svakog tipa autosoma plus jedan Y spolni hromosom, a druga polovina sadrži po jedan hromosom svakog tipa autosoma plus jedan X spolni hromosom. Ukratko, sve jajne ćelije su slične u hromosomalnom sadržaju, ali se razlikuju dva tipa spermija (X i Y spermiji) u podjednakom broju.

U procesu fertilizacije aproksimativno jednaku šansu ima jaje da bude oplodeno spermijem koji sadrži X hromosoma ili spermijem koji sadrži Y hromosom, pa nastaju zigoti XX iz kojih se razvijaju ženske individue ili XY zigoti iz kojih se razvijaju muške individue. Znači, spol individua se determiniše u momentu oplodjenja zavisno od tipa spermija koji oplodi jajnu ćeliju.

Sistem XY- mužjaci je karakterističan za mnoge životinje, biljke, uključujući sve mamalijske. Međutim, naprimjer, kod ptica, leptira, nekih riba je upravo sistem suprotan. Mužjaci imaju XX spolne hromosome a ženke XY (simboli su obično drugi kao ZZ-mužjaci i ZW-ženke). U himenoptera su, naprimjer, mužjaci haploidni, a ženke diploidne.

Uloga Y-hromosoma u determinaciji spola

Humani Y hromosoma je odgovoran za razvoj primitivne gonade u testisu. Ovaj hromosom sadrži gene koji determinišu razvoj muških spolnih gonada. Geni se nalaze u dijelu Y hromosoma (gornji dio) koji se naziva holandrični a geni holandrični geni. U ovom dijelu Y hromosoma je H-Y lokus, produkt ovog lokusa je H-Y antigen. Utvrđeno je da je H-Y antigen evolucijski konzerviran i da se ispoljava u ranim stadijima embrionalnog razvoja, čak u osamćelijskom stadijumu embriogeneze kod miša. H-Y antigen je difuzna supstanca rezultira formiranju Volfovih kanala u testisima, nešto kasnije u razvoj testisa i formiranju spermija.

Spolno vezani geni, dakle, kontrolišu uobičajeno smatrano "spolne" karakteristike. Međutim, mnogi geni ne asociraju sa spolno vezanim genima, nalaze se na autosomalnim hromosomima, a determinišu razvoj nekih "spolnih" karakteristika. Naprimjer, rast, sazrijevanje spolnih organa, distribuciju tjelesnih dlačica, dojke ili druge sekundarne spolne karakteristike su determinisane genima na autosomima u oba spola. Jasno je da spolni hromosomi determinišu sintezu spolnih hormona, a hormoni utiču sekundarno na aktivnost autosomalnih gena djelujući stimulatивно ili inhibitoryno.

DIFERENCIJACIJA SPOLOVA

Barrovo tjelašće

Ne samo da se muški i ženski spol razlikuje po spolnim hromosomima (XX i XY), postoji razlika u prisutnosti spolnog inaktiviranog hromatina koji je označen kao inaktivirani X hromosom ili kod muškaraca Y hromatin. Naime, Barr i Bertram (1949.) dokazali su spolni dimorfizam u interfaznim jedrima sisara. Ispitali su neurone hipoglosusa zrelog mačijeg mozga. U jedrima ženki našli su kondenzovanu hromatinsku masu uz rub jedra koja nije bila prisutna u interfaznim jedrima normalnih mužjaka. Ova hromatinska materija nazvana je Barrovo tjelašće (sl. 10.7)

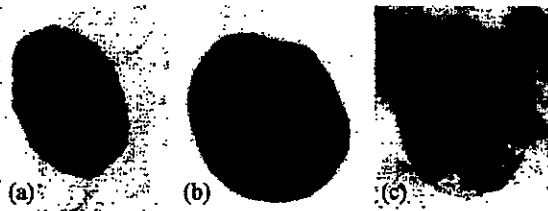
Dakle, Barrovo tijelo je vidljivo u somatskim ćelijama ženki sisara. U tkivima embria vidi se već nakon 16-20 dana embrionalnog razvoja. Tjelašće je vidljivo u interfaznim jedrima, samo nekoliko sati prije mitoze kada je završena replikacija hromosoma. Tjelašće nastaje kao rezultat kasno replicirajućeg jednog X hromosoma. Naime, jedan X hromosom se ne replicira sinhrono sa drugim. Kod kasnoreplicirajućeg hromosoma sinteza DNA čitavom dužinom hromatida nije jednaka.

Od kasnije replicirajućeg X hromosoma odvaja se dio heterohromatina u vidu grudvice koja ostaje uz rub jedrovog omotača (Barrovo tjelašće). Ovaj dio heterohromatina je inaktiviran (ne nosi genetski aktivne gene), a inaktivacija nastupa 16 dana nakon fertilizacije. Proces inaktivacije je slučajna za X

hromosom (od oca ili majke). Inaktivacija zahvata samo dio X hromosoma, jer segmenti obaju X hromosoma aktivno učestvuju u normalnom razvoju gonada i normalnom rastu i razvoju osobe. To izjednačavanje genske aktivnosti kod različitih spolova kod sisara označava se kao efekat doze djelovanja gena. Barrovo tjelašce nemaju ćelije hematopoeze i gametogeneze.

Opšta formula za broj Barrovih tijela je broj X hromosoma minus jedan. U somatskim ćelijama normalnih žena nalazi se samo jedno Barrovo tjelašce (Barr +). Žene sa abnormalnom gonosomalnom konstitucijom npr. XXX imaju po dva Barrova tjelašca. Normalni muškarci nemaju Barrovo tjelašce (Barr -). Samo muškarci sa abnormalnom gonosomalnom konstitucijom npr. XXY imaju po jedno Barrovo tjelašce u somatskim ćelijama ili XXXY, imaju po dva tjelašca u somatskim ćelijama itd. Znači, sa povećanjem broja hromosoma povećava se broj Barrovih tjelašaca. U medicinskoj citogenetici za izvođenje Barrovog testa koristi se ćelijama bukalne sluznice, ćelijama korijena dlake ili ćelijama plodove vodice. Procenat nadenih Barrovih tjelašaca ovisi uglavnom

o indivi dualnim razlikama. U razmazima bukalne sluznice u normalnih žena nalazi se (acet-orcein metoda) oko 20-30% jezgara sa Barrovim tjelašcima. Mnogo više nalazi se u fibroblastima oko 50%, a u jezgrima neurona i do 90%. Barrovim testom se koristi u medicinskoj dijagnostici gonosomopatija, naprimjer, otkrivanja Klinefelterovog sindroma XXY (jedno Barrovo tjelašce) ili Turnerovog sindroma XO (žena nema Barrovo tjelašce) itd.



Slika 10.7 Spolna hromatinska tjelašca u nukleusu tri različite ćelije. a) Hromatin negativna, nema X- hromatinsko tjelašce (Barrovo tjelašce). b) Nukleus sa jednim X- hromatinskim tjelašcem (jedno Barrovo tijelo) .c) Nukleus sa dva X- hromatinska tjelašca (dva Barrova tjelašca) .

Bubnjarski štapić ili "drumstick"

Da postoji spolni dimorfizam u ćelijama kod ljudi služi kao dokaz prisustvo spolnog hromatina u granulocitima žena u vidu malih privjesaka-oblika palice za bubanj ("dumctick") Sl. 10.8. Veličine glavice je 1, 4-1, 6 mikrona koja se tankim nastavkom drži za lobus jezgre granulocita. Za pregled se obično uzima razmaz periferne krvi. Potrebno je pregledati najmanje 500 neutrofilnih granulocita. Naime, bubnjarski štapić se nalazi u oko šest

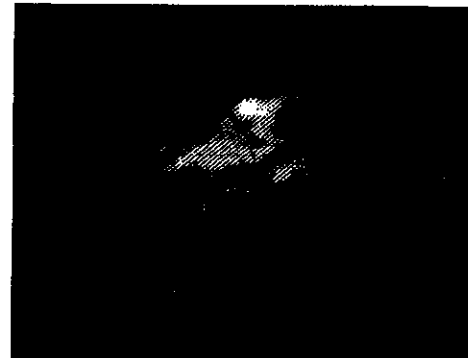
jezgara u izbrojanih 500 granulocita. Postoje individualne i porodičnene razlike u broju štapića. Broj bubnjarskih štapića ovisi o broju X- hromosoma kao što je slučaj sa Barrovim tjelašcima.



Slika 10.8 Jezgra neutrofilnog granulocita. Razmaz periferne krvi. Strelica pokazuje Drumstick.

Y-hromosom i "F" tjelašce

Pearson i saradnici (1971.) su fluorescentnom tehnikom dokazali Y-hromosom u interfaznim jezgrama muškaraca. Fluorescentnom tehnikom s kvinakrin dihidrochloridom dokazali su da postoji spolni dimorfizam u interfaznim jezgrama muškaraca i žena. Od tada se metoda upotrebljava za dokazivanje "F" (fluorescentnog) tjelašca u ćelijama bukalne sluznice, periferne krvi, amnionske tečnosti, gametogeneze u embrionalnom tkivu i dr. F-tjelašce vidi se u ćelijama somatskih tkiva i gametogenezi muškarca. Vidljivo je samo u ćelijama čovjeka i gorile dok se u jedrima drugih sisara ne vidi.



Slika 10.9 "F" tjelašce (q14 regija Y hromosoma) u fibroblastima kulture ćelija. Strelica pokazuje "F" Tjelašce.

F-tjelašce izgleda kao zelenkasta tačkica koja jako fluorescira u interfaznim jezgrama. To je zapravo q14 regija donjeg kraka Y hromosoma, vidljiva u 25-50% interfaznih jezgara bukalne sluznice, ili 40-47% u glavicama spermija.

Molekularna medicina

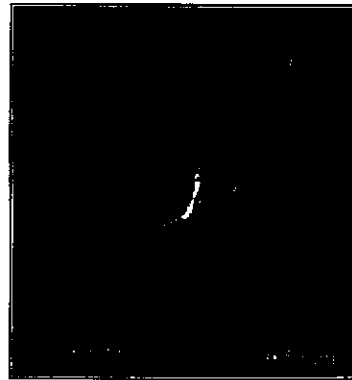
Fertilizacija in vitro

Infertilitet je posljedica različitih uzroka koja se može ispoljiti kod jednog od bračnih partnera, muškog ili ženskog. Mnogi slučajevi su posljedica anatomskog defekta Fallopijan tuba kroz koje putuju oocite od ovarija u uterus. Neke žene su infertilne zbog hormonalnih poremećaja, što je najčešće posljedica prekida normalne metafaze II jajne ćelije. U drugom slučaju, infertilitet je rezultat poremećaja u muškog partnera, kao npr. u produkciji ejakulata broj spermija nije adekvatan normalnom broju.

In vitro fertilizacija (IVF) je prvobitno korištena samo za tretman defekta tuba kod žena, međutim, danas se upotrebljava kod reproduktivnog poremećaja i žena i muškaraca. Molekularno-ćelijska osnova u in-vitro fertilizaciji jeste ponovno uspostavljenje metafaze II jajne ćelije u kulturi zajedno sa spermijima. Fertilizacija se obavlja između 12 i 18 sati, a zatim se mikroskopski posmatra i otkriva formacija dva pronukleusa (jajeta i spermija). Oplodena jajna ćelija se vraća u Fallopijan tubu ili uterus žene da se nastavi dalje razvijati. Alternativno, oplodeno jaje može biti držano u kulturi još oko pet dana. Za to vrijeme se embrionalne ćelije počinju dijeliti na tom mjestu.

IVF je, također, efektivna i za druge reproduktivne poremećaje. Npr. hormonalni defekt može biti odstranjen dodavanjem hormona u procesu metafaze II ženskom partneru. Ovaj tretman rezultira u produkciji velikog broja jaja koja mogu biti oplodena in vitro, a zatim uspješno oplodena jaja vraćena nazad u uterus. IVF je, također, uspješna i u slučaju infertiliteta muškaraca usljed insuficijencije funkcionalnih spermija. Međutim, novom procedurom moguće je samo jedan spermij inicirati u jaje u slučajevima kada oplodnja nije rezultat standardne in vitro oplodnje u kulturi. IVF je pogodna metoda za dijagnostiku i prevenciju genetskih bolesti: npr. jedna embrionalna ili više ćelija u razvoju mogu biti izolovane i testirane citogenetski za hromosomske aberacije ili za mutirane allele koji determinišu neke nasljedne bolesti. Mutirani gen može biti identificiran sa PCR metodom. Potom je moguće izdvojiti samo embrionalnu ćeliju nosioca normalnog gena i prenjeti u kulturu. Kombinacija ovih metoda omogućava preimplantacionu genetsku dijagnozu, tj. omogućiti parovima koji su nosioci mutiranog gena da se zaštite.

Humana jajna ćelija sa tri polarna tijela desno
Handyside, A.H. and Delhanty, J.D.A. 1997.



Humana Genetika

11

MENDELJANSKA GENETIKA I NASLJEDE

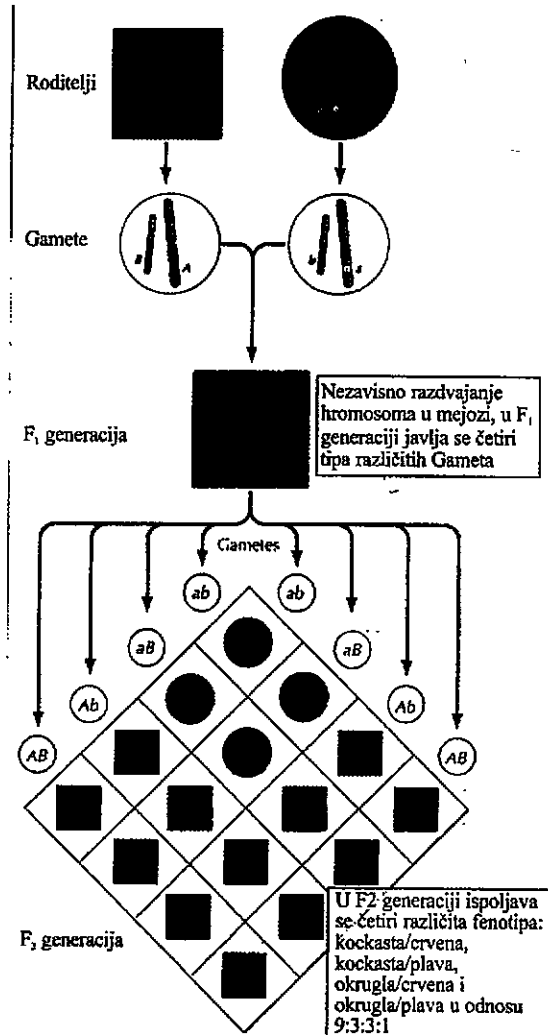
Barem onoliko dugo koliko postoji istorijsko pamćenje o ovom problemu, ljudi su znali da se mnoge osobine, kao morfološke, fiziološke ili čak ponašanje, nasljeđuju. U toku milenija, znanjem i iskustvom koristilo se za postizanje boljih kvaliteta npr. žitarica, povrća i voća kao i domaćih životinja. Kao što su naučnici spoznali kako da uzgoje vrste sa željenim svojstvima, nisu mogli objasniti zašto se druge osobine gube ili se postepeno gase u sljedećim generacijama. Također, nisu mogli objasniti miješano nasljeđivanje kada djeca treba da naslijede osobine oba roditelja, što se uvijek ne dešava. Ili, zaista potomstvo naslijedi osobinu koju nema niti jedan od roditelja. Npr. kako se radaju plavooka djeca od smeđookih roditelja. Razjašnjenje ovog fenomena ostalo je intelektualni izazov sve do polovine 19. vijeka. Prva osoba koja je razjasnila ovaj fenomen bio je otac ili osnivač klasične genetike katolički opat benediktanac iz Češke Gregor Johann Mendel (1822.-1884.). Godine 1862. objavio je teoriju, koja se kasnije pokazala tačnom, po kojoj se određena svojstva nasljeđuju od roditelja na potomstvo. Svoju teoriju o nasljeđu temeljio je na eksperimentalnom radu na grašku.

Godine 1900. radovi Mendela o prirodi nasljednih faktora su ponovo aktualizirani. Kratko vrijeme nakon toga Mendelovi radovi su postali poznati u svim naučnim krugovima svijeta. Tri godine kasnije Walter Sutton i Theodor Boveri postavili su prvu jasnu formulaciju hromosomske teorije nasljedja prema kojoj su hromosomi nosioci gena i geni se prenose zajedno sa hromosomima iz generacije u generaciju.

MENDELQVI EKSPERIMENTI

Princip segregacije

Za svoje prve eksperimente Mendel se koristio metodom hibridizacije ili ukrštanja. Ukrštao je različite vrste vrtnog graška. Polazio je od čistih genotipova, tj. od roditelja (P), homozigotan dominantan (AA), a drugi homozigotan recesivan (aa) za dato svojstvo (sl. 11.1). Svi potomci (F1) su bivali jednaki i fenotipski (sa ispoljenim dominantnim svojstvom A) i genotipski (heterozigotni-Aa). Ovo pravilo uniformnosti F1 potomstva se kasnije ponavljalo u svim ukrštanjima biljaka, a kasnije i životinja.



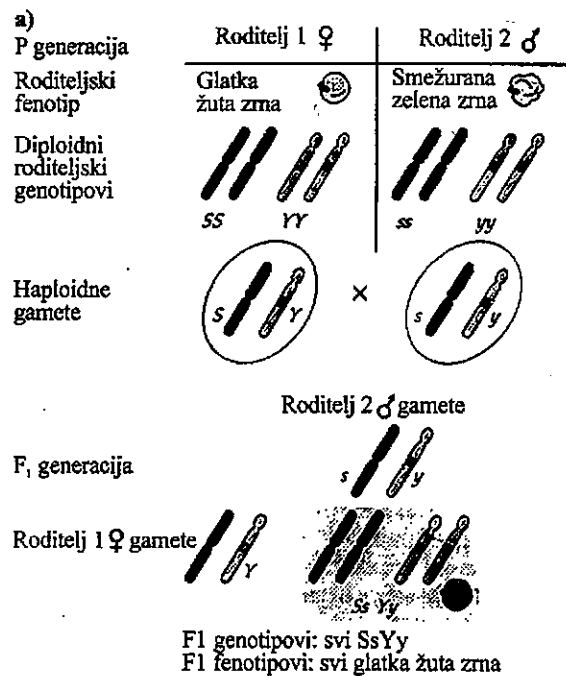
Slika 11.1 Segregacija gena Segregacija dva hipotetična gena locirana na različitim hromosomima (A/a=kvadrat i B/b= crveno/plavo). (Prema Russel, P.J. 1998.).

Nakon ukrštanja potomstva F1 između sebe nastajalo je F2 potomstvo sa ispoljenim i dominantnim (A) i recesivnim (a) svojstvima u odnosu 3:1, tj. 75% potomstva imalo je ispoljeno dominantno svojstvo (u homozigotitetu -AA i u heterozigotitetu -Aa) jednog od roditelja, a 25% recesivno svojstvo (aa) drugog roditelja. Na osnovu eksperimenata Mendel je zapazio da se neka svojstva ispoljavaju već u F1 generaciji i označio ih je kao *dominantna*, neispoljena svojstva označio je kao *recesivna*. Zaključio je da razviče od svakog od analiziranih svojstava kontroliše određeni nasljedni faktor koji se nalazi u spolnim ćelijama (gametama). Prilikom formiranja gameta u procesu spolne diobe svaki nasljedni faktor (gen) se razdvaja u dva člana (allele) tako da svaka spolna ćelija (gamet) dobiva po jedan nasljedni član (allel). Iz ovih analiza proizišao je prvi Mendelov princip ili zakon nasljednosti - to je *princip segregacije (razdvajanja)* članova (allele) jednog nasljednog faktora (gena) u formacije gamete. Mendelovi rezultati su postali kapitalni i čine osnovu onome što mi danas znamo o funkciji i anatomiji hromosoma. Razmatrajući njegove rezultate sa moderne perspektive, gen u ćelijama graška za boju cvijeta ima svoje mjesto (lokus) na homolognom paru hromosoma. Gen može egzistirati u više različitih formi (allele), po jedan u svakom hromosomu homolognog para. Čelije sa dvije iste kopije jednog nasljednog faktora (dva ista allele) su homozigotne (AA ili aa), a sa dva različita allele su heterozigotne (Aa) za dato svojstvo. Genetska konstitucija (genotip) za dato svojstvo može biti homozigotna dominantna (AA) i heterozigotna (Aa) sa mogućnošću ispoljavanja (fenotip) dominantnog svojstva. Ili, genetska konstitucija (genotip) može biti homozigotna recesivna (aa) za dato svojstvo kada je jedina mogućnost da se recesivno svojstvo ispolji (fenotip).

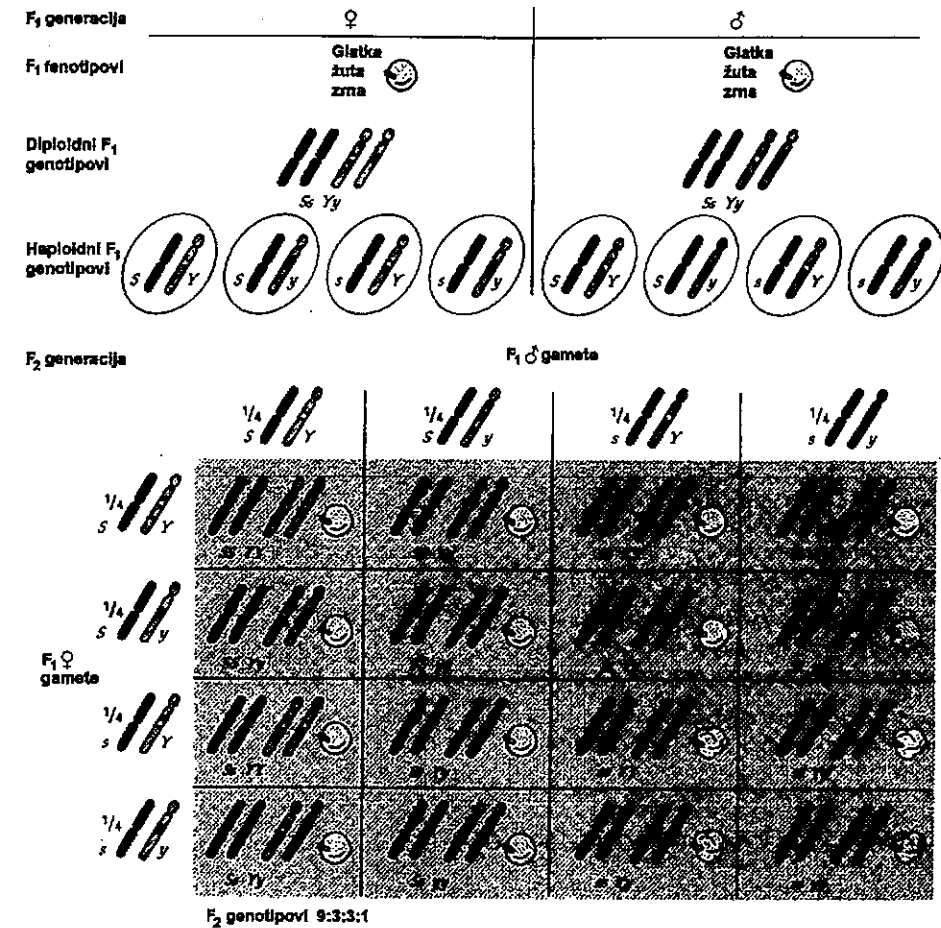
Princip nezavisnog kombinovanja

U drugoj seriji eksperimenata Mendel je studirao ukrštanje između jedinki koje su se razlikovale u dvije ili više karakteristika (dihybridno, trihybridno, uopšte polihybridno ukrštanje) čiji su nasljedni faktori (geni) smješteni na različitim hromosomima, npr. pratio je nasljeđivanje dva svojstva (dihybridno ukrštanje). Kod jednog od roditelja bila su ispoljena ta svojstva u dominantnoj formi (AABB), a kod drugog u recesivnoj formi (aabb). Nakon ukrštanja dobio je F1 potomstvo sa ispoljenim dominantnim svojstvom, ali u odnosu na genotip heterozigotno (AaBb). S obzirom na heterozigotni genotip, potomstvo F1 generacije (i muško i žensko) je proizvelo četiri grupe gameta (AB, Ab, Ba, ab). Nakon ukrštanja potomaka F1 (mužjaka i ženki) potomstvo F2 je pokazalo raznovrstan fenotip, tj. 4 klase u odnosu 9:3:3:1. Svaka klasa je imala više različitih genotipova nastalih pri segregaciji nasljednih faktora (gena) roditelja.

Od 16 kombinacija 9 potomaka je imalo ispoljena oba dominantna svojstva jednog od praroditelja, tri potomka su imala ispoljeno jedno dominantno i jedno recesivno svojstvo (AAbb), što su nove kombinacije. Druga 3 potomka su, također, imala ispoljeno jedno dominantno i jedno recesivno svojstvo (suprotna prethodnoj klasi) aaBB, što je opet bila nova kombinacija i kod jednog potomka bila su svojstva (aabb). Mendel je zaključio da se ova svojstva isključivo nasljeđuju neovisno jedno od drugog i ispoljavaju se u fenotipu F2 potomstva. Na osnovu ovih rezultata formulisao je drugi princip ili *zakon nezavisnog kombinovanja*. Po ovom principu, alleli jednog nasljednog faktora (gena) za dato svojstvo neovisno se odvajaju od alela nasljednog faktora (gena) za drugo svojstvo i pri tom se slobodno kombinuju (sl. 11.2).



Slika 11.2 Princip nezavisnog kombinovanja svojstava u dihibridnom ukrštanju. Uvijek aktualno Mendelovo ukrštanje sa graškom: glatka/smežurana i žuta/zelena zrna.
a) Produkcija F1 generacije.

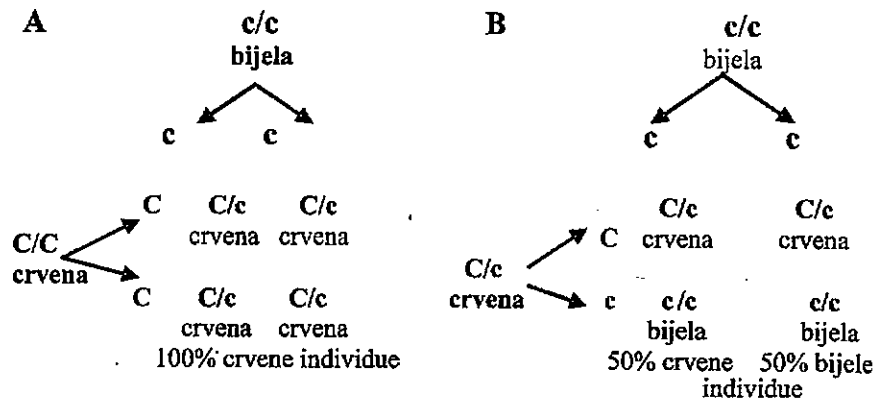


b) F₂ generacija i odnos fenotipova 9:3:3:1 glatkog -žutog zrna: glatkog -zelenog: smežuranog-žutog: smežuranog-zelenog, dobiven Punnettovom križaljkom. 9/16 glatka-žuta zrna, 3/16 glatka-zelena zrna, 3/16 smežurano-žuta i 1/16 smežurano-zelena zrna.

POVRATNO UKRŠTANJE

Povratnim test ukrštanjem Mendel je ispitivao nepoznati genotip potomstva. Kako kod potomstva sa ispoljenim dominantnim svojstvom nije moguće na osnovu fenotipa odrediti genotip (jer se dominantno svojstvo ispoljava i u homozigotitetu i u heterozigotitetu) za dato svojstvo, ukrštao ih je sa roditeljem (praroditeljem) koji je nosilac recesivnog svojstva. Fenotip potomstva povratnog ukrštanja je ukazivao na nepoznati genotip testiranih jedinki.

A) Potomstvo kod kojeg je bilo ispoljeno recesivno svojstvo u 50% slučajeva, a dominantno svojstvo, također, u 50% slučajeva, ukazivalo je na heterozigotni genotip (Cc) testirane jedinke za dato svojstvo. B) Potomstvo koje je 100% imalo ispoljeno dominantno svojstvo u fenotipu, ukazivalo je na to da je testirana jedinka imala homozigotni genotip (CC) za dato svojstvo (sl. 11.3).



Slika 11.3 Test ukrštanje (A) Homozigotna dominantna (C/C) individua je ukrštanja sa heterozigotnom (C/c) individuom, 100% ispoljeno je dominantno svojstvo. Testirana individua je homozigotna dominantna. (B) Ako je testirana individua heterozigotna (C/c), 50% potomstva je sa ispoljenim dominantnim svojstvom, a 50% sa ispoljenim recesivnim svojstvom.

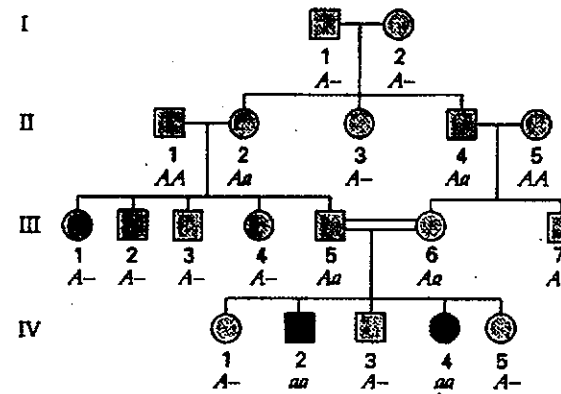
MENDELIJANSKA GENETIKA U ČOVJEKA PROČITO

Mendelovi zakoni nasljedstva se primjenjuju kod čovjeka isto kao kod svih eukariota. Čitav niz normalnih i abnormalnih svojstava se nasljeđuje prema Mendelovim principima. Međutim studije nasljeđivanja svojstava u oblasti humane genetike su znatno složenija u odnosu na ukrštanje kod biljaka i životinja. Nasljeđivanje svojstava u čovjeka se obično prati pedigre analizom, tj. ispitivanjem familijarnog stabla individue sa ispoljenim određenim svojstvom. Da bi se, prije svega, ustanovilo na koji način se nasljeđuje neko svojstvo, potrebno je konstruisati genaološko ili rodoslovno stablo. Na osnovu konstruisanog genaološkog stabla može se dobiti čitav niz podataka. Ovo je univerzalni metod u genetici čovjeka i primjenjuje se za rješavanje niza teoretskih i praktičnih problema. Ovom metodom moguće je odrediti tip nasljeđivanja, karakteristike svojstava koja se ispituju, nasljeđivanje mutacija i njihov intezitet zatim, analizirati vezane gene i mapirati hromosome, a posebno se primjenjuje u medicinsko-genetskim konsultacijama u genetskom savjetovalištu i slično.

Osnovni principi dogovoreni su međunarodnom konvencijom. To znači da se za žensku osobu normalnog fenotipa ucrtava prazan krug, a za osobu sa anomalijom ili bolesnu ispunjen krug. Za normalnog muškarca ucrtava se prazan kvadrat, a za bolesnog ispunjen kvadrat. Ispunjeni krug ili kvadrat označava homozigotne dominantne za određenu bolest. Prazni krug ili kvadrat označava homozigotne recesivne zdrave osobe. Krug ili kvadrat sa tačkom označava heterozigotne osobe za dominantno ili recesivno svojstvo.

Roditeljski par je povezan horizontalnom linijom (bračna linija). Roditeljska linija vezana je horizontalnom linijom za potomstvo (djecu) Djeca se označavaju rednjim brojevima prema redosljedu radanja. Jedan horizontalni niz individua predstavlja jednu generaciju i označena je rimskim brojevima. Najstarija generacija obilježena je sa I. Ako jedan član rodoslovnog stabla nosi npr. oznaku IV2, znači da je drugorođeno dijete četvrte generacije (sl. 11.4)

Generacija:

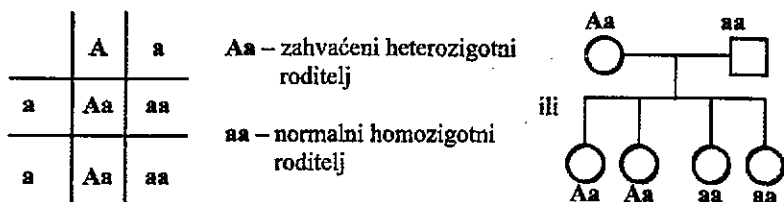


Slika 11.4 Humani pedigre, ilustrira primjenu pedigre simbola. Genaološko stablo prikazuje četiri generacije (I, II, III, IV). Potomstvo je označeno rednim brojevima. Crveno obojeni kvadrat i crveno obojeni krug označava bolesnog muškarca i bolesnu ženu.

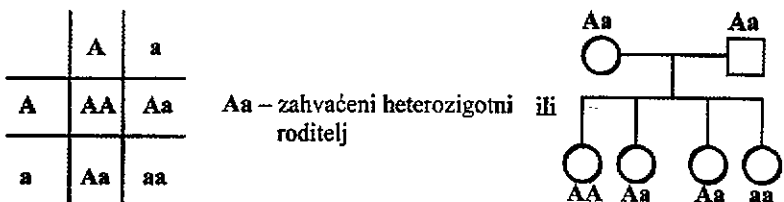
Nasljeđivanje dominantnih svojstava

Prvo nenormalno monogeno (determinisano jednim genom) svojstvo čovjeka za koje se dokazalo da se nasljeđuje po Mendelovim principima bilo je brahidaktilija ili srasli prsti (sl. 11.5). U braku između jednog roditelja sa brahidaktilijom i drugog sa normalno razvijenim prstima, po principu vjerovatnosti, polovina potomaka nasljeđuje ovu anomaliju, a polovina normalne prste. Ovaj odnos (1:1) karakterističan je za Mendelovo ukrštanje roditelja od kojih je jedan heterozigot dominantan za datu anomaliju, a drugi homozigot recesivan za tu anomaliju (normalne prste).

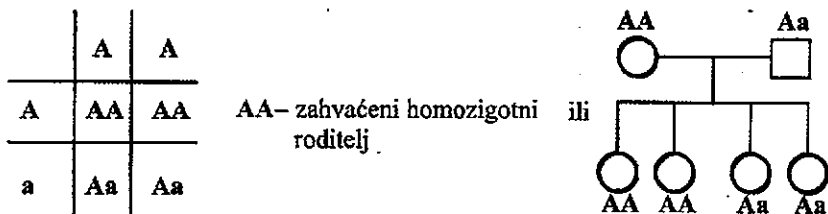
Zbog pravila segregacije hromosoma i gena u mejozi polovina potomaka dobija gen za brahidaktiliju, a polovina normalni gen, što je prikazano na tabeli:



U braku između dviju heterozigotnih osoba u 75% slučajeva rade se potomstvo sa brahidaktilijom (genotipa AA i Aa), a u 25% slučajeva potomstvo sa normalnim prstima (genotip aa). Prikazana kombinacija:



U braku između homozigotne osobe (AA) za brahidaktiliju, sve potomstvo nasljeđuje gen za ovu anomaliju, bez obzira na to kakav je genotip drugog roditelja. Naprimjer:

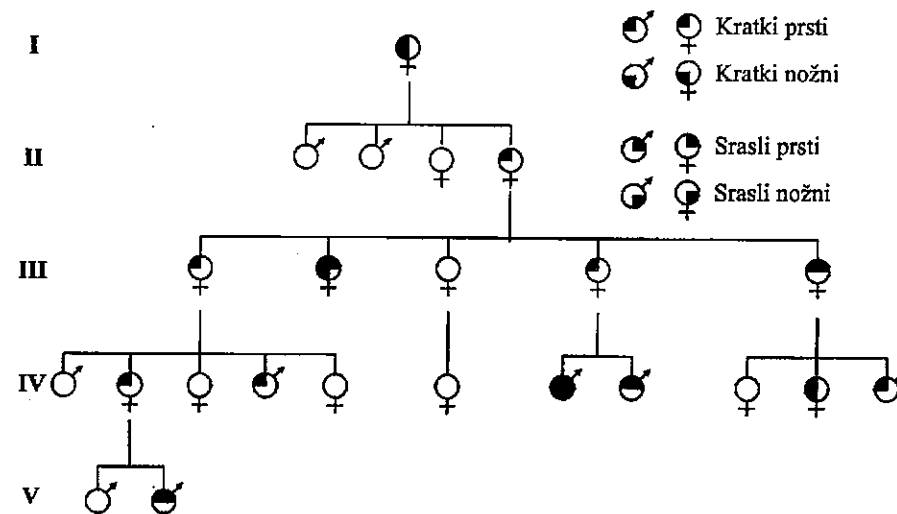


Na isti se način nasljeđuju mnogobrojne druge dominantne i recesivne anomalije kod čovjeka. Za dominantno nasljeđivanje u čovjeka karakteristično je da dominantni geni mogu pokazivati čitav spektar fenotipskih varijacija. U slučaju intermedijernog nasljeđivanja radi se o nepotpunoj dominaciji, jer fenotipski nije izražen niti dominantni niti recesivni gen. Poznato je, npr. da gen za brahidaktiliju u heterozigotu (Aa) prouzrokuje mali poremećaj u razviću skeleta prstiju, a u homozigotnom stanju (AA) dovodi do srastanja prstiju. U ovom slučaju teško je odrediti potpunu ili nepotpunu dominaciju, pa se u humanoj genetici koristi terminom dominantan za bilo koji gen koji se fenotipski izražava u heterozigotnom stanju. Ovu fenotipsku varijabilnost uslovljavaju dva genska svojstva i označena su kao: *ekspresivnost i penetrabilnost gena*.

Ekspresivnost označava stanje fenotipske izražajnosti jednog gena. Naprimjer, gen za polidaktiliju (povećan broj prstiju) može manifestirati čitav niz fenotipskih varijacija od izmjene u vidu zadebljanja do pojave jednog ili više prekobrojnih prstiju (sl. 11.6) a **penetrabilnost** (probojnost) predstavlja statistički pojam kojim se izražava procenat od ukupnog broja individua nosilaca određenog dominantnog gena, kod kojih je svojstvo fenotipski izraženo. U nekim porodicama zbog slabe penetrabilnosti gena cijela jedna generacija potomaka može biti preskočena za dato svojstvo da bi se dominantni gen ispoljio tek u narednoj generaciji. Gen koji se uvijek fenotipski ispoljava ima 100% penetrantnost, naprimjer, gen za krvne grupe čovjeka.



Slika 11.5 Sinbrahidaktilija. Prikazani su skraćeni i srasli prsti. (Iz Fraser, R. and Moreus, E.1998.)



Slika 11.6 Pedigre ilustrira različita stanja fenotipske ekspresije gena. Brahidaktilija i sinbrahidaktilija. (Malloch.)

- Kratki prsti 6*
- Kratki prsti i kratki nožni 2*
- Kratki prsti i srasli prsti 3*
- Kratki prsti i nožni; srasli prsti 1*
- Kratki prsti i nožni; srasli prsti i nožni 1*

Nasljeđivanje recesivnih svojstava

Mnoga recesivna svojstva su rijetka i otuda je nekada teško odrediti da li se radi o recesivnom svojstvu. Utoliko je teže što i faktori sredine mogu uticati da se u jednoj familiji ispolji jedno svojstvo kod više članova, što pruža lažan utisak da je svojstvo naslijeđeno. U najvećem broju slučajeva roditelji su heterozigotni za recesivno svojstvo i to svojstvo najčešće preskače više generacija. Kako se recesivni geni fenotipski ispoljavaju samo u homozigotnom stanju, to znači da potomak mora da dobije od oba roditelja recesivni gen za dato svojstvo. Prema Mendelovim principima, u braku između dva heterozigotna roditelja (Aa), postoji mogućnost da se rode djeca sa recesivnom anomalijom (aa) u 25% slučajeva. Posebno je interesantna skupina metaboličkih bolesti koja se nasljeđuje preko recesivnih gena, kao fenilketonurija, cistinurija albinizam i dr. Albinizam je anomalija kože, determinisana recesivnim mutiranim alelima (aa) koji asociraju sa serijom abnormalnosti ili bolesti. Individue sa albinizmom, naprimjer, (sl. 11.7) ne proizvode pigment melanin za zaštitu od UV zračenja i radijacije i drugih faktora sredine. U najvećem broju slučajeva roditelji su heterozigotni za recesivna svojstva, a fenotipski normalni. U potomstvu se rađa (25%) recesivnih homozigota za albinizam:

$$\begin{array}{l}
 Aa \times Aa \\
 A,a \quad A,a \\
 AA, Aa, Aa, \boxed{aa} \\
 3:1
 \end{array}$$

Kada jedan roditelj ima albinizam, a drugi je fenotipski normalan, ali heterozigotan za ovu anomaliju, 50% potomaka naslijedit će albinizam:

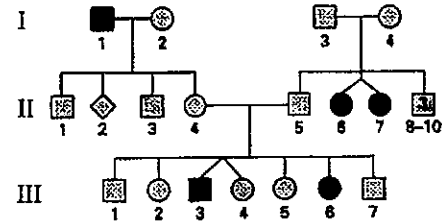
$$\begin{array}{l}
 Aa \times aa \\
 A,a \quad a,a \\
 Aa, Aa, \boxed{aa}, \boxed{aa} \\
 1:1
 \end{array}$$

Medutim, sreće se pojava kada su oba roditelja homozigotna za recesivnu anomaliju, a rađaju djecu fenotipski normalnu. Naprimjer, homozigotni albino roditelji mogu biti nosioci različitih mutacija sa istim fenotipskim efektom. Ovaj fenomen je označen kao *genokopije*. Njihovi potomci su heterozigotni za dvije različite mutacije. Radi se o genima za dva različita enzima koji regulišu različite stupnjeve biosinteze melanina, pa su potomci fenotipski normalni, genotipski heterozigotni, jer nose i mutirani gen za albinizam i drugi mutirani gen koji sintetiše određenu količinu melanina.



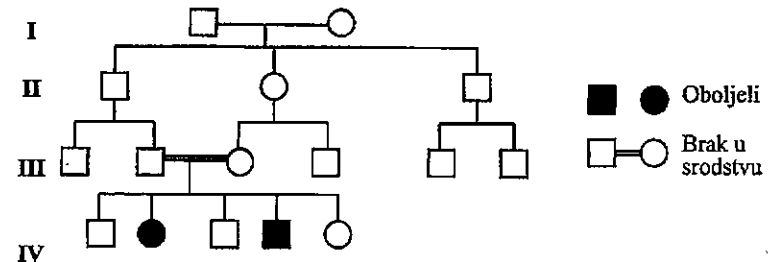
b) Pedigre

Generacija:



Slika 11.7 Humani albino a) pedigre prikazuje transmisiju autosomalnog recesivnog svojstva-albinizam.

Rijetki mutirani geni mogu se naći u homozigotnom stanju kod potomaka osoba koje su sklopile brak sa bliskim srodnikom (brak u srodstvu ili konsagvinitetu). Jer je mnogo veća mogućnost da dva srodnika koji potječu od istog pretka nasljede rijedak mutirani gen (sl. 11.8).



Slika 11.8 Recesivni geni u homozigotitetu kod potomaka roditelja bliskih srodnika (brak u konsagvinitetu)

Za mnoga svojstva čovjeka još uvijek ne postoji definitivno mišljenje o tipu nasljeđivanja. Stabla su nepotpuna, broj potomaka je mali, podaci često nesigurni. Za istu anomaliju ili bolest nekada se navodi da je autosomno recesivna, ili X-vezano recesivno svojstvo, da je dominantno ili recesivno autosomno svojstvo. Moguće je da isti gen u okviru jednog genoma ima dominantan, a u sklopu drugog genoma recesivan efekat, što se pripisuje međusobnoj interakciji gena.

POLIGENO NASLJEDIVANJE
(interakcija gena)

U mnogim slučajevima nealelni geni ne funkcionišu nezavisno u determinaciji fenotipskih karakteristika. Čitav niz svojstava organizama ne možemo upoređivati prema njihovim kvalitativnim karakteristikama već mjerenjem kvantitativnih razlika među njima. U takvu grupu svojstava spadaju, npr. tempo rasta, težina tijela, procenat bjelančevina. Intezitet fenotipa kod ispoljavanja ovih karakteristika uslovljen je zajedničkom interakcijom većeg broja gena nezavisnih u svom dejstvu, čiji se efekti sumiraju. Riječ je o genima (tj. poligenima) sa kumulativnim efektom, najčešće su smješteni na različitim hromosomima.

Interakcije između gena označene su kao *epistaze*. Epistaze mogu imati komplementarno i suplementarno epistatičko djelovanje. Nasljedni faktori koji se dopunjuju u svojoj akciji (to mogu biti dva ili više alelnih gena) koji djeluju u istom smislu i jedino njihovom zajedničkom akcijom može doći do pojave određenog fenotipa, imaju komplementarno dejstvo, što objašnjavaju primjeri: 1) na ovom principu je nasljeđivanje boje kože kod čovjeka koju uzrokuje serija od sedam alelogena. Prema jednoj hipotezi pripadnici negroidne rase imaju dominantne allele koji određuju intezitet obojenosti kože (sintezu melanina). Obilježavaju se sa P1P1P2P2. Kod pripadnika evropeidne rase zastupljeni su njihovi recesivni allele. Obilježavaju se sa p1p1p2p2. U braku između pripadnika negroidne i evropeidne rase nađeno je potomstvo sa genotipovima: P1p1P2p2 (melezi). U daljim generacijama rada se potomstvo kod kojeg je intezitet obojenosti kože predstavljen gradualnom serijom nijansi od od potpuno crne do potpuno bijele boje kože, zavisno od broja prisutnih gena za pigmentaciju u genotipu (npr. P1p1P2P2, p1p1P2p2 ili P1P1p2p2 itd.). Primjer komplementarne poligenije kod čovjeka jeste i jedan oblik gluhoonijemosti (što se može vidjeti iz križaljke). U braku između gluhoonijeme osobe (aabb) i osobe sa normalnim sluhom (AABB) svi potomci imaju normalan sluh i heterozigotni su (AaBb). Zbog komplementarnog epistatskog djelovanja gena dvije heterozigotne osobe sa normalnim sluhom u potomstvu mogu da imaju djecu ili sa normalnim sluhom ili gluhoonijemu. Dakle, samo one osobe koje imaju prisutna oba dominantna gena (A i B) imat će normalan sluh.

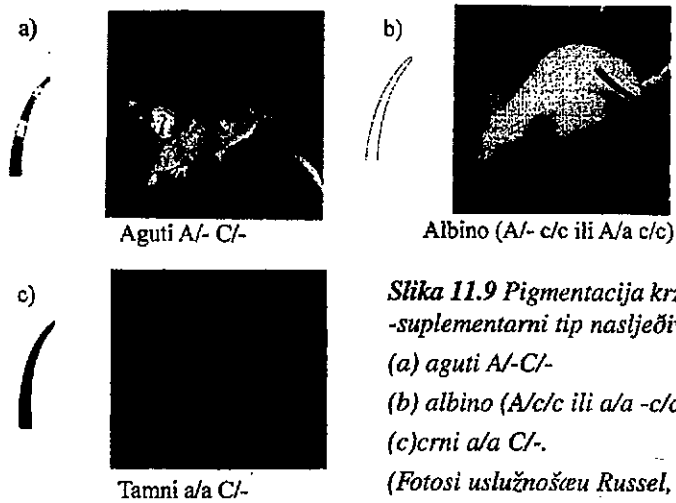
a)	$AABB \times aabb$		AB	Ab	aB	ab	
gamete:	AB ab						
potomstvo F ₁	AaBb	potomstvo F ₂	AB	AABB	AABb	AaBB	AaBb
			Ab	AABb	AAbb	AaBb	Aabb
			aB	AaBB	AaBb	aaBB	AaBb
			ab	AaBb	Aabb	aaBb	aabb
b)	$AaBb \times AaBb$						
gamete:	AB, Ab aB, ab						

Iz odnosa fenotipova (9:3:3:1) vidljivo je da se nasljeđivanje navedenih poligeniskih svojstava podudara sa Mendelovim principima. Međutim, drugi tip genskih interakcija-epistaza uzrokuju modifikaciju Mendelovih odnosa u procesu nasljeđivanja, jer jedan gen može da uzrokuje poremećaj fenotipske ekspresije kada se nađe zajedno sa drugim nealelnim genom (genima) u genomu. U ovom slučaju fenotipska ekspresija jednog gena zavisna je od genotipa drugog gena. Ovi geni imaju *suplementarno epistatsko djelovanje*. Naprimjer: jedna forma eksperimentalnih miševa ima žuto-sivu boju dlake. Takva obojenost označena je kao aguti-obojenost (sl. 11.9.). Boja dlake zavisi od dva gena od kojih jedan uslovljava pojavu boje, a drugi raspored pigmenta duž svake dlake. Svaka dlaka forme aguti ima po dužini kolut žutog pigmenta, a u osnovi i na vrhu crni pigment. Utvrđeno je da aguti obojenost dominira nad crnom i bijelom bojom krzna. Nakon ukrštanja crnih i bijelih miševa, svi potomci u F₁ generaciji bit će aguti. U F₂ generaciji javljaju se tri fenotipa: aguti, crni i bijeli u odnosu 9:3:4. Bijeli albino miševi su homozigotni za recesivni allele za boju (cc) i homozigotni dominantni za raspored pigmenta (AA), pa im je genotip ccAA. Crni miševi su homozigotni u odnosu na dominantni gen za boju (CC) i homozigotni u odnosu na recesivni allele za raspored pigmenta duž dlake (aa), pa im je genotip CCaa. Kada se nađu oba dominantna gena A i C u istom genotipu u F₁ ili F₂ potomstva, gen A za raspored pigmenta modifikira gen za crnu boju (C) u aguti obojenost. F₂ potomstvo sadrži aproksimativno 9/16 aguti miševa, 3/16 crnih i 4/16 albino u odnosu 9:3:4.

	$AACC \times aacc$		AC	Ac	aC	ac	
	aguti albino						
F ₁	AaCc	F ₂	AC	AACC	AACc	AaCC	AaCc
	aguti		Ac	AACc	AAcc	AaCC	Aacc
F ₁ x F ₁	$AaCc \times AaCc$		aC	AaCC	AaCc	aaCC	AaCc
			ac	AaCc	Aacc	aaCc	aacc

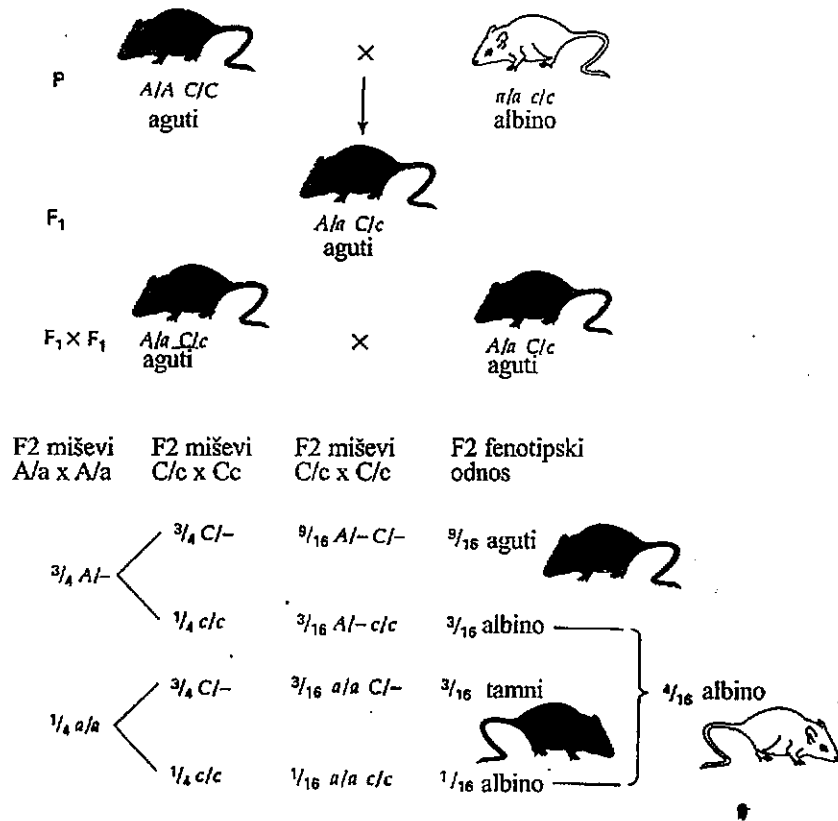
Epistaze se usložnjavaju ukoliko se radi o oba dominantna para gena ili kodominatna ili kada genski par nije nezavistan. U prethodnom primjeru (aguti obojenosti) opisali smo interakciju između dva gena koji imaju dominantno epistatsko djelovanje, a to podrazumijeva zaustavljanje aktivnosti jednog alelnog para gena od strane drugog nealelnog dominantnog para gena.

U drugom slučaju, recesivnih epistaza ili supresija, inhibitorni faktor je recesivni allele. Ovaj recesivni allele u homozigotnom stanju koči dejstvo dominantnog ili recesivnog alelomorfog para gena. U prethodnom primjeru gluhoonijemosti svaki recesivni homozigotni par allelela je epistatičan (aa ili bb) i sprečava efekat dominantnog para allelela (AA ili BB) koji je hipostatičan. Fenotipovi Aabb ili aaBB (gluhoonijeme osobe) primjer su epistatskog djelovanja recesivnih gena.



Slika 11.9 Pigmentacija krzna roditelja Glodara -suplementarni tip nasljeđivanja:
 (a) aguti A/-C/-
 (b) albino (A/c/c ili a/a -c/c) i
 (c) crni a/a C/-.
 (Fotosi uslužnošću Russel, P.J. 1998.)

F2 generacija glodara i odnos fenotipova 9:3:4.



Nasljeđivanje multiplih allelela

Kako znamo, geni mogu postojati u velikom broju allelnih formi. Normalno, pod normalnim okolnostima, maksimalni broj allelela svakog gena nekog diploidnog organizma može biti 2, pošto organizam ima samo dvije kopije svakog gena. Ali, brojni geni se javljaju u populaciji u obliku velikog broja alternativnih formi od kojih svaka može ispoljiti različite karakteristike. Najznačajnija strukturna osobenost homolognih hromosoma jeste uzdužna diferencijacija na veliki broj lokusa. Nasljedni faktori (geni) su upravo predstavljeni ovim posebnim lokusima u homolognim hromosomima.

Naspramni lokusi su slični kao i članovi (aleli) jednog gena smješteni na homolognom paru hromosoma, jedan naspram drugog. Takav par nasljednih faktora (gena), koji determinišu isto svojstvo, potiču od dva različita roditelja, a smješteni su u dva naspramna lokusa homolognog para hromosoma, označen je kao allelni ili allelomorfni par gena (prema grčkoj riječi allelon-jedan drugoga).

Međutim, gen kao složen hemijski spoj može pod uticajem različitih faktora biti promijenjen na više načina. i najmanja promjena u strukturi dovodi do poremećaja u sposobnosti determinacije sinteze proteina, tako da postoje dva tipa allelela: jedan koji dovodi do sinteze proteina i drugi koji nema tu sposobnost. Neki geni mogu da mutiraju na više različitih načina i da svaki od tih allelela determiniše isti protein, čija se grada razlikuje u jednoj ili nekoliko aminokiselina. Znači, izmjenom osnovnog gena na više pozicija, nastaju njegove varijante. Takve nasljedne faktore koji nastaju promjenom hemijskog sastava osnovnog gena u različitim njegovim pozicijama nazivamo *multiplim allelelima* (različite varijante istog gena). U jednom istom lokusu može doći do formiranja serije novih gena. Svaki član serije može potpuno ili nepotpuno dominirati nad sljedećim članom. Članovi serije mogu istovremeno ispoljavati isti efekat, tj uticati na izražajnost istog fenotipskog efekta. Mnoga nasljedna svojstva su određena multiplim allelelima kao, naprimjer, krvne grupe kod čovjeka. ABO sistem je determinisan sa tri gena IA, IB i IO. Svaki od ovih gena ima serije allelela: A1, A2, A3, A4 itd. ili B1, B2, B3 itd. Isti je slučaj sa Rh krvnim faktorom kod čovjeka kao i sa MNSs krvnim sistemom.

Pleiotropno djelovanje gena

Svaki je gen specifičan u svom dejstvu tako što je odgovoran za sintezu primarne strukture molekula određenog proteina. Međutim, mnogo je češći slučaj da jedan gen svojom aktivnošću dovede do ispoljavanja više od jedne karakteristike, tj. da se odrazi na više fenotipova. Ovaj fenomen je poznat kao *pleiotropno* djelovanje gena. Naprimjer, u miševa mutacija jednog gena produkuje protein koji se ugrađuje pri formiranju hrskavice što uzrokuje cijeli kompleks kongenitalnih (urođenih) deformacija, recimo zadebljanje rebara, sužavanje traheja, blokadu nozdrva, smanjenu elastičnost i pokretljivost miškulature kao i veliki procenat smrtnosti.

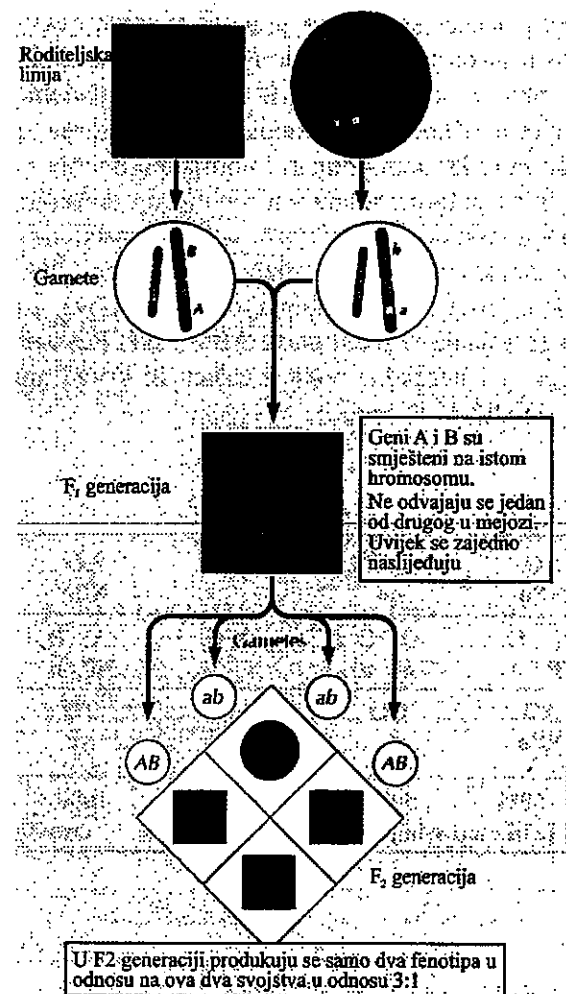
Interesantan je primjer krvne bolesti ili "srpasta anemija" kod čovjeka. Usljed specifične mutacije određenog gena dolazi do višestrukih poremećaja kod čovjeka. Homozigotni aleli za srpastu anemiju kod individua rezultiraju serijom abnormalnosti u crvenim krvnim tjelačima, tjelača dobijaju srpolik oblik i naborana su, što dovodi do zapušavanja krvnih sudova. Cirkulacija krvi se smanjuje što dovodi do bolova u abdomenu, ledima i ekstremitetima. Povećava se ritmija srca, a dolazi i do atrofije moždanih ćelija. Deformacija crvenih krvnih zrnaca ima za posljedicu težak oblik anemije. Anemija obično završava ranom smrću. Heterozigotne individue za srpastu anemiju ponekad pokazuju simptome ove bolesti. Srpasta anemija je drastičan primjer alela koji imaju više od jednog efekta u organizmu. Većina gena ima plejotropni efekat, tj. ima više efekata na organizam. Čak kada gen proizvodi samo jedan vidljiv fenotipski efekat, nesumnjivo ima brojne fiziološke efekte koje je teško otkriti.

Naprimjer, u slučaju metaboličke bolesti fenilketonurije. Usljed mutacije gena odgovornog za sintezu enzima fenil-alanin-4-hidroksilaze koji prevodi esencijelnu amino kiselinu fenilalanin u tirozin, dolazi do teške bolesti fenilketonurije, a u bočnim lancima metabolizma ove amino kiseline, također, dolazi do niza poremećaja i anomalija. Također, može biti pogođen mutacijom gen koji svoje dejstvo ispoljava u ranim fazama razvića, pa usljed njegove blokade ne može doći do sinteze većeg broja jedinjenja koja su neophodna ćeliji u kasnijim fazama razvića.

VEZANO NASLJEDIVANJE

Veliki broj svojstava pojavljuje se zajedno u fenotipu individue. To je razumljivo kada se uzme u obzir da svaki organizam ima veliki broj svojstava, a relativno mali broj hromosoma. Iz toga proizlazi da se na jednom hromosomu mora nalaziti veći broj gena za razna svojstva. Međutim, ponekad pri dihibridnom ukrštanju dobijamo navedene odnose, drugačije. To pokazuje da odstupanje, npr. od dihibridnog odnosa 9:3:3:1 ne leži u ponašanju svakog svojstva već proizlazi iz međusobnog odnosa dva svojstva. Ovo odstupanje od Mendelovih principa može biti objašnjeno pretpostavkom prema kojoj su geni koji determinišu dva svojstva smješteni u istom hromosomu. Tada ne može doći do njihovog nezavisnog raspoređivanja u potomstvu, jer u mejozi ne dolazi do razdvajanja takvih gena pošto zajedno odlaze u isti gamet. Naime, razdvajanje ne može nastupiti jer svaki hromosom prelazi iz generacije u generaciju kao cjelina. Takvi nasljedni faktori smješteni u istom hromosomu i zajedno se nasljeđuju, nazivaju se *vezani geni* (sl. 11.10). Tip nasljeđivanja označen je kao korelativno ili *vezano nasljeđivanje*.

Svaku vrstu karakteriše ograničen broj skupina vezanih gena. Vezani geni nalaze se u istoj skupini, dok oni koji se slobodno kombinuju nalaze se u različitim skupinama. Može se reći da se broj skupina vezanih gena jednog organizma podudara sa brojem njegovih hromosomskih parova.



Slika 11.10 Vezano nasljeđivanje Dva vezana gena locirana na istom hromosomu. F1 generacija: kako su oba gena smještena na istom hromosomu, ne mogu se razdvojiti jedan od drugog u mejozi. Posljedice su: u F1 generaciji proizvode se samo dva tipa gameta. F2 generacija proizvodi samo dva fenotipa- smežurano/ crveno i okruglo/plavo u odnosu 3:1.

U čovjeka je poznato nekoliko pari vezanih gena. Najčešći je sindrom "nokat-čašica" (NP) vezan za ABO genski lokus. Sindrom je posljedica mutacije gena usljed koje se obrazuje defektni ili se uopšte ne obrazuju ektoderm (nokti) i mezoderm (čašica). Istraživanja su pokazala da se ovaj sindrom u jednoj porodici javlja uvijek kod osoba A-grupe; B-ili O-grupe, ali ako je vezan za A-

grupu, svi članovi porodice sa krvnom grupom A imaju ovaj sindrom. Kasnija istraživanja su pokazala da se gen za sindrom NP nalazi na istom hromosomu (br. 9) na kojem je i lokus za krvne grupe ABO. Geni su udaljeni jedan od drugog deset genskih mjesta. Ako u brak stupi muškarac krvne grupe A sa NP sindromom i žena sa O krvnom grupom i normalnih noktiju i čašice (recesivni homozigot), a njihovi potomci imaju isti fenotip u odnosu 1:1, to znači da u gametama nije bilo crossing overa. Ukoliko se u potomstvu ne dobije mendelski odnos fenotipova karakterističan za analizirajuće ukrštanje 1:1 (50% 50%) već se javi i određen procenat rekombinantnih fenotipova, znači da je bilo crossingovera i razdvajanja vezanih gena, ABO i NP. Rekombinovane jedinice imaju krvnu grupu A i normalne nokte i čašicu ili krvnu grupu O i sindrom NP (tabela 11.1), (Diklić, V. i sarad.).

Tabela 11.1

	AO NP _n	x	OO nn		AO NP _n	x	OO nn
G	A O NP n		O O n n		A O NP n		O O n n
F1	AO NP _n		OO nn		AO NP _n		OO nn
	50%		50%		10%		40%
	Nije bilo crossingovera				crossingover		

crossing over gameta

Rekombinacija (crossingover) vezanih gena

Američki genetičar Morgan je istraživao rekombinaciju (crossingover) između vezanih gena na istom hromosomu. Na osnovu eksperimenata sa *Drosophilom melanogaste* (vinska mušica) zaključio je da u toku segregacije alela u mejozi, aleli na istom hromosomu, prenose se zajedno sa tim hromosomom. Nizom eksperimenata potvrdio je hipotezu da kada su dva gena na istom hromosomu, mogu biti fizički odvojeni jedan od drugog pri formiranju hijazmi u toku mejoze. Prije Morgana 1909. Janssens je opisao chiazmata (hijazme-mjesto citološke recipročne izmjene između homolognih hromosoma u mejozi-crossingover) u toku profaze i u mejozi tj. genetsku rekombinaciju kao rezultat fizičke izmjene između homolognih hromosoma. Morgan se koristio crossingoverom za opis procesa genetske rekombinacije između vezanih gena. Dokazao je da se crossingover može dogoditi u raznim pozicijama duž hromosoma. Zaključio je da dva gena snještena blizu jedan drugog, teže se razdvajaju, a lakše i češće

ukoliko su udaljeni. Također, pretpostavio je da učestalost rekombinacija pokazuje relativno rastojanje među genima duž hromosoma, ukoliko je crossingover češći, tim su geni zahvaćeni recipročnom razmjenom udaljeniji jedan od drugog i obrnuto. U slučaju vezanih gena usljed crossingovera stvaraju se dvije vrste gameta. Međutim crossingover gamete se ne formiraju u podjednakom broju sa normalnim (ne crossingover) gametama. U kojem procentu će biti zastupljene crossingover gamete zavisi od udaljenosti lokusa gena na hromosomu za dato svojstvo. Ako je ta udaljenost veća, postoji veća vjerovatnoća da će doći do crossingovera i obrnuto. Tako je procenat crossingover gameta uvijek manji od procenta normalnih gameta. Otuda odnos gameta koje stvaraju organizmi F1 generacije sa vezanim svojstvima nije 1:1:1:1, kao kod nezavisnih svojstava koja se nasljeđuju po Mendelovim principima, već X:1:1:X za seriju spajanja i 1:X:X:1 za seriju razdvajanja. Sa 1 se označavaju crossingover gamete, a sa X nerekombinantne gamete. Seriju spajanja čine vezana svojstva u slučaju kada se dominantna svojstva nalaze u jednom roditelju (AABB), a recesivna svojstva (aabb) u drugom roditelju. Serija razdvajanja je u slučaju, kada se u jednom roditelju nalazi jedno dominantno i jedno recesivno svojstvo (aabb), a u drugom obrnuto (Aabb). U F2 generaciji dobiva se drugi odnos fenotipova kod serije spajanja u odnosu na seriju razdvajanja. Crossingover kod vezanih gena moguće je ustanoviti samo ako se geni roditeljskih hromosoma nalaze u heterozigotnoj kombinaciji : Aa/Bb. Pri homozigotnom stanju nasljednih faktora AA/BB ili aa/bb crossingover se ne može utvrditi. To je zbog toga što razmjena identičnih sekvenci među istovjetnim parnjacima bivalenata ne može dati nove kombinacije gena.

Ovisno o tome da li rekombinacija zahvata dva ili više segmenata homolognih hromosoma crossingover može biti jednostruki, dvostruki, trostruki i četverostruki (sl. 11.11). Inače, moguća je pojava interferencije kada crossingover u jednom dijelu hromosoma koči crossingover u bliskim segmentima, a odnos između broja crossingovera u dvijema tačkama prekida naziva se stepen podudarnosti ili koincidencija.

Na osnovu učestalosti crossingovera vezanih gena Morgan je konstruisao prvu hromosomsku kartu *Drosophile melanogaster* na kojoj je utvrdio položaj nekih gena. Da bi utvrdio položaj gena na hromosomu ispitivao je veći broj vezanih svojstava, najmanje tri. Npr. ako se ispituju tri vezana svojstva -A, B, i C i ustanovi da između A i B ima 6% crossingovera između A i C 9% a između B i C 15%, onda se na osnovu tih podataka može zaključiti da se lokus A nalazi između lokusa B i C. Kao markere za konstruisanje hromosomske karte Morgan se koristio mutiranim genima. (Npr. kod *Drosophile* ustanovio je oko 500 mutacija.) Rastojanje među genima mjerio je jedinicama morganidama (nazvane po autoru). Danas je genska karta *Drosophile* potpuna i definitivno konstruisana kao i mnogih drugih prokariotskih i eukariotskih organizama.

daleko češće se ispoljavaju kod muškaraca kod kojih se geni smješteni na X hromosomu nalaze u hemizigotnom dijelu (dio X hromosoma koji nema svog homolognog dijela na Y hromosomu). Bolesti koje se nasljeđuju na ovaj način prenose se preko pogodjenih muškaraca i zdravih žena nosilaca (konduktora) recesivnog gena za datu bolest. *Hemofilija* predstavlja dobar primjer X vezanog recesivnog nasljeđivanja. U slučaju braka između pogodjenog muškarca i zdrave žene i ako se gen za hemofiliju obilježi sa X^h javit će se više vrsta kombinacija genotipova.

	X^h	Y	
X	X^hX	XY	Zdrava žena (XX)
X	X^hX	XY	Pogođeni muškarac (X^hY)

Kako muškarci predaju svoj X hromosom svakoj od svojih kćeri, a Y hromosom svakom od svojih sinova, to će sve kćerke pogodjenog oca biti nosioci (konduktori), a niti jedan od sinova neće biti pogođen bolešću. To znači da se svojstva veza za X hromosom nikada ne prenose sa oca na sina.

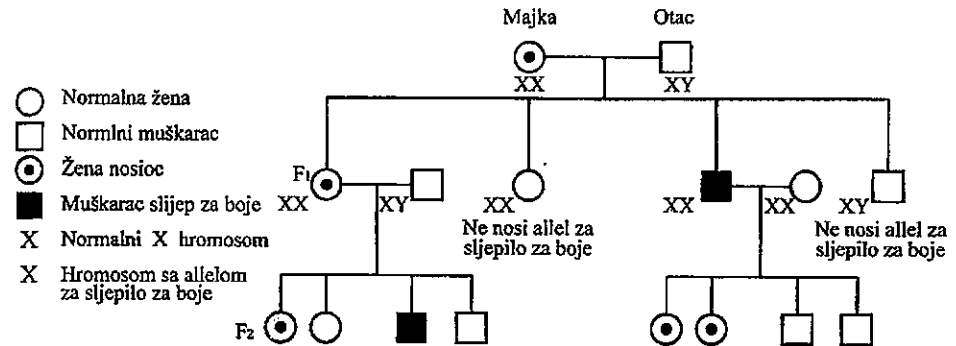
U slučaju braka između žene nosioca bolesti i zdravog muškarca moguće su sljedeće kombinacije:

	X	Y	
X^h	X^hX	X^hY	Zdravi muškarac (XY)
X	XX	XY	Žena konduktor (X^hX)

U ovom slučaju polovina sinova je zahvaćena pogodjenim genom za hemofiliju, dok je polovina kćeri nosilac gena za hemofiliju. Do pojave hemofilije kod ženskih individua može doći samo u izuzetnim slučajevima braka između žena konduktora i bolesnog muškarca. Tad nastaju homozigotne žene hemofilicari. Hemofilija nastaje recesivnom mutacijom odgovarajućeg gena, čiji proizvod, inače, treba da omogući pravilno zgrušavanje krvi poslije povrede. Kod hemofilicara ova sposobnost odsutna je ili je umanjena, tako da se krvarenje ne može zaustaviti. Najčešći oblik hemofilije je hemofilija A (80%), a odlikuje se smanjenjem supstance AHT (antihemofilicni faktor) od kojeg zavisi stvaranje tromboplastina, trombina i fibrina koji omogućavaju zgrušavanje krvi. Hemofilija B javlja se kod 20% slučajeva i ona je rezultat smanjenja plazma-trombina, a gen koji je determiniše nalazi se, također, u X hromosomu, samo na drugom lokusu. Hemofilija C predstavlja određenu izmjenu u plazma-trombo-plazminu. Javlja se izuzetno rijetko (1%) i posljedica je mutacije autosomalnog gena.

Daltonizam. Na X hromosomu nalazi se gen koji determiniše djelimično sljepilo za boje (nesposobnost razlikovanja između crvene i zelene boje). Gen sljepila za boje (daltonizam) je recesivan, kao i za hemofiliju ima semiletalan efekat. i u ovom slučaju žene su samo prenosioci mutiranog gena. Žena može

da bude daltonista samo ukoliko je homozigotna (aa) za dati gen. Anomalija se uglavnom ispoljava kod muškog spola i nasljeđuje se po istom principu kao i hemofilija, što se vidi iz primjera na slici kada unuci preko majke nasljeđuju mutirani gen od djeda (sl. 11.12).



Slika 11.12 Pedigre familije u kojoj je majka nosila jedan normalan i jedan defektan alel za razlikovanje crveno-zelene boje. Normalni alel je dominantan i ona je normalno raspoznavala boje. Međutim, polovina jaja su nosila defektne allele, a polovina normalni alel. važno je koje će jaje imati šansu za oplodnju. Budući da Y hromosom njenog muža koji određuje sina ne nosi gen za sljepilo za boje, jedan alel koji nosi žena će odrediti da li je sin slijep za boje ili nije. Polovina sinova je slijepa za boje, a polovina kćeri je nosilac recesivnog allele za sljepoću. Ovaj recesivni alel se prenosi dalje u potomstvo, pa je ova kćer dobila mušku i žensku djecu od kojih je jedan sin rođen slijep za boje

Testikularna feminizacija. Kod ljudi se sreće jedno interesantno patološko stanje nazvano "testikularna feminizacija". Pogodene osobe izgledaju kao normalne žene sa svim ženskim sekundarnim karakteristikama. Hromosomskom analizom je ustanovljeno da ove osobe imaju XY hromosomsku konstituciju i da, ustvari, posjeduju testise koji se obično nalaze u preponama. U pitanju je nedostatak enzima 5alfa-reduktaze. Kod nekih oblika ove anomalije pomenute osobe se podižu kao djevojčice, ali im se u toku puberteta mijenja spol zbog povećanja testosterona u plazmi.

Deficit enzima glukozo-6-fosfat dehidrogenaze (G6PD). Enzim je veoma značajan za metabolizam ćelije. Odsustvo pomenutog enzima u eritrocitima dovodi do hemolize eritrocita, što dovodi do teške anemije. Heterozigotne žene su redovno zdrave. Gen koji uslovljava nedostatak ovog enzima smješten je na X spolnom hromosomu muškarca. Po svojoj prirodi je recesivan, nasljeđuje se po principu hemofilije i daltonizma.

Mišićna distrofija je još jedan primjer X vezanih anomalija koje se recesivno nasljeđuju. Pošto zahvaćena muška djeca obično ne preživljavaju, bolest se prenosi isključivo preko žena nosilaca ovog gena.

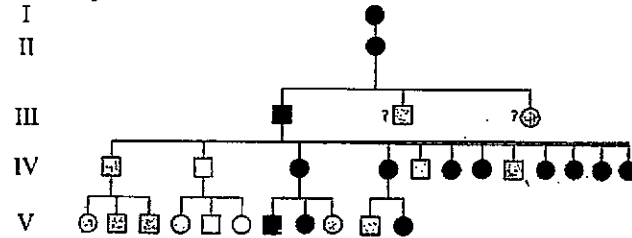
X-vezano dominantno nasljeđivanje PROČITO

Svojstva koja se javljaju kao posljedica dominantnih mutacija na X hromosomu su X vezana dominantna svojstva. Identificiran je manji broj X vezanih dominantnih svojstava. Kao primjer X vezanog dominantnog svojstva možemo navesti defekt zubne gleđi i dentalne promjene boje, što je prikazano na slici 11.13, kao i pedigre analiza transmisije ovog svojstva. Ni jedna kćerka od aficiranog oca (III. 1) nije naslijedila ovu anomaliju samo je naslijedio sin, a kada je majka heterozigotna (IV.3), ona prenosi ovu anomaliju polovini sinova i polovini kćerki. Dominantne osobine vezane za X hromosom ispoljavaju se u heterozigotnih žena kao i u muškaraca koji nose dominantni gen na X spolnom hromosomu.

Slika 11.13 (a) Osoba sa X-vezanom dominantnom anomalijom zubne gleđi i promjenom boje. (b) Pedigre ilustrira transmisiju ove anomalije.



b) Pedigre Generacija:



Budući da žene imaju dupli X hromosom u odnosu na muškarce, X vezana dominantna svojstva su češća nego kod muškaraca, jer se ispoljavaju i u homozigotitetu (XX) i u heterozigotitetu (Xx). Za rijetka dominantna svojstva vezana za X hromosom žene su najčešće heterozigotne. Ove žene prenose dato svojstvo polovini potomaka bez obzira na njihov spol. Kao u procesu nasljeđivanja X vezanih recesivnih svojstava, muškarac koji ima x vezano dominantno svojstvo prenosi allele svojim kćerima, ali ne i svojim sinovima. Kao rezultat vidimo unakrsno nasljeđivanje (otac-kćerke) svojstava.

Još dva primjera dominantnih anomalija vezanih za X spolni hromosom jesu rahitis rezistentan na D-vitamin i Xq krvna grupa. U prvom slučaju neke osobe koje boluju od rahitisa pružaju otpornost na uobičajene količine D-vitamina. Dominantni

oblik rahitisa rezistentnog na D-vitamin zahvata i muškarce i žene. Gen koji determiniše ovu rezistenciju nalazi se na X spolnom hromosomu.

Osobe koje imaju Xq krvni faktor, čija krv reaguje sa specifičnim antiserumom, kaže se da su Xq (a+). Osobe koje ne reaguju sa specifičnim antiserumom smatraju se Xq (a-). Svojstvo Xq (a+) je dominantno u odnosu na Xq (a-), pa su heterozigotne žene uvijek Xq (a+). Gen za Xq krvni faktor nalazi se na X spolnom hromosomu muškarca. Oko 90% žena je Xq (a+), te oko 60% muškaraca.

Nasljeđivanje vezano za Y-hromosom PROČITO
(holandrično nasljeđivanje)

U holandričnom dijelu Y-hromosoma (dio koji nema svoj homologni segment na X hromosomu) nalaze se geni za različite osobine koje muškarac prenosi na svoje sinove, ali ne i na kćerke. Svojstva koja se javljaju kao posljedica mutiranih gena na Y hromosomu, a nemaju svoje allele na X hromosomu nazivaju se Y vezana ili holandrična svojstva. Ovako svojstvo se lako prepoznaje, jer se ispoljava samo kod muškaraca. Dokazano je da se u holandričnom dijelu Y hromosoma nalazi specifičan antigen histokompatibilnosti (H-Y antigen) i ispoljava se kao holandrična karakteristika. H-Y antigen je evolucijski konzerviran i ispoljava se u najranijem stadijumu embrionalnog razvoja. Funkciju organizatora muških spolnih žlijezda ima upravo ovaj antigen koji je, inače, produkt gena u holandričnom dijelu Y hromosoma. Jedan od specifičnih tipova Y vezanog nasljeđivanja je nasljeđivanje maljavosti uha ili maljavost grudi (pinnae), svojstva u kojih su čekinjaste malje atipično duge, rasute po jednom ili oba uha (sl. 11.14). Ova svojstva se nasljeđuju od oca na sina što se može prikazati pedigre analizom. Y vezano svojstvo je i bilateralna radio ulnarna synostosis, tj. srasle kosti radijusa i ulne ili u holandričnom dijelu Y hromosoma se nalazi gen za jednu anomaliju kože ichtiozis vulgaris (ispucala kože u obliku krljušti). U homozigotnom dijelu Y hromosoma (dio koji ima homologne allele na X hromosomu) nalaze se geni koji uslovljavaju potpuno sljepilo za boje, pigmentnu kserodermu, pigmentni retinitis, vučije čeljusti, zečije usne i druge anomalije i svojstva. Nasljeđuju se na autosomalni način, jer ovi geni imaju svoje dominantne ili recesivne allele u homozigotnom dijelu X hromosoma. Ovi geni se nazivaju pseudoautosomalni geni.



Slika 11.14. Individue sa maljavim ušima (svojstvo vezano za Y-hromosom)

NASLJEDIVANJE OGRANIČENO SPOLOM PROČITO

Neki autosomalni geni koji kontroliraju važne fiziološke funkcije u organizmu dolaze do izražaja samo kod jednog spola. U ovom slučaju govori se o ograničenosti na spol (sex limitation). Tako, naprimjer, mlječnost kod sisara je ograničena samo na jedinke ženskog spola. Međutim, neki autosomalni geni se češće ispoljavaju kod jednog u odnosu na drugi spol. Naime, postoje genski alleli na čiju ekspresivnost može znatno da utiče spol. Smatra se da ćelavost nastaje kao rezultat dominantne mutacije jednog od autosomalnih gena i da je ekspresivnost ovog gena ograničena spolom. Uticaj spola vjerovatno se ostvaruje posredstvom muških spolnih hormona. Još je Hipokrat među prvima zapazio da "evnusi" niti pate od pedagre niti ćelave, čak i kada imaju odgovarajući genotip, sve dok se ne tretiraju adekvatnim hormonima.

EKSTRANUKLEARNO NASLJEDIVANJE

Poznato je da se nasljedna materija DNA prenosi na tačno utvrđen način. Način prenosa DNA ovisi o ponašanju hromosoma u procesima mitoze i mejoze. Fenotipske karakteristike organizama se i mijenjaju pod dejstvom hromosomskih gena uz učešće faktora sredine. Međutim, otkrivene su fenotipske karakteristike koje se ne mogu objasniti hromosomskim nasljeđivanjem već se mogu pripisati djelovanju nekih faktora u citoplazmi. Neke nasljedne osobine mogu se pripisati djelovanju genotipa majke neovisno o genotipu potomstva. Druge pak, osobine mogu se pripisati djelovanju infektivnih čestica koje su građene od DNA, ili ima osobina koje su uvjetovane djelovanjem DNA koja se nalazi u organelima u citoplazmi ćelije, kao što su hloroplasti i mitohondriji.

Mitohondrijalno nasljeđivanje

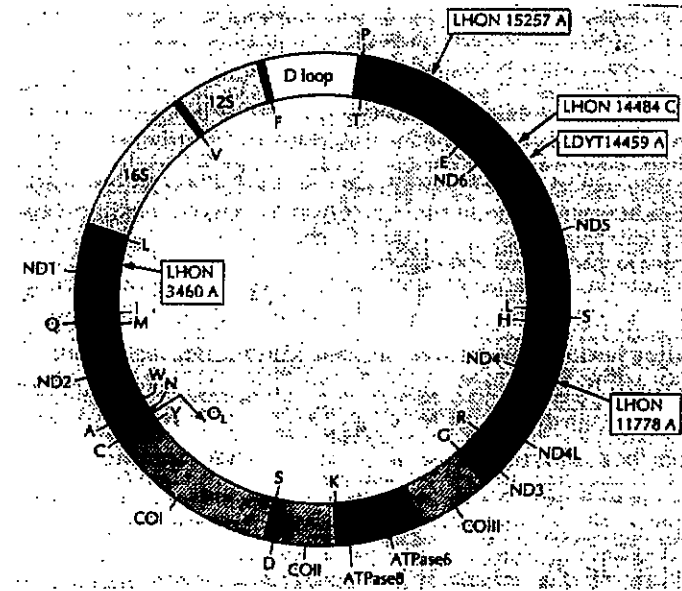
DNA replikacija i dioba mitohondrija odvija se van diobe i replikacije u nukleusu. DNA ovog organela uglavnom je cirkulatornog oblika. Svaka organela ima više kopija ove DNA i njena DNA više je slična prokariotskoj nego nukleolarnoj DNA u eukariotskim ćelijama. Replikacija mtDNA je nezavisna od nukleolarne DNA i odvija se, također, pod kontrolom enzima polimeraze. Promjene mtDNA, tj. različite mutacije, imaju za posljedicu najčešće različite neuromuskularne bolesti. Najviše su zahvaćeni organi i sistemi koji najviše ovise o energiji mitohondrija, a to je prvenstveno centralni nervni sistem, zatim skeletni mišići, srce, bubrezi i jetra. Bolesti se nasljeđuju preko citoplazme. Prenose ih majke, a oboljevaju i muška i ženska djeca. Nikada ne oboljevaju potomci bolesnih muškaraca. Budući

da se u procesu oplodnje citoplazma spermija gubi i samo glava spermija ulazi u jajnu ćeliju, to je mitohondrijsko ili citoplazmatsko nasljeđivanje isključivo materinskog porijekla. Jedna od mitohondrijalnih bolesti je Leberova optička atrofija, posljedica mutacija mitohondrijalnih gena (sl. 11.15), rezultira sljepilom zbog degeneracije optičkog nerva. Javlja se između 15 i 35 godine života. Kod muškaraca sugerise da se radi o X vezanoj bolesti, međutim, to nije slučaj, jer se radi o materinskoj transmisiji. Kod bolesnika redukuje se i proces oksidativne fosforilacije i uopšte količina ATP-a. Molekularna dijagnoza bolesti se uspostavlja nakon DNA analize mitohondrija i nakon pedigre analize.

GENOM MITOHONDRIJA

Bolest mitohondrija: Leberova nasljedna optička neuropatija (LHON)

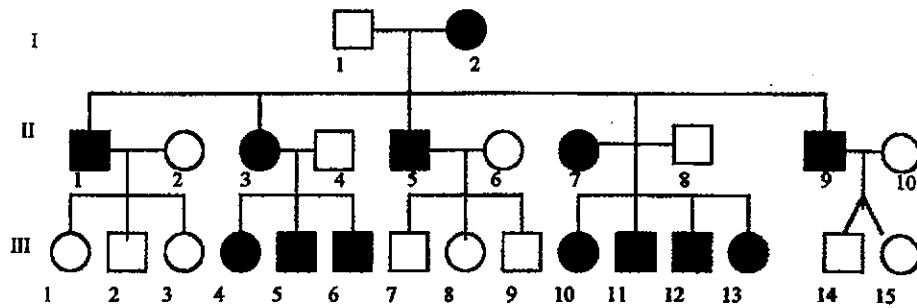
LHON mutacije u mitohondrijalnoj DNA



- | | |
|---|--|
| ■ Genski kompleks I (NADH dehidrogenaza) | ■ Genski kompleks IV (citohrom c oksidaza) |
| ■ Genski kompleks II (citohrom c oksidoreduktaza) | ■ Genski kompleks V (ATP sinteza) |
| ■ Ribosomalni RNA geni | ■ Transportna RNA geni |

LHON mutacije mitohondrijalne DNA

Zajedno sve četiri mutacije (LHON) obuhvataju oko 80% LHON slučajeva. Peta mutacija (sa oko 14459p.b.) ispoljena u kompleksu IV i može uzrokovati jednu ili drugu bolest LHON ili muskularnu distrofiju. (Prema Brown, M.D. et al. 1992.)



Slika 11.15 Pedigre pokazuje karakterističan način transmisije mitohondrijalnog mutiranog gena. Majka prenosi gen u potomstvo. Otac ne prenosi mitohondrijalne gene, jer spermiji ne donose mitohondrije u oplodeno jaje.

Materinski efekti u citoplazmatskom nasljeđivanju

Poseban fenomen u citoplazmatskom nasljeđivanju je materinski efekat. Ovaj fenomen je definisan kao predeterminacija kontrolnog gena u materinskom genotipu, još prije oplodnje jajne ćelije. Materinski efekat je, dakle, nasljedno svojstvo kontrolisano materinskim nuklearnim genotipom, prije oplodnje. Koliki je efekat majčinog učinka na citoplazmatsko nasljeđivanje, najbolje ilustruje primjer u slučaju ukrštanja ličinki divljeg tipa jedne vrste moljca *Ephestia kuhniella*. Tamnu pigmentaciju determiniše dominantni gen AA, naime ovaj gen determiniše sintezu supstance slične hormonu (kinurenin). Recesivni allele (aa) onemogućava sintezu kinurenina, pa je boja hitina nešto svjetlija kod ovih ličinki, a oči su crvenkaste boje. Iz ukrštanja pigmentiranih i nepigmentiranih moljaca (AA x aa) proizlazi F1 generacija koja je pigmentirana bez obzira na to koji je od roditelja bio AA (homozigot dominantan). Međutim, kada se s heterozigotnim F1 potomstvom izvede povratno ukrštanje, genotip ženske djeluje na fenotip F2 generacije. Ako se povratno ukrštaju mužjaci A/a sa ženka a/a, polovina ličinki je pigmentirana. Kada se povratno ukrštaju ženke A/a s mužjacima a/a, sve su ličinke pigmentirane. Ako je pigmentirana ženka genotipa A/a ona taj fenotip prenosi na sve svoje potomke, bez obzira na njihov genotip. U citoplazmi njezinih jajnih ćelija pri oogenezi sintetizira se kinurenin u dovoljnoj količini, tako da su potomci koji imaju genotip a/a pigmentirani iako sami ne posjeduju genetsku informaciju za sintezu tog pigmenta. Međutim, razvitkom jedinki pigment se sve više razrjeđuje, zato boja ličinki postepeno blijedi, pa odrasli leptiri nemaju više smeđeg očnog pigmenta. Ako je u povratnom ukrštanju pigmentirani mužjak, u potomstvu je cijepanje u odnosu 1:1 za svojstvo pigmentacije. Prema tome, kinurenin se ne prenosi preko spermija.

A/A x a/a

F A/a - pigmentirano potomstvo

a) A/a x a/a
mužjak ženka

F A/a, A/a, a/a, a/a - 50% pigmentirano potomstvo

b) A/a x a/a
ženka mužjak

F A/a, A/a, a/a, a/a - 100% pigmentirano potomstvo

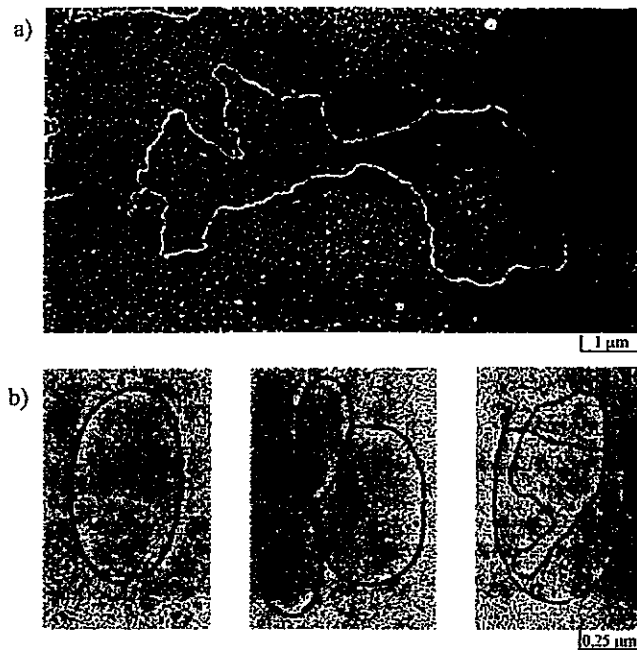
Primjer majčinog učinka može se objasniti činjenicom da jaje sa svojom velikom količinom citoplazme sadrži produkte aktivnosti majčinog genotipa koji, opet, djeluje na fenotip potomstva neovisno o njihovom genotipu. To djelovanje može biti prolazno ili trajno.

Nasljeđivanje infekcijom

Suprotno od majčinog učinka koji u osnovi ipak ovisi o djelovanju gena (majčinih), postoje oblici nasljeđivanja koji se smatraju posljedicom djelovanja citoplazmatskih čestica. Takve čestice imaju sposobnost autoreprodukcije i prenose se iz jedne generacije u drugu neovisno o nasljeđivanju gena jedra i citoplazmatskih nasljednih faktora. Otkrivene su čestice koje se mogu integrisati (ugraditi) u hromosom ćelije i ponašati se kao njegov dio, a mogu postojati i odvojeno od hromosoma ćelije i dijeliti se nezavisno od DNA ćelije. Takve DNA molekule poznate su kao *plazmidi*, *episomi* ili *faktori fertilitnosti*.

Plazmidi

Jedna grupa plazmida je poznata kao episomi ili faktori fertilitnosti i imaju funkciju u procesu reprodukcije bakterija (konjugacija) ili imaju funkciju vektora u procesu kloniranja gena. Druga grupa plazmida ima medicinski značaj. Među najveće grupe spadaju R plazmidi (rezistencije transfer fakt RTF). R plazmidi predstavljaju dodatne zaštitne mehanizme reprodukcije bakterija (donor-davaoca), a s druge strane, čovjek je širokom upotrebom antibiotika selektivno povećavao R plazmide. R plazmidi nose gene čiji produkti inaktiviraju određeni antibiotik ili sprečavaju da on uopšte uđe u ćeliju (sl. 11.16)



Slika 11.16 a) Elektronska mikrofografija plazmida poznatog kao R6, sadrži gene za rezistenciju za šest različitih lijekova, obuhvatajući antibiotike tetraciklin, neomicin i streptomycin. b) Elektronska mikrofografija plazmida *E. coli* u replikaciji, također, sadrži gene rezistentne na neke antibiotike kao, ampicilin i druge. (Iz Barnes, C. 1992.)

PRIONI

Prioni su najmanje infektivne čestice koje se po svojim osobinama razlikuju od dosad poznatih patogenih bakterija i virusa. Veoma su otporni na sterilizaciju i dezinfekciju. Normalni ćelijski prionski proteini PrP^{sc} nalaze na ćelijskoj površini gdje mogu imati ulogu u transmembranskoj signalizaciji, vezivanju liganda, ćelijskoj adheziji i prepoznavanju. Ukoliko se jave greške u svijanju proteina, pri uspostavljanju konformacije protein ne može vršiti svoju funkciju.

Pogrešno svijanje prionskih proteina uzrokuje degenerativne bolesti mozga sisara, nazvane spongiformne encefalopatije. To su zloćudni prionski proteini forme PrP koji se označavaju sa PrP^{Sc}.

Struktura priona ✕

Gen koji determiniše sintezu prionskog proteina (PrP) je građen od jednog egzona. On kodira prionski protein koji je sastavljen od oko 250 amino kiselina. Dokazano je da se najvažniji segment ovog proteina koji je odgovoran za nastajanje prionske bolesti nalazi u području od 106-126 kodona. Analiza sekundarne strukture je pokazala da kod normalnog prionskog proteina uglavnom preovladava alfa-heliks struktura (43%).

Prioni su, dakle, čestice sitnije od virusa za koje sa čak ne bi moglo sa sigurnošću tvrditi da su živi mikroorganizmi, budući da ne sadržavaju genetski materijal (DNA i RNA) već su jednostavno građeni od veoma otpornih materija.

Prioni u zaraženoj životinji ili čovjeku imaju razornu moć. Prouzrokuju, kako smo prethodno naveli, prenosnu spongiformnu encefalopatiju, odnosno bolest u kojoj, slikovito rečeno, moždano tkivo postaje konstituenta membrane.

Ispitivanja su pokazala da postoje dvije forme ovog proteina: jedan je normalni stečeni prionski protein, koji ima sasvim određenu i korisnu funkciju u organizmu i označava se kao PrP^c i drugi oblik zloćudni prion koji se od normalnog priona razlikuje po svojoj konfiguraciji; taj prion je zarazan i označava se sa PrP^{Sc}. Danas se sa velikom sigurnošću smatra da se zloćudni prion PrP^{Sc}, kad infekcijom dospije u ćeliju, veže sa normalnim prionom PrP^c zbog čega ovaj posljedni mijenja svoju konfiguraciju u konfiguraciju PrP^{Sc}, tako da nastaje još jedna zloćudna molekula. Na taj se način zloćudni prion u zaraženoj ćeliji umnožava. Prioni su veoma slični nekim bjelančevinama unutar moždanog tkiva tako da se mogu udruživati u zajedničke nakupine i na taj način mijenjati oblik zdrave bjelančevine, što prouzrokuje bolest.

Sinteza (replikacija) normalnog i patološkog prionskog proteina ✕

Humani PrP gen je lociran na kratkom kraku hromosoma 20. Jedan egzon na ovom genu smješten je na udaljenosti 10kb, povezan sa dva egzona koja se nalaze na udaljenosti od oko 10 kb uzvodno. Većina prionskog proteina se sintetiše u neuronima. Replikacija prionske partikule odvija se gotovo na identičan način kao i duplikacija virusa. Mehanizam replikacije uključuje sintezu polipeptida u odsustvu nukleokiselinske šifre i posttranslacionih modifikacija ćelijskog proteina. Postoji više modela za replikaciju priona. Jedan od modela predložili su Prusiner i saradnici koji je nazvan "heterodimerni model". Formira se kompleks PrP^c i PrP^{Sc} u kojem se PrP^c transformira u patološki PrP^{Sc} jednakim enzimskim mehanizmom koji inicira njegovo sopstveno stvaranje. Stvaraju se jednake količine oba proteina, s tim što je više favorizovana patološka forma (PrP^{Sc}).

Drugi mehanizam predložili su Lansbury i saradnici u kojem je fibrilarna formacija vezana za aktin ili beta-amiloid, po čemu je dobila naziv "linearni kristali" - infektivna generacija koja se brzo širi. Monomerni PrPc je u bržem ekvilibrijumu sa konformacijom sličnom PrPsc-u koja ga prevodi u favorizovano stanje, a to je PrPsc. Molekule PrPsc mogu formirati agregate sa smanjenjem koncentracije molekula ovog proteina. Kada je formiran nukleus, rast agregata je brži nego disocijacija, tako da se za kratko vrijeme formiraju ogromni agregati.

Postoji više vrsta mutacija PrPc. Prvo su otkrivene mutacije zamjene u pojedinačnim kodonima, a kasnije i insercije oktapeptidnih ponovaka. Ukupno je do sada pronađeno više "point" mutacija i to na kodonima 102, 105, 117, 145, 178 itd. Mutacije na 102 kodonu ovoga gena dovode do neurodegradacija koje su glavni poremećaj ovih bolesti. Prusiner (1995. godine) je identifikovao 15 amino kiselina na jednom kraju PrPc proteina. Otkrio je da je u ovom slučaju amino kiselina leucin supstituirana sa prolinom. Ova zamjena predstavlja najčešći tip mutacije. Ova mutacija ne kodira kopije oktapeda koje se ponavljaju na 5 prim kraju. Mutacije dovode do promjene normalnih proteina (PrPc) u patološki oblik (PrPsc), a posljedica je niz bolesti. Prioni se mogu reprodukovati, nagomilavati i izazivati bolesti ne koristeći se nikakvom vrstom genetskog materijala, za razliku od virusa, bakterija i parazita. Sve ove bolesti su vrlo rijetke. Najčešće obolijevaju ljudi starije dobi. U nekim slučajevima period inkubacije može biti duži od 40 godina.

U novije vrijeme otkriven je u krvnom serumu miša, ali i čovjeka, jedan sastojak koji na sebe lako veže zloćudni prionski protein (PrPsc). Ono što je bitno jeste da ne veže dobroćudni prion PrPc. Taj sastojak krvi jeste plazminogen (jedan euglobulin). To je prvi put da je nađena supstancija koja "razlikuje" dobroćudni prion od zloćudnog priona.

VANHROMOSOMSKE MUTACIJE

Veoma često dolazi do promjena u fenotipu kod pojedinih organizama pod dejstvom spoljašnjih faktora usljed promjena izazvanih u vanhromosomskom sistemu. Ove promjene se mogu ispoljiti na više načina, podsjećaju na mutacije, a ne nasljeđuju se, nazivaju se fenokopije. Naziv "fenokopija" prvi je uveo R. Goldschmidt (1955.) za varijante fenotipova koje je izazvao kod *D. melanogaster* izlažući njihove larve u toku razvika različitim temperaturama.

Fenokopije se ispoljavaju samo u toku životnog doba individue kada je izvršeno djelovanje odgovarajućih faktora sredine dok je njihovo potomstvo, ako prestane djelovanje pomenutih faktora, fenotipski normalno. Npr. kod ljudi oboljelih od šećerne bolesti mogu se uzeti kao fenokopije u odnosu na zdrave osobe, pa im se mora davati inzulin da bi se spriječilo ispoljavanje bolesti. Inzulin, naravno ne mijenja genotip dijabetičara već ima fenotipsko dejstvo. Mada se danas zna da nasljedni faktori imaju značajnu ulogu u nastanku šećerne bolesti i određeni faktori sredine mogu da dovedu do oboljenja genotipski zdravih osoba.

Produžene modifikacije su promjene fenotipa izazvane djelovanjem spoljašnje sredine, nasljeđuju se i po prestanku djelovanja faktora, ali se u manjem stepenu izražavaju u narednih nekoliko generacija. Uglavnom se prenose materinski, što ukazuje na citoplazmatsko porijeklo. Postepeni nestanak izazvanih fenotipskih promjena može se pripisati ili povratnim mutacijama koje mogu ponovo da uspostave normalnu strukturu u odgovarajućim citoplazmatskim elementima, ili se desi kumulativna pozitivna selekcija za vanhromosomske faktore koji nisu pretrpjeli izmjenu pod dejstvom odgovarajućeg faktor.

Vanhromosomske mutacije predstavljaju takve promjene u fenotipu koje ne samo da su nasljedne već se ne mogu u prvobitnom smislu izmijeniti za makoliko određeni broj generacija. I ove mutacije, kao i promjene na hromosomima, mogu da nastanu usljed gubitka-delecija, duplikacije materijala, pri čemu to može da bude DNA plazmida ili mitohondrija, iRNA mitohondrija ili iRNA citoplazme koja se nalazi van organela. Za mnoge se može utvrditi broj genskih lokusa koji je zahvatila vanhromosomska mutacija.

KARAKTERISTIKE

EKSTRANUKLEARNOG NASLJEĐIVANJA

Nasljeđivanje gena lociranih u organelama bitno se razlikuje od modela nasljeđivanja nuklearnih gena, označeno je kao nemendelijansko nasljeđivanje.

Zapravo, kriterij za utvrđivanje fenotipa je rezultat ektranuklearnih gena, a ne rezultat pravila ukrštanja nuklearnih gena. Razlike u nasljeđivanju se sljedeće:

1. U viših eukariota rezultati recipročnog ukrštanja obuhvataju ektranuklearne gene, a ne nuklearne gene koje zahvata recipročno ukrštanje. Ektranuklearni geni obično se ispoljavaju fenomenom unilateralnog nasljeđivanja od generacije do generacije. Svi potomci (mužjaci i ženke) imaju fenotipove samo jednog roditelja. Za većinu eukariotskih vrsta je karakteristično maternalno nasljeđivanje kada se isključivo ispoljava materinski fenotip. Naziv maternalno nasljeđivanje je zbog velike količine citoplazme u jajnim ćelijama koja je znatno veća u odnosu na muške gamete, spermije. Prije svega, zigot prima više citoplazme (u kojoj se nalaze ektranuklearni geni, npr. u mitohondrijima) od ženskog roditelja i zanemarljivu količinu od muškog roditelja.
2. Nisu nađeni tipični Mendelovi odnosi u F2 potomstvu 3:1. Princip segregacije nije karakteristika ektranuklearnih gena, jer uniparentalno nasljeđivanje roditeljskih karakteristika determinisanih ektranuklearnim genima, pokazuju jasno odstupanje od Mendelovog principa segregacije.
3. Ektranuklearno nasljeđivanje je potpuno neovisno o nuklearnom nasljeđu. Fenotipske karakteristike perzistiraju i nakon što se odstrani nukleus ili se vrati u ćeliju.
4. Ektranuklearni geni ne mogu se mapirati kao nuklearni geni.

LITERATURA*Ključne reference:*

- Barnes, C.: Biology of organisms.1989.*
Cooper, G.M.: The Cell. Boston Univerzity, 2000.
Kraus, D.: Concepts Modern Biology. Globe book company, 1993.
Levine.A.J.: The cellular gatekeeper for growth and division. Cell, 1997.
Lewis R.: Human Genetics.1999.
Russel, P.: Genetics. 1998.
- Bayer, A.W.S. University, Oregon.2000.*
Beans, H.W. American.Sientist.1976 Elledge, S.J. and Winston, J.: The role of cyclin-kinase inhibitors in developoment and tumori genesis. Trands Cell Biol.1996.
Fraser, Roberts, I.A.and Pembrey, M.: An Intraduction to Medical Genetics, Oxford, 1985.Gilbert, S.F.: Developmental Biology. Sinaure Associates.2001.
Hartwell, L.H.and Weiner, T.A.: Checkpoint: controls that ensure the order of cell cycle Evants. Science, 1989.
Hirschfielde, A.N.: Int.Rev.Cytol.1998.
Jungueria L.C., Carneiro J., Kelley R.O.: Basic histology., Lange Medical Books, 2003.
Kleckner, N: Meiosis. Acad.Sci.USA, 1996.
Keeton, W.T. and Could, J.L.: Biological Science, 1986.
King, R.W.Jackson, P.K. and Kirschner, M.W.: Mitosis in transition.Cell, 1994.
Kaspland, D and Strunikov, A.: Mitotic chromosome condensation.Science, 1974.
McIntosch, J.R. and Herting, G.E.: Spindel fiber action and chromosome movement. Cell.Biol.1991.
Murray, A and Hunt. The Cell Cycle. 1993.
Morgan, D.O.: Cyclin - dependent kinases, Cell dev.Biolog.1997.
Morrison, S.J., White, P.M., Zock, C. and Anderson, D.J.: Regulatory mehchanisms in stem cell biology. Cell, 1999.
Pantić, R.V.: Biologija ćelije.1997.
Petrović D.: Normalni razvoj človeškega zarodka. Medicinski razgledi, Ljubljana 2003.
Potter, H.and Dressler, D.: Acad.Sci.1976.
Rieder, C.L. and Salamon, E.D.: The vertebrate cell kinetochore and roles during mitosis. Science, 1998.
Shinohara, A.and Ogava, A.: Trends Biochem.Sci.1995.
Thomson, J.A.J. et al.: Embrionic stem cell lines derived from human blastocysts. 1998.
Wilrad, H.F.: Centromere of mammalian chromosomes. Genetiks.1990.

IV*Humana genetika*

12 Organizacija humanog genoma

13 Humani hromosomi, genetski savjet i prenatalna dijagnostika

14 Genska terapija

15 Genetska determinacija imunoloških svojstava

16 Genetika tumora

Genom podrazumijeva cjelokupni genetski materijal jednog organizma ili genom jedne ćelije je sveukupna DNA jedne ćelije bez obzira na funkciju, gradnju i aktivnost ćelije. Eukariotske ćelije imaju većinu genoma smještenu u nukleusu zaštićenu jedrovom membranom od citoplazme i mali dio u citoplazmi (mitohondrijska DNA i plazmitska DNA). Ljudski genom se sastoji od DNA koja je različito, neujednačeno organizirana. Posjeduje multiple slične i gotovo identične sekvence koje se ponavljaju i, također, velike blokove DNA koji ne kodiraju proteine, kao i blokove DNA koji se ne ponavljaju, to su protein kodirajuća područja.

Ako se ukupna DNA neke ćelije denaturira tj. razdvoji dvolančana DNA na 65 °C, nakon izvjesnog vremena lanci će se ponovo spajati. Jedan dio ukupne DNA odmah nađe komplementarni lanac i vrijeme reasocijacije ovog dijela genoma je vrlo kratko. Ovakva DNA se uglavnom nalazi u mnoštvu identičnih kopija. Procjenjuje se da se oko 60% DNA fragmenata reasocira. Ukupna DNA u genomu u odnosu na prosječnu učestalost nukleotida se dijeli na: repetitivne sekvence DNA i nerepetitivne sekvence DNA. Repetitivne sekvence nukleotida koje imaju umjerenu učestalost ponavljanja nazivaju se intermedijelne sekvence DNA. Repetitivne sekvence sa visokom učestalošću ponavljanja, nazivaju se simpl sekvence ili visokorepetitivne sekvence DNA (Tabela 12.2).

Još jedno interesantno područje DNA je nazvano HOX gen područje. Ima važnu ulogu u rastu i razvoju i nikada ne zahvata protein nekodirajuće gene, odnosno integritet tog područja se nikada ne narušava. Postoji područje koje se nalazi oko protein kodirajućih gena, to je CpG područje - sastoji se od oko 30.000 baza, ali samo citozina i guanina. Važno je za regulaciju funkcije gena.

Intermedijelne sekvence DNA

Intermedijelne repetitivne sekvence se sporije reasociraju nego simpl sekvence DNA. Oko 40% multicelularnih organizama sadrži ovaj blok DNA. Ove sekvence su duge 150-300 p.b. i ponavljaju se u genomu do 105 primjeraka. Ponavljaju se u mnoštvu sličnih ili identičnih kopija u genomu. Ove kopije su

30%. Ovi su regioni vidljivi kao 10x tamniji, tj. gušći odnosno svjetliji, tj. rjeđi dio hromosoma. Takva je satelitska DNA ili telomerna DNA. Smatra se da imaju ulogu u održavanju strukture hromosoma, rekombinaciji, replikaciji, u kontroli genske ekspresije, kreiranju hromatinskih domena.

Nerepetitivna DNA

Blokovi koji se ne ponavljaju (protein kodirajuća područja) su geni gusto zbijeni, sporo se reasociraju nakon denaturacije lanaca DNA. Većina strukturnih aktivnih gena se nalazi u ovom bloku DNA izuzimajući gene za globine, histone kao i gene za rRNA i tRNA koji se nalaze u umjereno repetitivnom bloku DNA. U bloku nerepetitivne DNA geni se nalaze samo u jednoj kopiji u haploidnom genomu i oni zapravo čine *glavninu funkcionalnog genoma*. I za ovaj blok DNA karakteristično je prisustvo malih familija gena i velike količine prazne DNA.

SNP (Polimorfizmi pojedinačnih nukleotida)

Bilo koje dvije osobe su u 99,9% sekvenci DNA iste (jednojačani blizanci su izuzetak, sa 100% istim sekvencama u genomu, s obzirom na to da su genetski identični). Razlike u sekvencama DNA između individua nazivaju se genetske varijacije. Postoji više tipova genetski varijacija (polimorfizama) pri čemu neke od varijacija rezultiraju funkcionalnim promjenama. Prosječna variranja u genomu između dvije osobe su oko 0,05-0,1%. To je prosječno jedan na 1000 do jedan na 2000 nukleotida koji se razlikuju od osobe do osobe i najčešće se radi o polimorfizmu tipa SNP (Singl Nucleotide Polymorphisms). Postoje i drugi polimorfizmi poput insercije, delecije, duplikacije i rearnžiranja. Oni su vrlo rijetki i njihova distribucija je slabo poznata. Suština napretka genetike ljudi jeste ustvari razumijevanje učestalosti, tipova i distribucije ovih polimorfizama. Jer, tako će se, npr. SNP koji je široko rasprostranjen po genomu moći iskoristiti za procjenu eventualne osjetljivosti na lijekove ispitivane osobe ili za dodatna istraživanja sekvenci DNA služeći kao DNA marker. SNP nisu ravnomjerno distribuirani već su koncentrirani različito duž genoma. Neki predjeli genoma ne sadrže ni jedan SNP, dok drugi sadrže veliki broj SNP-ova. Tako ima malo varijacija na X hromosomu dok u regiji koja kodira HLA proteine je mnogo više. Zbog važnosti ovog tipa polimorfizama postavljeni su strogi kriteriji za proglašavanje neke sekvence genoma za varijabilnu tipa SNP-a. Više bliskih SNP-A na nekom hromosomu se nasljeđuje u bloku, a svi SNP-ovi u bloku čine cijelinu zvanu *haplotip*. Blokovi mogu sadržavati više SNP-a, ali je nekoliko dovoljno za jednoznačno identificiranje haplotipa. Pojam *HapMap* predstavlja mapu haplotipova, tj. blokova SNP-a kao i mapu SNP-ova koji jednoznačno identificiraju neki haplotip. SNP-ovi koji jednoznačno identificiraju neki haplotip se zovu ciljani/identifikacioni SNP. HapMap-e su

važne jer koristeći njih moguće je smanjiti broj SNP-ova koje je potrebno identifikovati kada se želi porediti fenotip sa genotipskim varijacijama. U genomu se nalazi oko 10 miliona SNP-a, a Hap/Mapama treba identifikovati samo 500.000. Primjer je proces skeniranja genoma kada se traga za vezom između gena i bolesti, reakcije na faktor okoline, reakcije na lijekove i vaccine itd. Koristeći se ovim ciljnim/identifikacionim SNP-ovima moguće je brzo pronaći regione hromosoma sa različitim haplotipovima među bolesnom i zdravom grupom ljudi. Potom se svaki taj region može detaljno ispitati kako bi se otkrio tip varijacije i zahvaćeni gen tog regiona povezao sa bolesnim stanjem. Ovakav pristup farmaceutskim kućama omogućava brži i precizniji način ispitivanja lijekova, kao i pojedinim pacijentima odabir najefikasnijih lijekova ukoliko su u grupi pojedinih genotipova. Genetska varijacija genotipski se ispoljava kao fiziološka pojava, npr. razlika u boji očiju ili krvnoj grupi. S druge strane, kao patološka pojava. Razlikuju se monogenske i poligenske varijacije. Npr. cistična fibroza je monogenska varijacija. Međutim, poligenske varijacije su složenije i zajedno sa faktorima sredine bitno utiču na nastanak: dijabetesa, kancera, Parkinsonove bolesti, depresije i dr. U okviru ovog projekta pitanje varijabilnosti se analizira iz četiri ugla: otkrivanja i tipizacije SNP-ova i ostalih formi genetskih varijacija unutar cijelog genoma, izgradnja genetskih i haplotipskih mapa visoke rezolucije, izgradnja naprednih statističkih metoda za poredenje genetskih varijacija sa fenotipom. Nakon svega, ipak, je zaključeno da je razlika između ljudske DNA porijeklom od više osoba mala u poredenju sa ogromnom sličnošću.

Tabela 12.2 Organizacija humane DNA

Protein- kodirajući geni (nerepetitivna DNA)

Umjereno repetitivna DNA

- Duplikacija i razilaženje gena
(funkcionalne familije gena i nefunkcionalni pseudogeni)
- Tandemi ponovljenih kodirajućih gena za
rRNA, 5SrRNA, tRNA i histone
- Mobilni genski elementi
(transposoni, viralni retrotransposoni).

Dugi rasuti elementi (LINES; neviralni retrotransposoni).

Kratki rasuti elementi (SINES; neviralni retrotransposoni)

Simpl-sekvence DNA ili visokorepetitivna DNA

Neklasificirani dijelovi DNA

Prema Lodisch.H.at ol.2001.

GENSKA
KARTE**KOLIČINA DNA U HUMANOM GENOMU**

Količina DNA je različita u različitim vrstama organizama. Organizmi na višem stepenu diferencijacije imaju veću količinu DNA u ćeliji. Ukupna količina DNA u haploidnom genomu je karakteristika svake vrste. Ukupna količina je uglavnom smještena u hromosomima nosiocima nasljedja. Kada bi se lanci svih humanih hromosoma povezali, dužina DNA lanca bi iznosila oko 2 m. U okviru projekta "ljudski genom" dešifrovano je i mapirano 31.000 hiljada gena na 23 para hromosoma. Procijenjeno je da hromosom može da sadržava oko 250 miliona pari baza, a da cijeli genom sadržava 3 milijarde pari baza ili 3×10^9 p.b. - 3×10^{12} (Tabela 12.3). Približno 1/3 genoma odgovara repetitivnim bazama (protein nekodirajući geni), pa je procijenjeno da je znatno manja količina DNA sa funkcionalnim genima. Ovi podaci navode na zaključak da je ljudski genom veći 200 puta od genoma kvasca ali istovremeno 200 puta manji od genoma amebe. Interesantno je da u crva repetitivne sekvence (nekodirajuće) zauzimaju 7%, a u miša 3%. Znači, čovjek ima 31.000 genetski aktivnih gena, odnosno samo dva puta više nego crvi ili mušice.

Postavlja se pitanje kako da se objasni kompleksnost sa tako malo kodirajućih gena. Po novim saznanjima u ljudskom genomu jedan gen predstavlja osnov za sintezu više različitih proteina, dok je kod pomenutih životinja osnov za samo jedan protein. Naime, koristi se procesom poznatim kao "alternativno spajanje" u kojem različiti dijelovi proteina mogu po potrebi biti sastavljeni u cjelinu, a da ih pritom kodira više gena. To je moguće u ljudskom genomu jer protein kodirajući geni nisu fizičke cjeline nego funkcionalne cjeline koje su rasute u više regiona DNA ljudskog genoma. Na taj način svaki protein kodirajući gen kodira dijelove za više proteina. Procijenjeno je da protein kodirajući geni u ljudi kodiraju prosječno po tri proteina. Pored pomenutog u *proteumu* (svi proteini čovjeka) postoje i nove grupe proteina npr. Ig proteini ili keratin koji su odsutni u mušici ili kvascu.

Tabela 12.3 Broj gena u ćelijskom genomu

Organizam	Genom veličina (Mb) ^a	Protein-kodirajuće sekvence (procenat) ^b	Broj gena
<i>E.coli</i>	4,6	90	4.288
<i>S.cerevisiae</i>	12	70	5.885
<i>C.elegans</i>	97	25	19.099
<i>Drosophila</i>	180	13	13.600
Čovjek	3.000	3	100.000

^aMb = milion parova baza

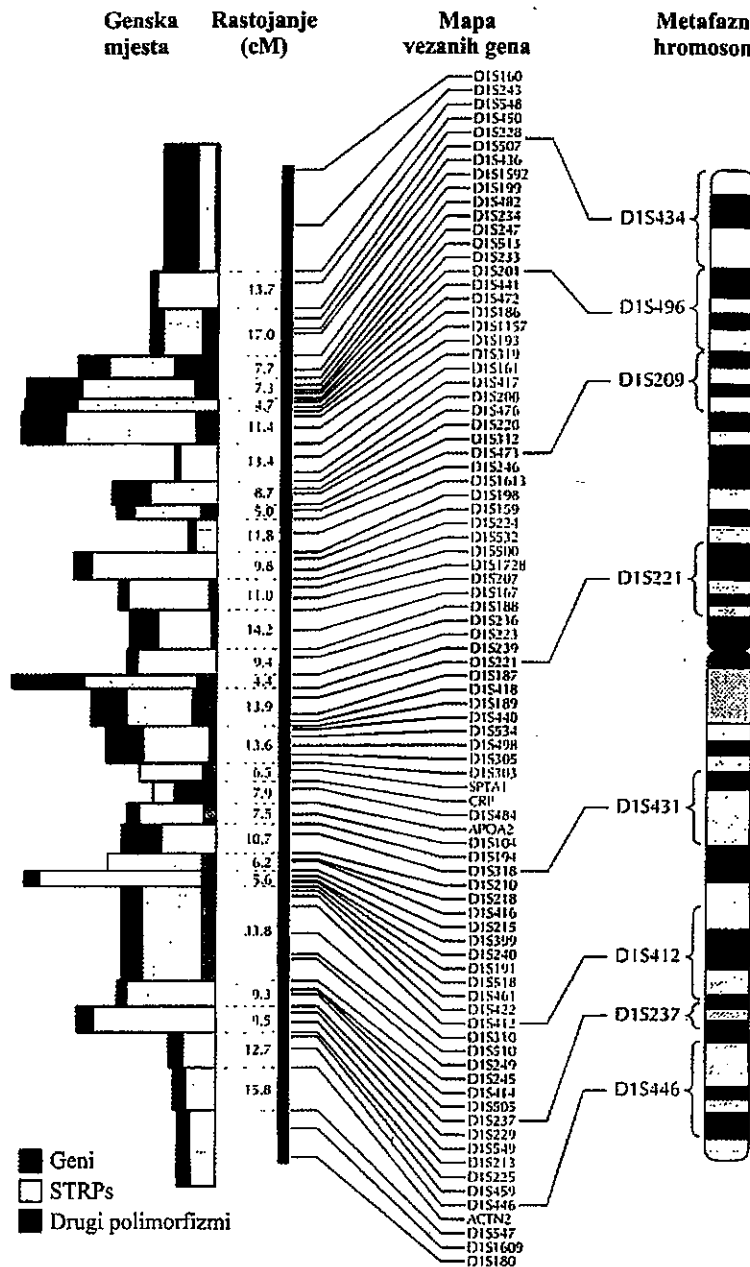
Odreden kod *E.coli*, *S.cerevisiae*, *C.elegans*, i *Drosophila* sekvence genoma i procijenjene za humani genom

TEHNIKE MAPIRANJA HUMANIH GENA

Postoji jak razloga za mapiranje gena humanih hromosoma. Na prvom mjestu, informacije koje daje mapiranje gena upotrebljavaju se u humanoj citogenetici kao način da se odredi tačno mjesto promjena i preraspodjele genetskog materijala što je uzrok mnogim nasljednim bolestima. Mapiranje vezanih gena počelo je početkom prošlog vijeka kada je američki genetičar Thomas Hunt Morgan konstruisao prvu hromosomsku kartu *Drosophile melanogaster*. Odredio je lokuse velikog broja gena na hromosomima koristeći se rezultatima multiplog i mitotičkog krossingovera. Prema učestalosti krossingovera bilo je moguće poredati gene u seriju i time odrediti njihov položaj za grupu od najmanje tri gena. Kako gen zauzima tačno određeno mjesto u toj grupi, ta okolnost omogućava izučavanje topografije gena na hromosomu i njeno predstavljanje u vidu geneske karte. Kao markere za konstruisanje genske mape koristio se mutiranim genima. Npr. kod *Drozofile* ustanovio je oko 500 mutacija. Rastojanje među genima mjerio je jedinicama morganidama (po autoru). Jedan procenat rekombinacija označava jednu morganidu.

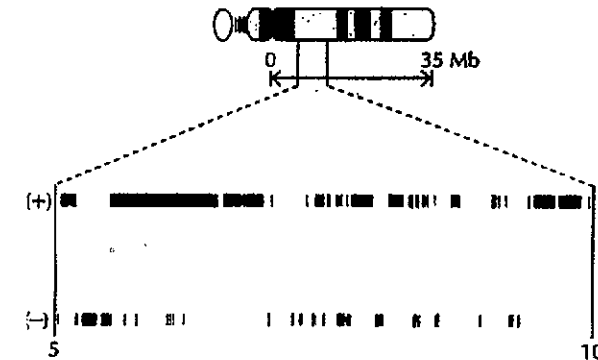
Mendelovi eksperimenti i genske mape predstavljaju osnovu za savremene tehnologije mapiranja gena. Danas je genska mapa *Drozophile* potpuna i definitivno konstruisana kao i mnogi drugih prokariota i eukariota.

Prvi gen lociran u humanom hromosomu je početkom prošlog vijeka kada se utvrdilo da je sljepoća za boje X spolno vezana bolest, a prvi gen vezan za autosomalne hromosome 1968. godine. Za mapiranje gena i sekvenciranje nukleotida DNA u okviru projekta "ljudski genom" korištene su dvije grupe visokosofisticiranih tehnika. Tim tehnikama dobivene su dvije vrste mapa: mapa vezanih gena na hromosomima koja pokazuje međusobni odnos pojedinih gena duž hromosoma (sl. 12.2) i preciznija mapa, tj. fizička mapa koja prikazuje specifičan položaj svakog gena duž hromosoma i međusobnu udaljenost gena u hromosomu dopunjenu mapom sekvenci iz koje se može vidjeti i tačan redoslijed baza nukleotida u tim genima, odnosno DNA. Na fizičkoj mapi hromosoma koja je integrisana sa genetskom mapom danas je pozicionirano 31.000 humanih gena: obuhvata stotine hiljada lokusa i informacije o bilionima p.b. DNA sekvenci. Obje tehnike mapiranja upotrebljavaju markere u DNA sekvenciranju, detektabilne fizičke ili molekularne karakteristike koje se razlikuju među osobama i koje se prenose iz generacije u generaciju. Prvi sekvencirani humani hromosom je 22 (sl. 12.3). Danas je u potpunosti sekvenciran i određeni su lokusi za brojna svojstva kao: lokus 22p12 za ribosomsku DNA, lokus 22pter-22q11 za sindrom mačijeg oka, lokus 22q1 Di Georgov sindrom, ili sekvenca za RNA, sekvence za hroničnu mileoidnu leukemiju itd.



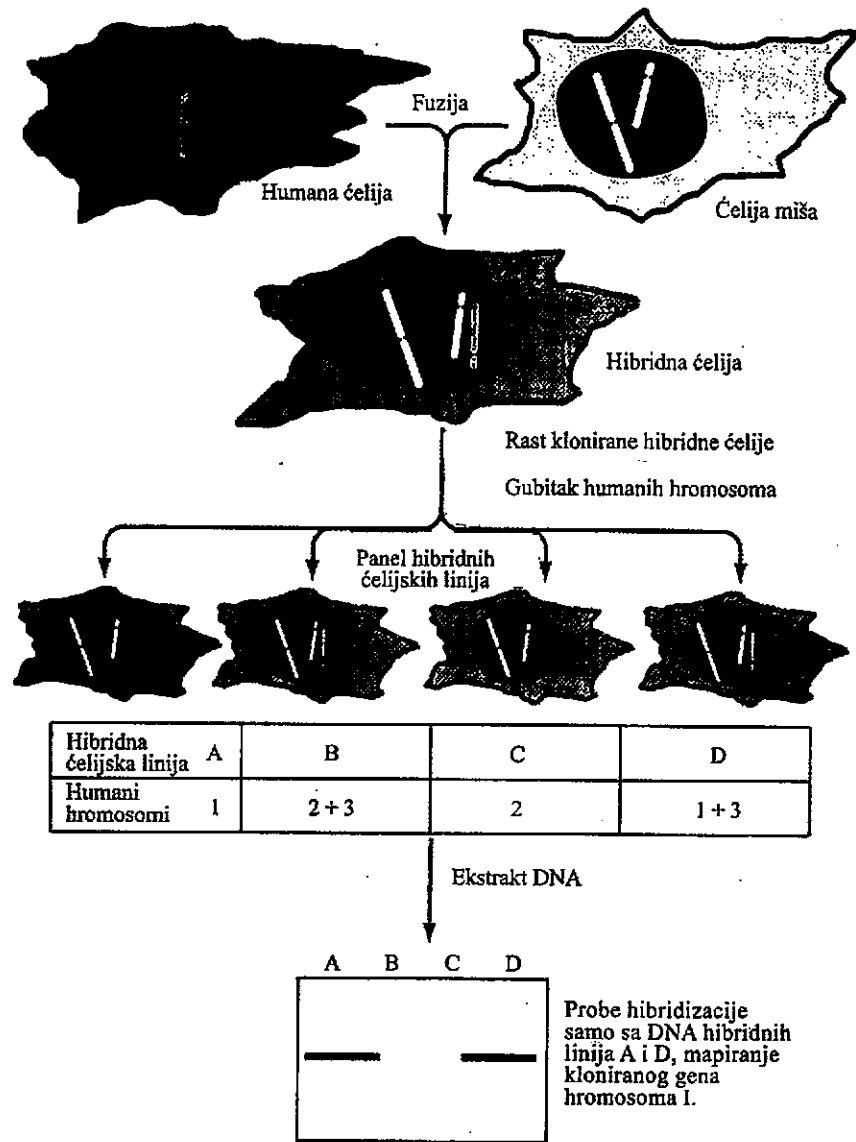
Slika 12.2 Mapa vezanih gena na humanom hromosomu 1. Mapa vezanih gena je sastavljena od mjesta na kojima su prikazani različiti polimorfizmi kratkih tandemata (STRPs- žuto obojeni), a rastojanje između markera označava učestalost rekombinacija izraženu u centimorganidama, ili cM. Jedan centimorgan iznosi oko 1 Mb humane DNA. Veza između mape vezanih gena i bendova metafaznog hromosoma označena je crveno. Histogram lijevo pokazuje broj gena, STRPs polimorfizme i druge polimorfizme (fragmenti DNA) različite dužine. (Cooper, 2000.)

Za sekvenciranje DNA korištena je tehnika po *F. Sangeru* (zašto je autor dobio Nobelovu nagradu) uz modifikaciju po L. E. Hood-u, uz koju se izvrši fluorescentno markiranje baza, a zatim njihovo detektovanje laserom. Signale nastale pri radu lasera kompjuter prevodi u ljudima prepoznatljive sekvence baza.

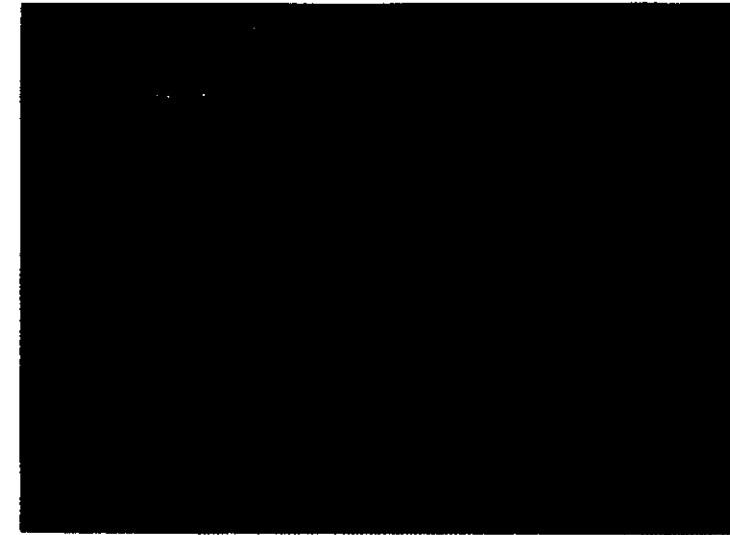


Slika 12.3 DNA sekvence humanog hromosoma 22. Determinisane su DNA sekvence cijelog hromosoma 22. Geni su transkribovani direktno u desni (+) i lijevi (-) dio koji označava sekvencirano područje hromosoma. (Od Dunham et al.1999.)

Jedna od korištenih opštih visokodiferenciranih tehnika za mapiranje gena je metoda *somatske ćelijske hibridizacije* (sl. 12.4) Metoda se zasniva na hibridizaciji ćelija koje pripadaju istim ili različitim ćelijskim vrstama. Za hibridizaciju humanih ćelija najčešće su korištene ćelije miša, sisara čiji je genom začudujuće sličan genomu čovjeka. Fuzija ćelija u kulturi se inducira virusima i nekim hemijskim agensima kao npr. polietilen-glikolom. U hibridiziranim ćelijama nukleusi su, također, fuzionisani i sadržavaju hromosome obje ćelije. Za lociranje ugrađenih humanih gena u sinkarionu (fuzionisanom nukleusu) koristi se elementima kao što su: sistem razdvajanja hromosomalnih fragmenata nastalih delecijom, razlike u morfološkom izgledu i broju hromosoma (40 miša i 46 čovjeka) miša i čovjeka, razlike u količini DNA, hibridne ćelije sadržavaju samo od 1-5 humanih hromosoma jer se progresivno gube u procesu hibridizacije, fluorescentnom in situ hibridizacijom itd. (sl. 12.5).

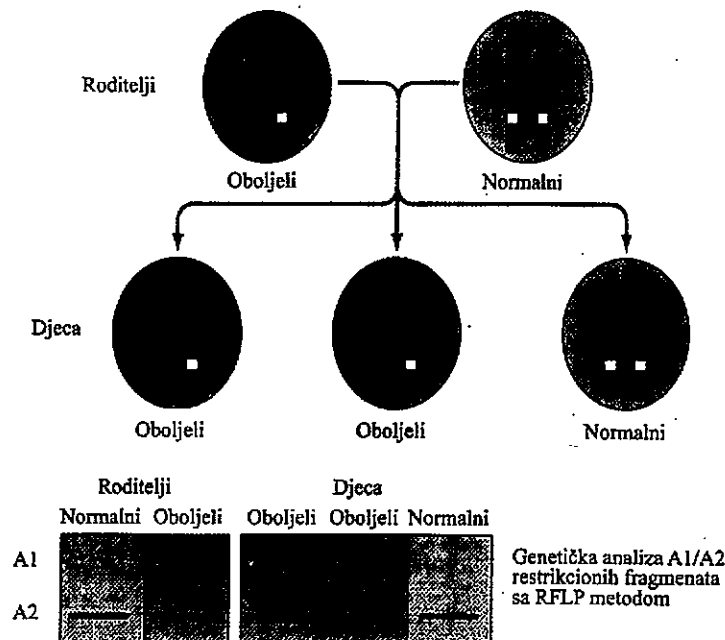


Slika 12.4 Hibridizacija somatskih ćelija Humane i ćelije miša su fuzionisane u kulturi u koju je dodat hemijski agens ili je tratirana virusima. Nastale su hibridne ćelije koje sadržavaju i humane i hromosome miša. (U ovom primjeru samo su prisutna tri humana i dva hromosoma miša). Humani hromosomi su nestabilni u hibridima i postepeno se gube u toku rasta hibridnih ćelija. Panel prikazuje linije hibridnih ćelija. Svaka linija sadržava različiti komplement humanih hromosoma. Ekstrahirani klonirani geni iz svake hibridne ćelijske linije mogu se upotrijebiti za mapu gena specifičnih humanih hromosoma. U ovom primjeru hibridizirana je humana DNAs u ćelijskim linijama, A, ali ne u B i C. Otuda samo hibridna ćelijska linija A i D je zadržala humane hromosome, što rezultira mapom kloniranih gena ovih hromosoma (Lodish, H.2001)



Slika 12.5 Fluoroscentna in sit hibridizacija Humani metafazni hromosomi su obojeni plavo. Ugrađeni gen u lamini B receptora u hibridiziranom hromosomu se otkriva na osnovu fluoroscencije (crvene boje). (K.L.Wynder I. J. B. Lawrwnce.2001.).

Prethodno opisana metoda se povezuje sa *FISH* (fluoroscentna in sit hibridizacija) tehnikom (sl. 12.5). Ovom metodom posmatraju se in sit metafazni hromosomi hibridnih ćelija. *FISH* metoda omogućuje razlaganje hibridnih ćelija i izdvajanje svakog benda metafaznih hromosoma. Sekvence nukleotida definisane kao hromosomski bend se prepoznaju pod fluorescentnim mikroskopom po specifičnim bojama kojima su obojeni i koje fluoresciraju. Metodom *RFLP* (Restriction Fragment-Length Polymorphisam) ili polimorfizam restrikcionih fragmenata se dobivaju restrikcioni fragmenti različite dužine pomoću enzima restriktivnih endonukleaza. Restrikciona mjesta služe kao markeri za fizičke i vezane mape gena, jer su specifična za svaku restriktivnu endonukleazu i predstavljaju nasljedno svojstvo (sl. 12.6).



Slika 12.6 Mapiranje humanih vezanih gena nosioca bolesti RFLP tehnikom. U ovom primjeru alel *D* je dominantan za razvoj bolesti u odnosu na normalni (*WT*) alel, tako su individue sa jednom kopijom *D* aficirani (tamna boja). Metodom RFLP je otkrivena vezanost *D* gena sa dva allele (*A1* i *A2*). U porodici je otac aficirani heterozigot za RFLP (*A1/A2*), a normalni roditelj homozigot za lokus (*A2/A2*). Dvoje djece je naslijedilo mutirani i jedno normalni alel. RFLP analizom je zaključeno da su oba aficirana djeteta, ali ne i normalno dijete, također, naslijedili *A1* alel od aficiranog roditelja, što ukazuje na gensku vezanost alela *A1* i *D* u procesu nasljeđivanja. (Iz Cooper, G. M. 2000.)

Elektroforeza je proces u kojem se molekule (proteini, DNA, RNA fragmenti) mogu razdvojiti shodno veličini i električnom naboju, primjenom struje. Molekule se nalaze na tankom sloju gela kroz čije pore klize. Pore gela mogu biti oblika i veličine kao molekule koje želimo odvojiti. Mali fragmenti obično putuju dalje od starta. Drugi naziv je "gel elektroforeza".

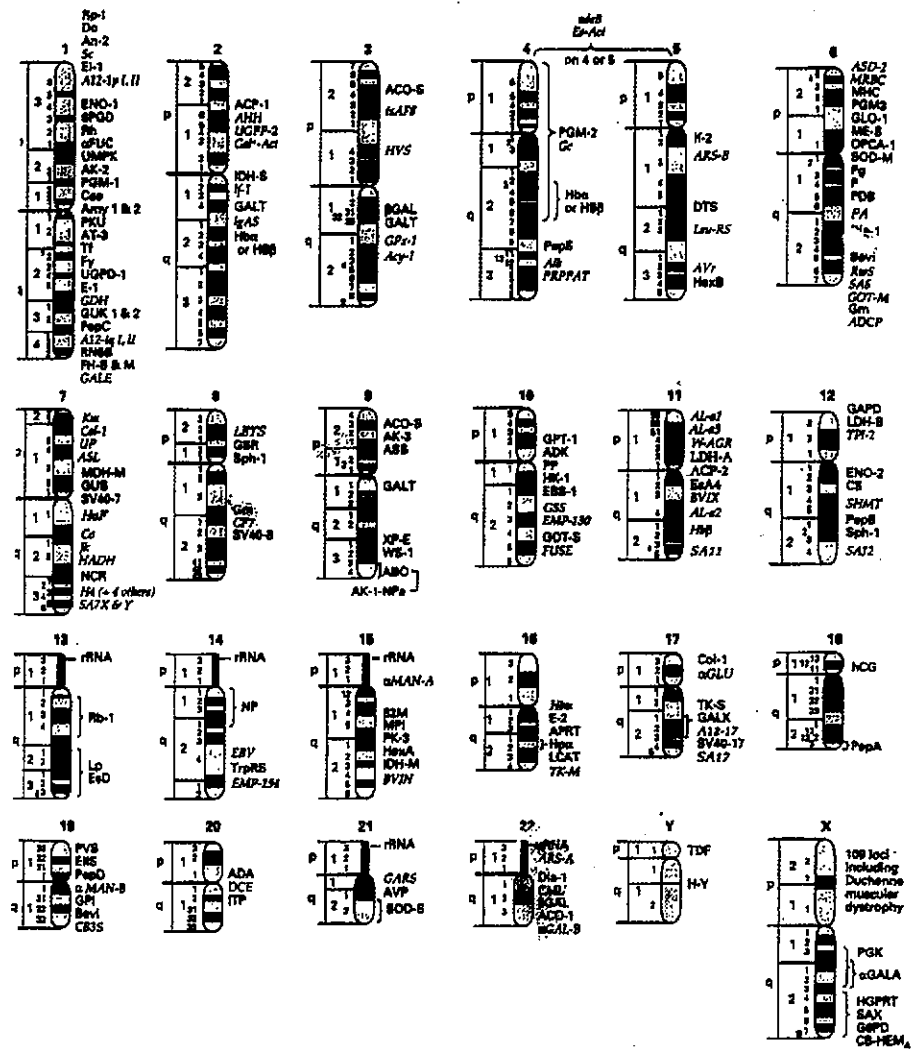
Jedna od revolucionarnih metoda je *PCR* (*Polymerase Chain Reactin*), metoda je opisana u okviru izlaganja o rekombinaciji DNA *in vitro* (genetski inženjering). Zasnovana je na promjeni aktivnosti enzima polimeraze. Metoda je automatizirana i može dati "neograničen" broj kopija nekog jednostrukog dijela DNA u kratkom vremenskom periodu. Naziva se još "molekularna fotokopija". PCR metoda ima nesaglediv uticaj na biologiju, posebno genetska istraživanja.

Značaj Projekta "ljudski genom" ✕

Finalna verzija sekvence ljudskog genoma je završena. Prikazan je katalog velikog broja ljudskih gena i hromosomske mape visoke rezolucije. Naučnici su bili iznenađeni da je stvarni broj ljudskih aktivnih gena (31.000) daleko manji u odnosu na očekivani broj 100.000. Nakon što je objavljena vijest o otkrivanju čovjekova genoma, svi stručnjaci se slažu da je to jedno od onih otkrića za koje se može reći da je otkriće stoljeća, pa čak i tisućljeća. Ono što je još jučer bila tajna danas je postalo poznato. Veliki napredak tehničkih nauka, posebno kompjuterske tehnike, omogućilo je tako brz i snažan prodor u tajne prirode. Naravno, projekat nije dao potpune odgovore na još veliki broj nepoznanica npr. iz oblasti funkcionalne analize genoma: funkcionalne analize mape gena (protein kodirajućih i nekodirajućih), regulatornih sekvenci u genomu, o nivou genske ekspresije i kontrole istih u embriologiji, interakcije protein-protein ili protein-nukleinske kiseline (u cilju rješavanja ovog problema razvila se nauka koja se bavi samo protein kodirajućim genima, strukturom proteina i funkcijom istih) itd.

Od ovog epohalnog otkrića najveće koristi imaće prevencija, dijagnostika i terapija odnosno pacijenti. Mnoge bolesti koje su do sada bile neizlječive zahvaljujući otkriću ljudskog genoma bit će moguće liječiti. Posebno ovo vrijedi za nasljedne bolesti, za tumore, duševne bolesnike npr. bolesti shizofrenije i dr. Korist od ovog otkrića imat će i farmaceutske institucije koje proizvode lijekove. Na osnovu saznanja koja se temelje na tom otkriću, pomoću raznih testova moći će se ispitivati efekti lijekova. Ukratko, može se reći da je otkriće epohalno i da će koristi od njega biti velike i mnogostruke, posebno u medicini. Međutim, povećanje saznanja o ljudskom genomu praćeno je mnogim kontroverzama: etičkim, pravnim, socijalnim. Mnogi su mišljenja da je čovjek u ruke dobio veliku moć, moćnu spoznaju koju neko može i zloupotrebiti. U budućnosti će se vidjeti šta ovo otkriće znači za čovječanstvo u moralnom pogledu. Mnogi ovo otkriće uspoređuju s pronalaskom atomske bombe. Budućnost će pokazati koliko su i jesu li uopšte u pravu.

Genetsku mapu humanih hromosoma sa simbolima detektovanih sekvenci za neke normalne ljudske osobine kao i za neke bolesti u čovjeka prikazuje sl. 12.7, (Miklos, G.L.G. and Rubin, G.M.1996.)



Slika 12.7 Genska mapa humanih hromosoma. Simboli su prikazani u tabeli 12.4 (Iz Collins, F. S. et al.1998.-2003.)

Tabela 12.4 Ključ nekih simbola gena na Slici 12.7

ABO	= ABO krvna grupa (hr.9).	H4	=Histon H4 i 4 druga gena za histone (hr.7)
ADK	= Adenozin kinaza (hr.10)	Hb	=Hemoglobin alfa lanac (hr.2,4,5 ili 16)
AL	= Letalni antigen: 3 loc (a1,a2,a3) (hr.11)	Hb	= Hemoglobin beta lanac (hr.2, 4, 5 ili 11)
Alb	= Albumin (hr.4)	HEM-A	=Klasicna hemofilija (X hr.)
AT-3	= Antitrombin III (hr.1)	HLA (A-D)	= Humani leukocitni antigeni (hr.6)
AH-3	= Adrenal hiperplazija III (hidrolaza deficit) (hr.6)	HLA-DR	=Humani leukocitni antigen D, (hr.6)
Acy-	= Aminoacilaza-1 (hr.3)	HVS	= Osjetljivost na herpes virus (hr.6)
		H-Y	= Y antigen histokompatibilnosti (Yhr.)
Bf	=Properdin faktor B (hr.6)	IgAS	=Imunoglobulinski lanci (hr.2)
2M	= 2-mikroglobulin (hr.15)	If-1	= Interferon-1 (hr.2)
BVIX	=balb virus induction xetro Pic (hr.11)	If-2	=Interferon 2 (hr.2)
		Jk	= Kid krvna grupa (hr.7)
		Km	= Kapa imunoglobulinski lanac (hr.7)
CML	= Hronična mieloidna leukemija (Yhr.) (hr.22)	LeuRS	= Leucin -tRNA sintetaza (hr.5)
Col-1	= Kolagen I(a-1 i a-2)(hr.7 i 17)	Lp	= Lipoprotein beta (hr.13)
CS	= Sinteza citrata mitohondrija	NP	= Nukleozid fosforilaza (hr.14)
		NPa	= Nail-patela sindrom (hr.9)
DMJ	= Juvenilni dijabetes melitus (hr.6)	6PGD	= 6-phosphogluconate dehidrogenese (hr. 1)
Do	= Dombrock krvna grupa (chr.1)	PKU	= Fenilketonurija (hr.1)
DTS	= Osjetljivost na difterijni toksin (hr.5)	P	= P krvna grupa (hr. 6)
E-1	= Pseudoholinesteraza -1 (hr.1)	RB-1	= Retinoblastom-1 (hr.13)
El-1	= Eliptocitozis-1 (hr.1)	Rh	= Rezus krvni faktor (hr.1)
Es-Act	= Esteraza aktivator (hr.11)	RN5S	= 5SRNA gen(s) (hr.1)
		rRNA	= Ribosomalna RNA (hr.13,14,15, 21 i 22)
FUSE	= Polikariocitozis induktor (hr.10)	SA6	= Površinski antigen 6(hr.6)
Fy	= Daffi krvna grupa (hr.1)	SAX	= X-vezana vrsta antigena (X hr.)
Gal+Act	= Galaktoza+aktivator (hr.2)	SV40	= Integraciono mjesto 7 (hr. 7)
GAL, a	= galaktozidaza, a (Fabijeva bolest) (hr. X)	WS-1	= Wardenbruk sindrom-1 (hr.9)
GDH	= Glukozo dehidrogenaza (chr.1)	W-AGR	= Wilmsov tumor bubrega (hr.11)
G6PD	= Glukozo-6-fosfat dehidrogenaza (X hr.)	XP-E	= Xeroderma pigmentozum (hr.9)
GUS	= Beta-glukuronidaza (hr.7)		

Hromosom je tijelo koje se boji, prima boju. To je materijalni dio nasljedja, koji se nalazi u jezgri. Svaka vrsta ima specifičan broj i oblik hromosoma. Za čovječiju vrstu je pod normalnim uslovima svojstveno 46 hromosoma u svim tjelesnim ćelijama, osim u zrelih spolnim ćelijama (gametama). Gamete nose polovičan broj (haploidan) hromosoma (23) radi održavanja ravnoteže u prirodi kod biparentalnih organizama koji nastaju spolnim oplodnjem. Prilikom oplodnje gameta oca sa haploidnim brojem (23) hromosoma i gameta majke nastaje prva ćelija budućeg makroorganizma tzv. zigota sa diploidnim brojem (46) hromosoma.

Identifikacija hromosoma čovjeka

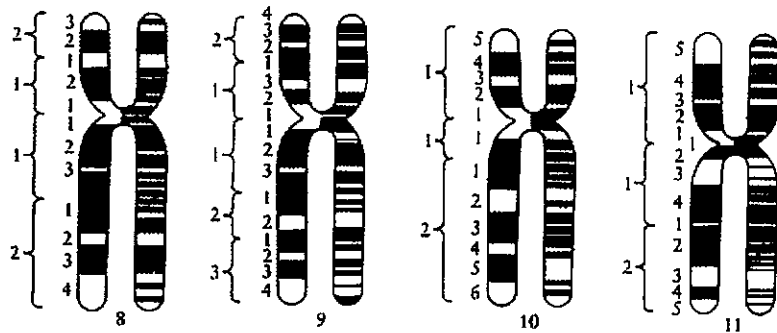
Hromosome možemo vidjeti samo u ćelijama koje se dijele. U čovjeka je to najlakše dostići uzimanjem krvi i stimulacijom diobe T limfocita sa lektinima (npr. fitohemaglutininom) (slika 13.1 - svjetlosna mikrografija humanih metafaznih hromosoma).

Hromosome možemo identificirati s obzirom na njihovu veličinu, poziciju centromere i uzorak pruganja. Do 1970. moglo se hromosome identificirati samo na osnovu veličine i položaja centromere. U odnosu na položaj centromere za čovjeka su karakteristična tri oblika: *metacentrični*, *submetacentrični* i *akrocentrični*. Hromosom je metacentričan ako su mu gornji i donji kraci približno jednaki, submetacentričan ako su mu gornji kraci kraći od donjih i akrocentričan ako su mu gornji kraci sasvim kratki i sastoje se samo od satelitne DNA. Na osnovu tih karakteristika hromosomi su svrstani u grupe od A do G (tabela 13.1)

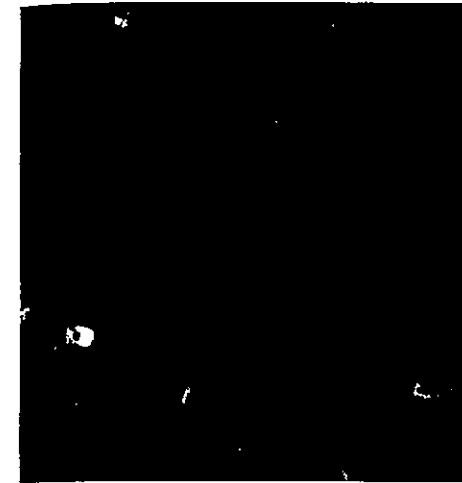
Tabela 13.1 Podjela hromosoma čovjeka u grupe

Grupa	Hromosomi	Opis
A	1-3	Najveći hromosomi, 1 i 3 su metacentrični, a 2 je submetacentričan
B	4,5	Veliki, submetacentrični
C	6-12 i X	Srednje veličine, submetacentrični
D	13-15	Srednje veličine, akrocentrični sa satelitima
E	16-18	Maleni, 16 je metacentričan, 17 i 18 submetacentrični
F	19-20	Maleni, metacentrični
G	21-22 i Y	Maleni, akrocentrični, 21 i 22 imaju satelite, a Y nema

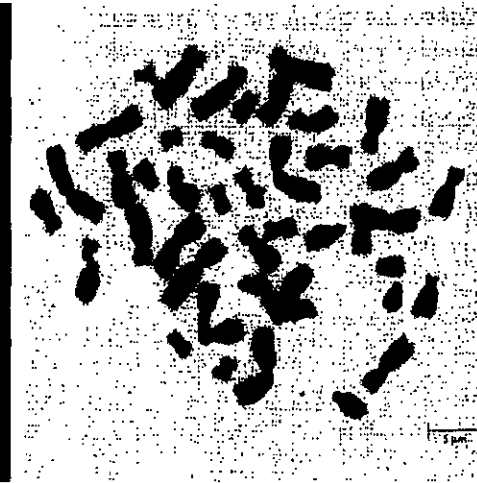
Pojedine hromosome unutar grupe bilo je moguće prepoznati tek uvođenjem pruganja hromosoma. Osnovna i najčešće upotrebljavana metoda je G pruganja (sl. 13.1) - poslije obrade hromosoma sa tripsinom boje se Giemsom, bojom koja se veže za DNA. Tamne pruge zovu se G pruge. Q metodom pruganja hromosomi se boje sa fluorescentnom bojom quinakrinom (ili bojama DAPI odnosno Hoechst 33258) i posmatraju fluorescentnim mikroskopom. Te boje se vežu za predjele DNA bogate sa bazama A i T i daju jednak uzorak pruganja kao G pruganje s tim što je R pruganje revezno G pruganju -tj. tamne pruge koje se dobijaju R pruganjem, bijele su boje primjenom G pruganja i obratno. R pruge se dobijaju toplotnom denaturacijom hromosoma u otopini soli prije nego se boje Giemsom. C pruganjem boji se prije svega konstitutivni heterokromatin oko centromere (sl. 13.3) S obzirom na to u kojoj fazi diobe (metafaza, prometafaza) se analiziraju hromosomi, mogu se dobiti različiti stupnjevi resolucije, od 350 do 850 pruga.



Slika 13.1 Standardna mapa bending šablona hromosoma od 8 do 11 humanog kariotipa određuje oba metafazni stadij (crni bendovi) i rani stadij profaze mitoze (obojeni bendovi). Hromosomi u ranoj profazi su mnogo duži od metafaznih hromosoma i mnogo više bendova se otkriva, ali su metafazni hromosomi kraći sa kondenzovanim hromatinom i bolje apsorbiraju boju. Svi bendovi ovdje su obojeni specifičnim reagentom. Naznačeni hromosomi su slični po obliku veličini, ali se mogu lako razlikovati primjenom bending tehnike (po broju, veličini i rasporedu bendova).



Slika 13.2 Fluoroscentna in situ hibridizacija humanih hromosoma sa hromosom-specifičnim fluorescentnim probama koja markira svaki od 24 hromosoma, različito obojenih (Uslužnošću Tomas Reid and Hesus Padilla-Nash.1998.)



Slika 13.3 Humani hromosomi u metafazi, obojeni su tako da se razlikuje gusto kondenzovani heterohromatin od slabije kondenzovanog euhromatina. Zapaža se duboko-intenzivni tamni region (heterohromatin) centromere (C-bend) obojeni C-metodom.

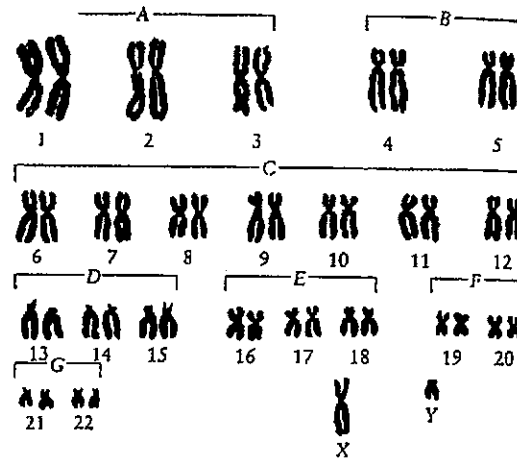
Pruganjem hromosoma može se dostići rezulucija oko 10 Mb parova. Za analizu manjih citogenetskih promjena (npr. mikrodelecijski sindromi) upotrebljavaju se metode molekularne citogenetike odnosno FISH (fluorescentna in situ hibridizacija). Pomoću FISH-a možemo različito prikazati pojedine hromosome (vidi sliku), odnosno njihove djelove npr. centromere, telomere ili genska specifična područja (sl. 13.2).

Skup svih hromosoma koji vode porijeklo od jedne jezgre čine tzv. kariotip vrste (sl. 13.4). Pod normalnim uslovima sve somatske ćelije jedne individue imaju jednak kariotip. Neki hromosomi pokazuju određeni stepen varijacije u građi. To je heteromorfizam. Ta područja zahvaćaju heterohromatin oko centromera hromosoma 1, 9 i 16, satelitne predjele hromosoma 13-15, 21-22 i dugi krak hromosoma Y. Kada se hromosomi slože po grupama od A-G dobija se grafički prikaz grupa hromosoma što označava kariogram vrste (sl. 13.5).

Slika 13.4 Svjetlosna mikrografija humanih metafaznih hromosoma spredovanih u metafazi mitoze. Skup hromosoma označava humani kariotip (46 Xx ili XY). Uočavaju se tri morfološki različite grupe hromosoma: metacentričnih, submetacentričnih i akrocentričnih hromosoma.



Slika 13.5 Humani kariogram. Humani hromosomi su složeni u parove od najvećeg (hromosom 1) do najmanjeg. (22 hromosom). Parovi su obilježeni brojevima (1-22, plus spolni par hromosoma), a potom svrstani u grupe obilježene slovima od A do G. Slika prikazuje hromosome muškarca, tako on ima 22 para autosoma i dva spolna hromosoma X i Y.



ABERACIJE HROMOSOMA †

Ako se aberacije odnose na promjenu broja hromosoma, označene su kao numeričke, a ukoliko se mijenja struktura hromosoma, označene su kao strukturne aberacije hromosoma (mehanizam nastanka aberacija hromosoma uopšte, opisan u poglavlju o hromosomima). Kad dođe do spajanja defektnih sa normalnim gametama, nastaje zigot sa abnormalnim hromosomskim setom. Klinički su takve devijacije izražene u vidu zaostatka u tjelesnom i psihičkom razvoju, multiplim kongenitalnim anomalijama i promjenama u izgledu lica.

Sindromi i bolesna stanja kao posljedica numeričkih aberacija autosoma

Poliploidije podrazumijevaju promjenu broja cijelog seta hromosoma (n). Tako možemo govoriti o, naprimjer, triploidima (3n=69 hromosoma) ili tetraploidima (4n=92 hromosoma). S druge strane su aneuploidije koje dovode do viška ili manjka pojedinih hromosoma, naprimjer, trisomije (2n+1=47 hromosoma) ili monosomije (2n-1=45 hromosoma).

Učestalost Numeričke hromosomske aberacije su jedne od najučestalijih genetskih mutacija u čovjeka. Procjenjuje se naime da su odgovorne za oko 50% spontanih pobačaja (a do spontanog pobačaja dođe u oko 20% prepoznatih trudnoća). Najčešće su trisomije (52%), monosomije (18%) i triploidije (17%). Kod živo rodene djece hromosomske aberacije prisutne su u oko 0.5% djece, a oko 60% su numeričke hromosomske aberacije.

Uzroci Triploidija je kao najučestalija poliploidija, a najčešće (66%) je posljedica oplodnje jednog jajašca sa dva spermija, rjeđe (24%) oplodnje jajašca spermijem sa diploidnim brojem hromosoma, a najrjeđe (10%) oplodnje jajašca sa diploidnim brojem hromosoma i normalnog spermija. Aneuploidije su najčešće posljedica nerazdvajanja hromosoma/hromatida u procesu mejoze koja se vrši tokom sazrijevanja spolnih ćelija (mehanizam opisan u poglavlju o hromosomima). Najčešće dolazi do greške u segregaciji u sazrijevanju jajne ćelije (u prvoj mejotičkoj diobi) rjeđe u procesu spermatogeneze (9%), a u 2% uzrok je nerazdvajanje u mitozu. Ako dođe do nerazdvajanja u mladim embrionalnim ćelijama u mitozu, znači poslije oplodnje, onda je rezultat nerazdvajanja organizam sa dvije ili više različitih ćelijskih linija. U tom slučaju govori se o mozaicizmu.

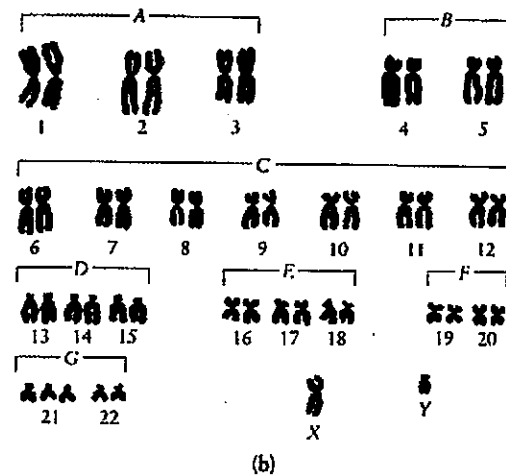
Posljedica Posljedica numeričkih hromosomskih aberacija je višak ili manjak hromosomskog materijala pa samim tim i većeg ili manjeg broja gena koji se nalaze na zahvaćenom hromosomu / hromosomima. Na taj način je kompleksno narušen proces genske odnosno genomske regulacije.

Većina numeričkih hromosomskih aberacija nije kompatibilna sa životom, pa zbog toga dolazi do problema na nivou implantacije embrija u maternicu ili do spontanih pobačaja. Mali je broj numeričkih aberacija kod kojih možemo očekivati preživljavanje djeteta tokom trudnoće, odnosno poslije rođenja. Među autosomnim hromosomima najčešće trisomije zahvataju hromosom 21 (Downov sindrom), 18 (Edwardsov sindrom) i 13 (Patau sindrom), a među spolnim trisomijama to su trisomije X i Y, odnosno monosomija hromosoma X (Turner sindrom). Numeričke aberacije autosoma su uvijek povezane sa mentalnom retardacijom i problemima u razvoju i rastu organizma. Tako većina individua sa trisomijom 13 i 18 umire za vrijeme trudnoće ili najčešće u prvoj godini života.

Trisomija hromosoma 21 (Downov sindrom) je jedina autosomalna poliploidija kod koje možemo uz savremenu medicinu očekivati životni vijek

usporediv sa opštom populacijom. Trisomija 21 javlja se incidencijom 1/650 - 1/1000 u svima rasama. Novorođenče s trisomijom 21 po pravilu prepoznata se odmah poslije rođenja zbog hipotonije, specifičnog izgleda lica ("mongoloidan" položaj očiju) i jednom poprečnom brazdom šake. Kod djece s trisomijom 21 uvijek možemo očekivati značajan stupanj mentalne retardacije, specifične karakteristike u izgledu, a u većoj ili manjoj mjeri i neke druge zdravstvene probleme (sklonost ka anomaliji srca, smanjena imunost, sklonost ka leukemiji). Boljom zdravstvenom zaštitom 80% osoba s trisomijom 21 doživljava starost 30 godina i više (godine 1965. mortalitet do 5. godine života bio je 50%). Veći dio osoba s trisomijom 21 može u sredenim sredinama naučiti čitati i pisati, učestvovati u sportovima, zaposliti se na prilagođenim radnim mjestima i tako živjeti djelimično samostalni život (sl. 13.6).

Trisomija 21 može biti posljedica greške u razdvajanju hromosoma (nondisjunction) gdje je prisutan dodatni hromosom 21 (95 % slučajeva) ili posljedica translokacije između dva hromosoma - ako su to dva akrocentrična hromosoma govorimo o Robertsonovoj translokaciji. U slučaju mozaicizma trisomije 21 (jedna populacija ćelija ima trisomiju 21, a druga normalni kariotip) promjene fenotipa mogu biti manje izražene.



Slika 13.6 Down sindrom (a) Iako djeca sa Down sindromom imaju neke zajedničke karakteristike, mentalne sposobnosti su veoma različite kod svakog pojedinačno. (b) Kariotip djevojčice sa Down sindromom uzrokovan je nerazdvajanjem. Zabilježena su tri hromosoma 21.

Trisomija 18 ili Edwardsov sindrom. Trisomija 18 javlja se incidencijom između 1/5000 - 1/7000 živorođene djece.. Slično trisomiji 21 ovdje je najčešće u pitanju čisti oblik trisomije 18 (puno rjeđe translokacija). Za fenotip trisomije 18 prije svega je karakteristična jaka retardacija u pre i postnatalnom razvoju, karakteristični oblik glave (prominentan okcipitalni dio i nisko položene uške) i prekriženi prsti na ruci.

Trisomija 13 ili Patauov sindrom. Trisomija 13 javlja se incidencijom između 1/12000 živorođene djece. Za fenotip karakteristična je mikrocefalija, anomalije neuralne cjevi, anomalije očiju (od mikroftalmije do ciklopije), zečija usna, kongenitalna anomalije srca, omfalokela (defekt trebušne stjenke), anomalije bubrega i anomalije spolnih organa osobito kod muškaraca. Kariotip ovih individua je 47, XX, +13 ili 47, XY, +13.

Sindromi kao posljedica numeričkih aberacija spolnih hromosoma

Kod numeričkih aberacija spolnih hromosoma učinak "dodatnih" hromosoma je nešto manje izražen zbog fenomena *lionizacije* hromosoma X, odnosno zbog malog broja značajnih gena (najznačajniji je ipak onaj koji određuje muški spol) na hromosomu Y. Fenomen lionizacije, odnosno nasumične aktivacije jednog (ili svih više od jednog) hromosoma X smanjuje štetan učinak dodatnih hromosoma X. Naprimjer, u slučaju *Klinefelter sindroma* (XXY) u najviše slučajeva povezuje se sa muškim sterilitetom (bez mentalne retardacije, odnosno drugih značajnih anomalija u razvoju). Ovo je najčešći slučaj ovog sindroma sa kariogramom 47, XXY. Pokazalo se da ovaj prekobrojni X-hromosom, u najvećem broju slučajeva, vodi porijeklo od majke. *Turnerov sindrom*. Kariogram ovih osoba je najčešće 45, X0, a može se javljati kao posljedica strukturnih promjena X hromosoma. Dijagnoza se obično može postaviti u jednom od tri perioda života: kod rođenja kad je prisutan limfedem ruku i nogu te kožne promjene na vratu (webbing), u školi zbog problema u matematici (geometrija i trigonometrija) ili u pubertetu zbog odsutnosti razvoja sekundarnih spolnih znakova, odnosno menstruacije. Žene s Turnerovim sindromom su manjeg rasta. *Žene sa tri XXX hromosoma* (tzv "super žene") imaju najčešće normalan fenotip. Kariogram ovih žena je: 47, XXX. Veliki broj žena sa ovom aberacijom je fertilan. *Muškarca sa 47, XYY* ne možemo fenotipski razlikovati od normalnih muškaraca. Mentalna retardacija odnosno sklonost agresivnosti i kriminalu, karakteristike koje su se vezivale za ovaj kariotip 47, XYY, u prošlosti, danas su odbačene. Rjeđe se pojavljuju sindromi sa više X hromosoma, npr. 48, XXXX, 49, XXXXX, 48, XXXY. Kod njih su fenotipovi teži i obično obuhvaćaju teže oblike zaostalosti u mentalnom i tjelesnom razvoju.

Sindromi i bolesna stanja kao posljedica strukturnih aberacija hromosoma

Kod jednog ili više hromosoma može da dode do gubitka dijela hromosoma (delecije), udvajanja dijela hromosoma (duplikacije), promjene orijentacije dijela hromosoma (inverzije), delecije krajeva.

Strukturne hromosomske aberacije su posljedica promjena u strukturi jednog hromosoma i spajanja krakova koji su ostali bez vrhova (ring hromosomi) ili do izmjene dijelova hromosoma između dva ili više hromosoma (translokacije). Ako u ovom slučaju ne dode do uočljivog gubitka genetskog materijala, govorimo o uravnoteženoj (balansiranoj) translokaciji. Kada se povežu dugi kraci dva akrocentrična hromosoma, nastaje Robertsonova translokacija (Vrste i mehanizmi strukturnih aberacija opisani su u poglavlju o hromosomima).

Učestalost Kod živorođene djece prisutne su hromosomske aberacije u oko 0.2% djece, od kojih su 37% nebalansirane translokacije.

Uzroci Strukturne hromosomske aberacije mogu nastati "de novo" u sazrijevanju gameta ili su nasliedene od roditelja. Za nastanak strukturnih aberacija ključni je proces rekombinacije, proces koji je fiziološki neophodan za pravilnu segregaciju hromosoma tokom diobe. Tokom rekombinacije dolazi do lomova i do izmjene genetskog materijala u homolognim hromosomima. U slučaju da mehanizmi koji kontrolišu pravilno srašćivanje odgovarajućih dijelova hromosoma otkazu, dode do strukturnih aberacija.

Posljedica Posljedice strukturnih hromosomskih aberacija mogu biti vezane sa nebalansiranom količinom dijela hromosomskog materijala ili inaktivacije gena u području strukturne aberacije. Tako je kod delecija i duplikacija prisutan manjak odnosno višak genetskog materijala koji se najčešće očituje u smetnji tjelesnog i mentalnog razvoja. Stepen smetnje obično zavisi od veličine nebalansiranog hromosomskog materijala.

Jedna od najučestalijih parcijalnih delecija je ona koja pogada hromosoma 4 i 5. Djeca s parcijalnom delecijom kratkog kraka hromosoma 4 imaju *Wolf-Hirschhorn sindrom* (46, XX, del (4p)) sa tipičnim izgledom lica (širok nosni korijen i nadolje usmjerene usne) i zastoje u rastu. Oko jedna trećina djece s tim sindromom umire u prvoj godini života. S druge strane je sindrom "*cru du chat*" koji je posljedica parcijalne delecije kratkog kraka hromosoma 5 (46, XX, del (5p)), osobina sindroma je karakteristični plač djeteta u prvim mjesecima života koji podsjeća na mjaukanje mačke (po čemu je sindrom dobio ime). Sindrom dodatno prati težak oblik mentalne retardacije, mikrocefalija, kongenitalne anomalije srca i genitourinarne anomalije.

Kada dode do nebalansirane strukturne aberacije zbog nepravilne segregacije hromosoma u mejozi roditelja sa balansiranoj translokacijom, količina suvišnog, odnosno manjka genetskog materijala je veća. Dolazi do spontanijh prekida trudnoće ili težih anomalija u tjelesnom ili mentalnom razvoju.

Poseban su slučaj mikrodelecijski sindromi kod kojih dolazi do gubitka genetskog materijala koji je premalen da bi bio uočljiv na kariotipu. Detektuju

se metodom FISH-fluorescentne in situ hibridizacije. Učestaliji mikrodelecijski sindromi su, npr. sindrom *Di George* (razvojne anomalije srca, imunološkog sistema, spolovila ==> delecija 22q11), *Prader Willie sindrom* (Butler, M.G. 1993.) karakteristična hipotonija novorođenčeta, specifičan izgled lica, debljina, mentalna retardacija ili *sindrom Miller-Dieker* (hipotonija novorođenčeta, lizencefalija, mentalna retardacija). Balansirane hromosomske aberacije (translokacije, inverzije) obično nemaju posljedica za zdravlje nosioca. Rijetki su slučajevi kad dode do translokacije baš u području gena (prekid sekvence gena), odnosno regulatornih genskih područja. Tako može doći do kliničke slike genopatija, odnosno do raka (npr. Philadelphia hromosom-translokacija između hromosoma 22 i 9 u hronične mieloidne leukemije).

Poseban slučaj na izgled normalnog kariotipa kod afektirane osobe predstavlja *uniparentalna disomija*. Kod "prirodnog" popravljanja trisomije na normalni broj hromosoma u daljem razvoju može se, naime, izgubiti hromosom jednog roditelja, a ostati dva hromosoma drugog roditelja. U kariotipu se to ne primjećuje, a može biti uzrok kongenitalnih anomalija. Radi se o posebnim područjima u genomu (područja na hromosomima 7, 11, 15, 16 i 22) koja su na neki način obilježena (imprinted) drugačije ako se radi o majčinom, odnosno očevom genomu. Za normalni razvoj potreban je genetski materijal oba roditelja na tom hromosomskom području. Već pomenuti sindrom Prader Willi tako je posljedica manjka očevog genoma u području 15q11, a manjak istog područja majke, ima za posledicu Angelmanov sindrom (hiperaktivnost, nerazvijen govor, nekontrolisan smijeh).

Rizik za prenos hromosomske aberacije na potomstvo je u strukturnih hromosomskih aberacija puno veća nego u numeričkih. Nosioci delecija i duplikacija imaju 50% mogućnosti za prenos aberacije na dijete, a i kod nosioca drugih strukturnih aberacija rizik je znatno povećan. Kod translokacija zavisi o veličini translociranog segmenta i od hromosoma zahvaćenog u translokaciju.

Sindromi hromozomske nestabilnosti

Za neke sindrome koji su posljedica mutacija u genima za reparaciju DNK karakteristična je značajna hromozomska nestabilnost, to su brojni lomovi i druge anomalije hromosoma. Takvi autosomno recesivni sindromi su, naprimjer, Bloomov sindrom, *Fanconijeva anemija* i *ataksija telangiektazija*. Za njih je karakteristična i povećana sklonost malignim bolestima.

Slično kao u tim sindromima i u ćelijama raka javljaju se brojne hromosomske anomalije. Neke od njih mogu biti specifične, npr. Philadelphia hromosom kod *hronične mieloidne leukemije* (recipročna translokacija između dugih krakova hromosoma 9 i 22) ili translokacija između dugih krakova hromozoma 8 i 14. Druge hromosomske anomalije u tkivima raka mogu biti manje ili nespecifične, a prikazuju se obično pomoću FISH metode.

Nomenklatura ✕

Na kraju, citogenetska nomenklatura određuje broj hromosoma, status spolnih hromosoma i u slučaju aberacija tip aberacije, zahvaćene hromosome i područja aberacije na hromosomu. Neki primjeri citogenetske nomenklature i citogenetskih simbola prilazani su na tabelama 13.2 i 13.3.

Tabela 13.2 Značenje nekih citogenetskih simbola

Simbol	Značenje
cen	Centromera hromosoma
p	Kratak krak hromosoma
q	Dugi krak hromosoma
r	Ring hromosom
t	Translokacija
ter	Terminalni dio hromosoma
pat	Očev izvor hromosoma
del	Delecija hromosomskog područja
dup	Duplikacija hromosomskog područja
ins	Insercija hromosomskog područja
inv	Inverzija hromosomskog područja
mar	Marker hromosom
mat	Majčin izvor hromosoma
minus (-)	Gubitak hromosoma

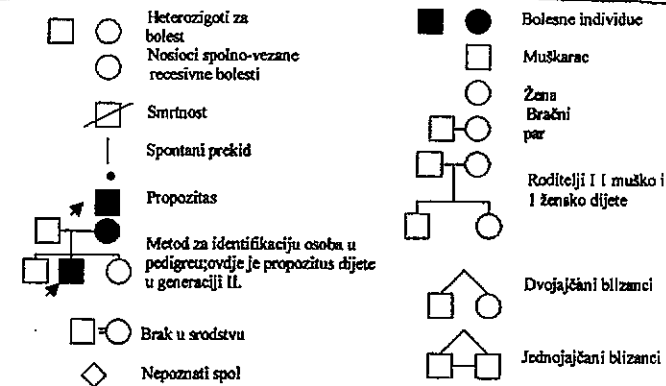
Tabela 13.3 Primjeri citogenetske nomenklature

Nomenklatura	Klinički fenotip
46,XX ili 46,XY	Normalni ženski ili muški kariotip
47,XXY	Muškarac sa dodatnim hromosomom X (sindrom Klinefelter)
45,X	Žena sa monosomijom X hromosoma (sindrom Turner)
47,XY+21	Muškarac sa dodatnim hromosomom 21 (trisomija 21, sindrom Down)
46,XX/45,XY,t (14;21)	Muškarac normalnog fenotipa sa Robertsonovom translokacijom
45,XY,t (14;21)	Muškarac sa trisomijom 21 i Robertsonovom translokacijom
46,XY,t (8q24;14q32)	Muškarac sa balansiranom translokacijom, tačke prekida su 8q24 na jednom i 14q32 na drugom hromosomu
46,xx,del (5p23:)	Žena sa delecijom kratkog kraka hromosoma 5 - od p23 do terminalnog dijela: (Cru-du-chat sindrom)

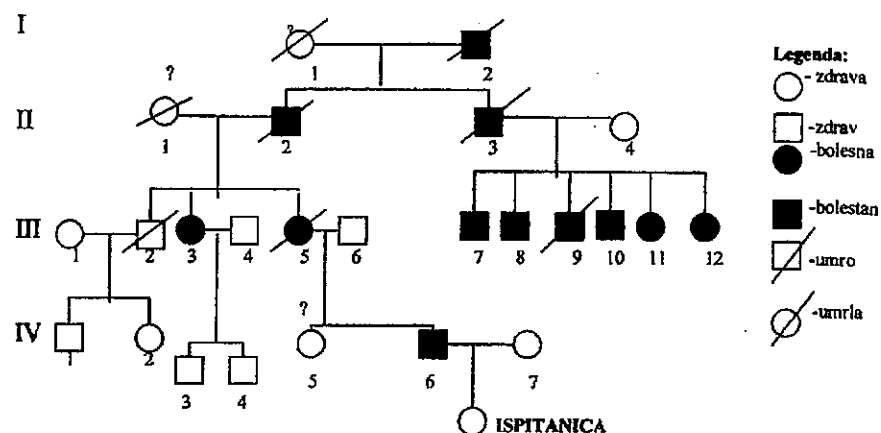
GENETSKI SAVJET

Medicinska genetika je u većine zemalja postala samostalna specijalizacija u medicini. Genetsko savjetovanje može se definisati kao komunikacijski proces koji ima za cilj informisati odnosno educirati osobe o bolestima sa genetskom predispozicijom. Genetski savjet omogućava da se osobe autonomno (koncept autonomno je jedan od osnovnih etičkih koncepata u medicini) odluče o reprodukciji, testiranju ili liječenju s obzirom na njihovo shvaćanje bolesti, etičke i religiozne stavove. Za takvu je odluku bitno da su osobe stvarno i razumjele informaciju kliničkog genetičara. Zbog toga genetsko savjetovanje označavamo kao komunikacijski proces, što znači da nije u pitanju jednostrano davanje informacija (doktor pacijent) nego i doktor sam treba procijeniti da li su osobe shvatile u dovoljnoj mjeri predstavljenu informaciju (doktor pacijent). Kako se medicinska genetika jako brzo razvija, ponovljena savjetovanja su neophodna za posredovanje najnovijih genetskih saznanja i mogućnosti koja su značajna za osobe odnosno porodice sa genetskim bolestima. Genetsko savjetovanje može se podijeliti u nekoliko elemenata: dobivanje podataka, dijagnostika, procjena rizika, davanje informacije/edukacija, psihološke procjene, pomoći kod odlučivanja te kontinuirane pomoći osobama i njihovim porodicama.

Dobivanje podataka. U medicinskoj genetici anamneza je jedna od osnovnih metoda obrade pacijenata. Svrha anamneze je dobijanje podataka o porodici i oboljelima. U tu svrhu u toku genetskog savjetovanja uvijek se napravi heredogram (sl. 13.8). Heredogram se prikazuje pomoću simbola (sl. 13.7) koji se upotrebljavaju za crtanje genaološkog stabla (rodovnika) za pedigre analizu. U anamnezi dobijaju se i podaci o istoriji bolesti kao i podaci o istoriji trudnoće i razvoju djeteta. Podaci koje genetičar treba prikupiti uključuju i mišljenje, nade i brige osobe o trenutnom genetskom problemu, mišljenje o genetskom testiranju, potrebe osobe u vezi s genetskim problemom kao i već pomenuto razumijevanje predstavljenih informacija osobe. Na slici (sl. 13.8) je prikazan primjer heredograma ženskog člana porodice sa "visokim genetskim rizikom" koja je dobrovoljno pristupila DNA testiranju da bi planirala porodicu bez rizika za prenos gena za Huntingtonovu bolest koja je prisutna u njenoj familiji.



Slika 13.7 Simboli koji se upotrebljavaju pri crtanju rodovnika za pedigre analizu



Slika 13.8 Heredogram ispitanice, potencijalnog nosioca gena za Huntingtonovu bolest

Dijagnostika. Medicinska dijagnostika uvijek teži što više senzitivnim i što više specifičnim testovima. Po prirodi bolesti, idealan test u slučaju genetski prouzrokovanih bolesti bit će onaj koji otkrije genetsku mutaciju koja je uzrok bolesti. Sa razvojem medicinske citogenetike i molekularne genetike razvile su se i metode za dijagnosticiranje velikog broja genetski uslovljenih bolesti. Poseban značaj imaju genetski testovi. Naime, mutacije se još ne mogu otkloniti, pa one doživotno determiniraju osobu (bakterijska infekcija se naprotiv može odstraniti antibioticima), a s druge strane otkrivena mutacija kod jedne osobe može značiti da su i drugi članovi porodice pod visokim rizikom za štetnu genetsku predispoziciju. Zbog toga se preporučuje da se genetski testovi uvijek izvode u okviru genetskog savjetovanja (genetski savjet prije testiranja, poslije testiranja, a ponekad i u toku testiranja). To je još značajnije u slučaju preasimptomatskog testiranja (testiranje osoba koje još uvijek nemaju nikakvih zdravstvenih problema, ali su pod visokim rizikom da su naslijedile mutaciju) za genetsko uvjetovane bolesti sa kasnim početkom bolesti (npr. rak dojke).

Procjena rizika. Shvaćanje rizika za genetski uvjetovanu bolest je često jedan od ključnih momenata u reproduktivnim i životnim odlukama osobe. Rizik zavisi od oblika genetske predispozicije i od položaja osobe u rodoslovnom stablu. Ako postoji mogućnost potrebno je izračunati individualni rizik osobe. Pri tome se koristi pravilima izračunavanja vjerovatnoće (naprimjer) i Bayesovog računa koji uključuje što više relevantnih faktora koje znamo (familijarni podaci, nalazi značajnih testova) u procjeni rizika. Ponekada rizik se ne može tačno procijeniti, pogotovo u slučaju multifaktorske genetske predispozicije (npr. rascjep nepca). U tom slučaju koristi se empirijskim rizikom, tj. rizikom koji se bazira na epidemiološkim studijama.

Davanje informacija/edukacija. Pomenuli smo već značaj informacije kod genetskog savjeta-značajne životne odluke osobe zavise od shvaćanja informacije. Usljed nedovoljne informiranosti, nivo znanja osoba o genetskom savjetovanju je često jako skroman. Zbog toga genetičar predstavlja informaciju jednostavno i razumljivo i u dovoljnom obimu. Među informacijama koje daje genetičar su i one koje pomažu osobama/podicama u sukobljavanju s problemima koji su vezani sa bolešću (dodatna "negenetska" medicinska obrada, liječenje i rehabilitacija, školovanje, društva za samopomoć).

Psihološka procjena i pomoć. Kako genetske informacije mogu biti vezane sa jako snažnim emocionalnim momentima (npr. prenatalna dijagnostika, prekid trudnoće, rezultati preasimptomatskog testiranja) genetičar treba procijeniti u kakvom stanju se nalazi osoba i posvetiti dovoljnu pažnju psihološkom stanju pacijenta. Ako genetičar procijeni da je psihološki problem kod osobe jako složen onda može u proces genetskog savjetovanja uključiti i kliničkog psihologa ili psihijatra koji je dio tima razvijenih genetskih službi. Osobe sa genetskim problemima često trebaju kontinuiranu pomoć. To može biti vezano sa nekim novim momentima kod osobe ili u porodici (nova trudnoća, novi znakovi bolesti, uključujući širu porodicu) ili su vezana sa novim saznanjima u medicinskoj genetici.

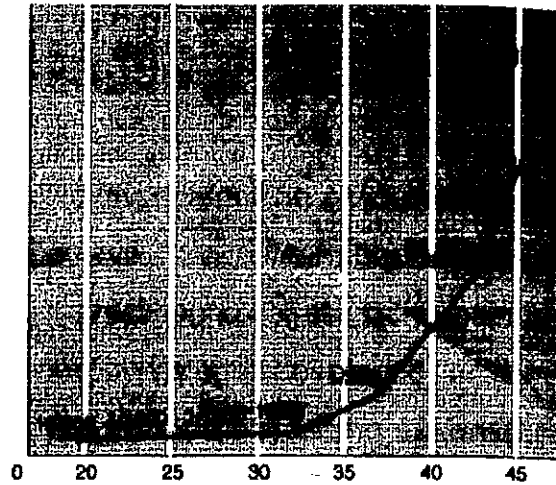
PRENATALNA DIJAGNOSTIKA

Kako su mogućnosti za liječenje genetski uvjetovanih bolesti jako ograničene, sprečavanje je u toliko značajnije. Nekada se savjeovalo ljudima sa genetskim bolestima (pogrešno narušen etički koncept autonomije!) da ne rađaju djecu. To se u današnje vrijeme može smatrati kao jako konzervativna odluka (ali jako efikasna). Razvoj metoda medicinske citogenetike i molekularne genetike danas omogućava parovima da se odluče za prenatalnu dijagnostiku. Koncept tog pristupa je da se u ranoj trudnoći, obično pomoću genetskog testa, utvrdi da li je plod nosilac genetske mutacije. U slučaju da se mutacija utvrdi, par se može odlučiti za prekid trudnoće. U suprotnom slučaju može se rasteretiti straha i psihičkog pritiska.

Razlozi za prenatalnu dijagnostiku

Najčešći razlozi (indikacije) za prenatalnu dijagnostiku uključuju: starost trudnice, screening testovi, monogenska predispozicija ili strukturalna hromosomska aberacija kod roditelja, kongenitalne anomalije u trudnoći, hromosomske aberacije u ranijim trudnoćama i psihološko opterećenje. Starošću trudnice raste mogućnost za aneuploidiju zbog toga se omogućava trudnicama starijim od 35 godina (u nekim zemljama 37 ili 38) da se odluče za hromosomsku prenatalnu dijagnostiku. Ta indikacija predstavlja jedan od češćih razloga za prenatalnu dijagnostiku u svakodnevnoj kliničkoj praksi.

Screening testovi Iako je rizik za dijete sa aneuploidijom manji kod mladih trudnica i one mogu roditi dijete s hromosomskom aberacijom. Čak je u apsolutnom smislu na nivou populacije moguće očekivati da će više djece sa aneuploidijom roditi žene mlade od 35 godina (puno veći broj žena zatrudni prije 35 godina).



Prenatalna dijagnostika kod svih trudnica bila bi neracionalna, pa su se zbog toga razvili screening testovi za utvrđivanje trudnica sa višim rizikom za aneuploidije kod ploda. Koncept scrining testa je da u nekoj populaciji (idealno bi bilo svih trudnica u nekom području) bez prethodnih faktora rizika identificira osobe sa povišenim rizikom za bolest. Screening testovi nisu dijagnostički-nalaz, ali mogu ukazati na povišen rizik kojeg je moguće objektivizirati sa prenatalnom dijagnostikom.

Screening testovi su ograničeno senzitivni i specifični. Ovi testovi kojima se najviše koristi su ultrazvučna pretraga vratne gube, trojni hromosomski test i u novo vrijeme kombinacija ultrazvučne pretrage i nekih biohemijskih parametara u krvi trudnice (npr. estradiol, beta-hCG, PAP-pregnancyassociated protein). Glavna prednost screening testova je da ne ugrožavaju trudnoću a glavna im je mana ograničena senzitivnost i specifičnost.

Monogenska predispozicija ili strukturne hromosomske aberacije kod roditelja. U tom je slučaju rizik da dijete naslijedi genetsku predispoziciju obično oko 1 %, što većina parova smatra kao veoma visok rizik. Metodama molekularne genetike u prvom slučaju i citogenetike u drugom možemo pouzdano utvrditi status ploda i time paru pomoći da skupi hrabrost da se uopšte odluči za dijete kao i omogućiti dalje odluke u trudnoći.

Hromosomske aberacije u ranijim trudnoćama. Numeričke aberacije nisu povezane sa visokim rizikom za aneuploidiju u sljedećoj trudnoći (1%), ali se i zbog psiholoških razloga omogućava paru da se može odlučiti za citogenetsku prenatalnu dijagnostiku u budućim trudnoćama.

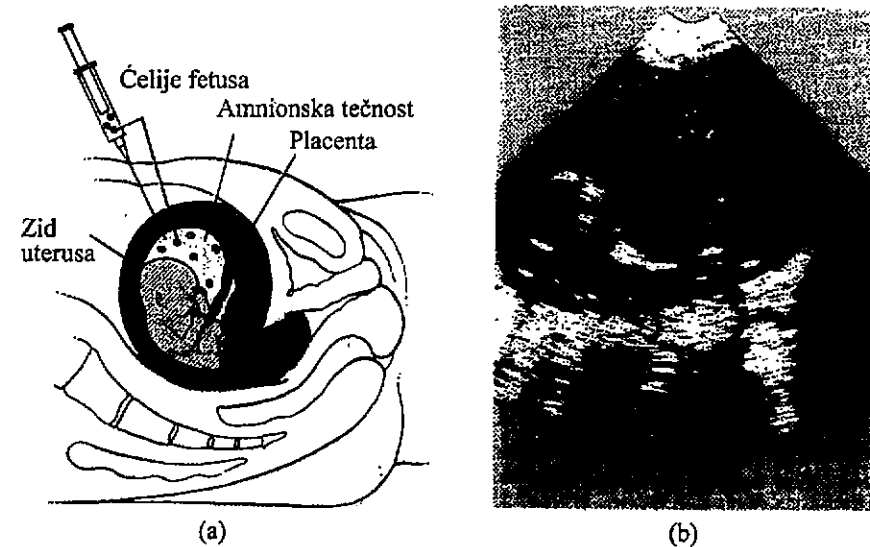
Psihološko opterećenje. Ponekad kod para ne postoji medicinski razlog za citogenetsku prenatalnu dijagnostiku (npr. trisomija 21 kod brata), ali je psihičko opterećenje tako snažno (što obično procijeni i klinički psiholog) da se paru treba omogućiti citogenetska prenatalna dijagnostika.

Metode prenatalne dijagnostike

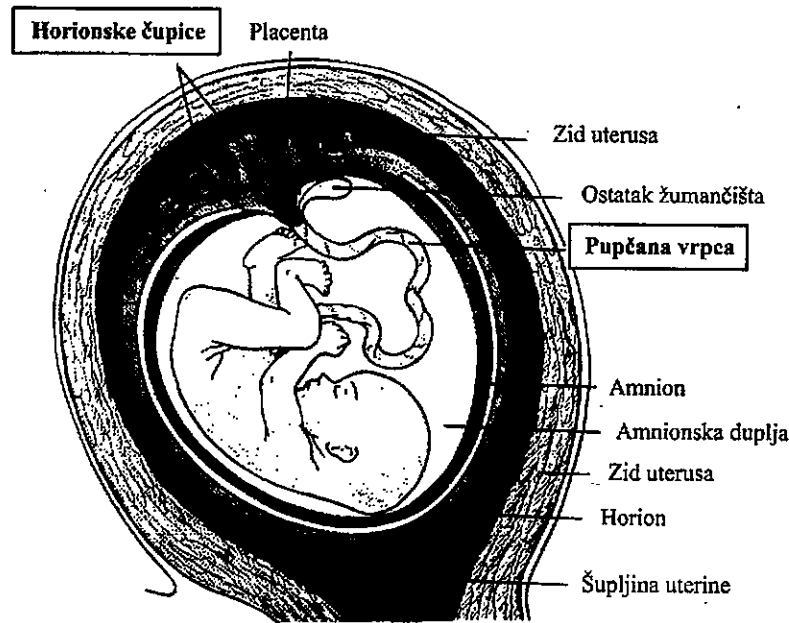
Za citogenetski ili molekularnogenetski test možemo upotrijebiti sva tkiva ploda odnosno posteljice (horionske čupice) na plodovoj strani (koja se embrionalno razvije iz zigota), ali se najčešće upotrebljavaju tri tkiva: plodova voda, horionske čupice i plodova krv (tabela 13.4). Za pristup se odlučuje par uz saradnju genetičara i ginekologa. Nov oblik pristupa je predimplantacijska genetska dijagnostika.

Amniocenteza

Amnicenteza je postupak u kojem ginekolog pod kontrolom ultrazvuka iz amnionske šupljine uzme oko 20ml plodne vode (sl. 13.9). U njoj su amniociti-plodove ćelije koje se oljušte sa kože, odnosno epitela dišnog i urinarnog sistema. Ćelije plodove vode se uzgajaju oko 14 dana u kulturi prije citogenetske odnosno molekularnogenetske pretrage.



Slika 13.9 Amniocenteza a) Pozicija fetusa se prvo odredi ultrasondom. Potom se šprica ubaci u amnionsku šupljinu, tečnost izvučena špricom sadrži fetalne ćelije. Ćelije se zasade i rastu u tkivnoj kulturi, a potom se analiziraju i otkrivaju hromosomske aberacije ili neke drugi genetski defekti. Procedura se obično ne izvodi prije šesnaeste sedmice trudnoće, što osigurava oboje da ima dovoljno fetalnih ćelija u amnionskoj šupljini za detekciju i za uklanjanje viška amnionske tečnosti koja bi embrio dovela u opasnost. (b) Sonogram uterusa trudnice se radi kada je ambrion star četiri mjeseca. Tamni region je zid uterusa u tečnoj okolini fetusa. Fetus je položen na leđa, sa okrenutom lijevom i desnom rukom u prvom planu. Prema desno, može se vidjeti dio pupčane vrpce pruža se od abdomena fetusa.



Slika 13.10 a) Biopsija horionskih čupica Humani fetus, horionske čupice obojene zeleno. b) Kordocenteza Naznačena je pupčana žila sterlicom, kao i ostali dijelovi embriona: zid uterusu, ostatak žumančišta, amnion, amnionska duplja, zid uterusu, horion i šupljina uterusa. (Prema Barnes C. 1990.)

Biopsija horionskih čupica

Slično kao kod amniocenteze, ginekolog pod kontrolom ultrazvuka odvoji oko 20mg horionskih čupca (sl. 13.10a). Kako je to tkivo mitotski aktivno, može se pristupiti odmah citogenetskoj ili molekularnogenetskoj analizi. Obično u oba slučaja čupice se uzgajaju zbog boljeg kvaliteta citogenetskih preparata odnosno veće količine genetskog materijala kojeg možemo dobiti iz kulture neke značajne specifikke biopsije horionskih čupica.

Kordocenteza

Kordocenteza je postupak u kojem ginekolog pod kontrolom ultrazvuka iz pupčane žile uzme oko 5ml plodove krvi (sl. 13.10b). Obično je indikacija za kordocentezu kongenitalna anomalija ploda, pa treba napraviti kulturu za citogenetsku pretragu odnosno može se odmah pristupiti analizi najčešćih aneuploidija pomoću FISH metode.

Tabela 13.4 Metode prenatalne dijagnostike

Amniocenteza (ćelije plodove vodice)	16.nedelje	0,5-1%
Biopsija horionskih resica (horionske resice)	12.nedelje	3%
Placentocenteza (horionske resice)	2. i 3. trimesječje	1%
Kordocenteza (plodovi limfociti)	2. i 3. trimesječje	2-3%
Fetoskopija (tkiva ploda)	2. trimesječje	5%

Predimplantacijska genetska dijagnostika (PGD)

Koncept PGD je u tome da se genetska analiza izvrši još prije implantacije embrija u maternicu. To je moguće biomedicinskom oplodnjom. Oplodnja se izvrši "in vitro" kada je embrio u osmočelijskom stadijumu, mikromanipulacijom se oduzme jedna, odnosno dvije blastomere sa kojima se uradi genetski test pomoću PCR (genopatije-ustanove se bolesni geni) ili FISH metode za određivanje hromosomskih aberacija (metode opisane prethodno). Prednost ovog pristupa je u tome što trudnici nije potrebno da prekida trudnoću u slučaju negativnog rezultata testa. Loša strana PGD je u tome što je manja pouzdanost i visoka cijena, te se zbog toga trenutno upotrebljava kod para sa visokim rizikom za genetsko oboljenje djeteta.

KONGENITALNE ANOMALIJE

Oko 3% djece se rađa sa kongenitalnim anomalijama koje zahtijevaju medicinsku intervenciju. Predstavljaju značajan uzrok oboljelosti i smrtnosti u ranom periodu poslije rođenja.

Pronalaženjem uzroka i savjetovanjem roditelja bave se najčešće pedijatri i klinički genetičari, no sve značajniju ulogu u detektovanju i sprečavanju kongenitalnih anomalija imaju i ginekolozi koji veliki dio anomalija mogu otkriti još u trudnoći pomoću ultrazvuka.

Razumijevanje uzroka (etiologije) kongenitalnih anomalija značajno je za terapiju, a prije svega i za genetsko savjetovanje roditeljima. S obzirom na mehanizam nastanka, kongenitalne anomalije možemo podijeliti u četiri grupe.

Deformacije su posljedica djelovanja nefizioloških mehaničkih faktora na plod koji pouzrokuju anomalije, inače, normalno razvijenih tjelesnih struktura. Najčešće deformacije nastaju djelovanja faktora na hrskavicu, kosti i zglobove. Deformacije mogu biti i posljedica štetnih faktora majke (anomalije uterusa, uzak medenični obruč) faktora trudnoće (višeplodna trudnoća) ili anomalije ploda (spina bifida, spinalna mišićna atrofija).

Disrupcije su posljedica uništenja prethodno normalnih tjelesnih struktura. Štetni faktori su najčešće amnijski trakovi, ishemije ili krvarenja.

Displazije su povezane sa anomalijama u strukturi ćelija, odnosno tkiva. Primjeri su neke metaboličke anomalije (gomilanje metaboličkih produkta) ektodermalne displazije i druge.

Malformacije su posljedica nezavršenih embrionalnih procesa kao što su proliferacija, migracija, diferencijacija, fuzija ili apoptoza. Tako su, naprimjer, smetnje u proliferaciji povezane sa odsutnošću ili smanjenjem ekstremiteta, a smetnje u procesu fuzije su povezane sa rascjepom usne, odnosno nepca. Malformacije znači nastaju najčešće u fazi blastogeneze i organogeneze, to je do osme nedelje embrionalnog razvoja. Kao uzročni faktori mogu biti mutacije u genima, odnosno hromosomske aberacije ili eksogeni - teratogeni faktori koji mogu biti biološki (npr. virusi), hemijski (npr. lijekovi) ili fizički (rentgenski zraci). Generalno možemo zaključiti da deformacije i disrupcije nisu povezane sa genetskim uzrocima, ali su ti uzroci mnogo češći u displazijama i malformacijama. Za praktičnu obradu korisna je i podjela kongenitalnih anomalija u izolirane i multiple anomalije. Kod izoliranih multifaktorskih predispozicija je često rizik da se anomalija ponovi u djece sljedeće trudnoće mali (1-4%), a kod multiplih češće su monogenske ili hromosomske mutacije.

Genomskom terapijom smatramo sve postupke pomoću kojih unosimo u tijelo bolesnika gene/molekule DNK/RNK ili genetsko modificirane ćelije sa svrhom liječenja. Bolesti koje bismo mogli liječiti genomskom terapijom tako ne obuhvaćaju samo monogenske nasljedne bolesti nego i rak, infektivne, krvne i mnoge druge učestale bolesti u čovjeka.

PRISTUPI U GENSKOJ TERAPIJI

U zavisnosti od molekularnog mehanizma bolesti

Kod autosomno recesivnih genetskih bolesti najčešće se radi o smanjenju produkta nekoga gena, npr. enzima. Slično je sa ćelijama raka gdje često dolazi do gubitka tumor supresornih gena. Bolesti kod kojih je poremećen kontrolni mehanizam funkcije gena, tj. kontrola količine genskog produkta najprikladnije su za gensku terapiju. U tim slučajevima genska terapija se zasniva na dodavanju gena u bolesne ćelije, odnosno organizam. Primjer takve bolesti je manjak adenozin deaminaze (ADA) kod čovjeka gdje je genska terapija bila već uspješno primijenjena. Radi se o nedostatku enzima koji učestvuje u metabolizmu nukleinskih kiselina i čiji nedostatak ima za posljedicu tešku imunodeficijenciju sa čestim virusnim, gljivičnim i bakterijskim bolestima i ranom smrću.

Drugačiji pristup genskoj terapiji zahtjevaju bolesti kod kojih je mehanizam vezan za povećanu količinu/funkciju genskog produkta, odnosno novu funkciju gena, što je često slučaj u autosomno dominantnim nasljednim bolestima ili kod mutacija.

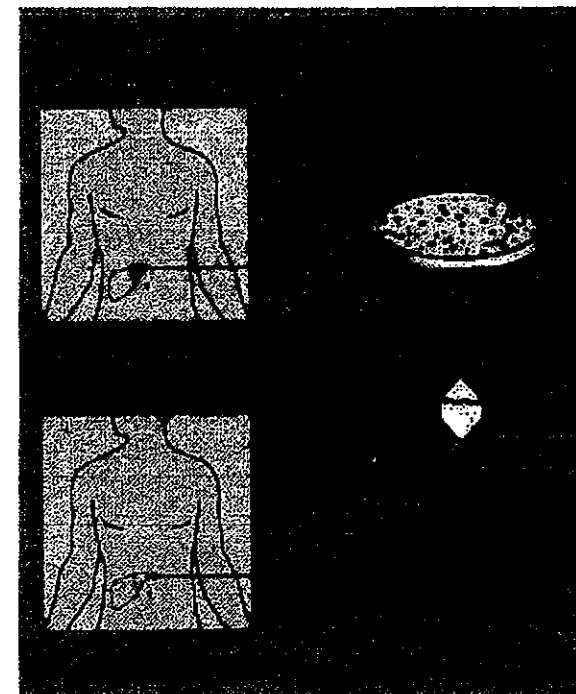
U onkogenima tumora, kod bolesti toga tipa, genska terapija može biti usmjerena u potiskivanju gena koristeći se, naprimjer, tzv. ribosomskom, odnosno antisense tehnologijom (ribozim je molekula RNA-enzim sa katalitičkim djelovanjem) ili zamjenom mutiranog gena "zdravim" u bolesnim ćelijama.

Ex vivo ili in vivo

Genetski materijal možemo unositi bilo direktno u tijelo bolesnika (*in vivo*) ili u njegove ćelije u laboratorijskim uslovima koje naknadno vratimo u organizam bolesnika u koje je moguće dodavanje produkata gena putem krvnog sistema (primjenjen pristup *ex-vivo*). U tom slučaju bolesnoj osobi prvo uzmemo njene ćelije, najčešće nediferencirane ćelije koštane srži. Oduzete ćelije kultiviramo (razmnožimo), genetski modificiramo-unesemo gen za produkt koji nedostaje i na kraju vratimo u organizam. Takav pristup bio je upotrijebljen u liječenju ADA, prve uspješne genske terapije u čovjeka. Slika prikazuje primjer *ex-vivo* pristupa u slučaju familijarne hiperholestereolemije, autosomno dominantno uslovljene bolesti kod koje dolazi do ranog začepjenja krvnih sudova (arterioskleroze) i posljedica zbog povišenog holesterola u krvi. Bolest je posljedica manjka receptora za LDL (low density lipoprotein), lipoproteina koji vežu i transportuju holesterol u krvi. Posebno je teška bolest u slučaju nasljeđivanja mutiranog gena od oba roditelja-u tom slučaju od srčanog infarkta mogu oboljeti čak i djeca. U postupku genske terapije prvo se uzme dio jetre, ćelije se kultiviraju u hranilištu, u njih se unese gen za LDL receptor, potom se selekcioniraju ćelije koje sadrže LDL receptor i konačno se vrate genetsko modificirane ćelije u jetru bolesnika (sl. 14.1).

Prednost pristupa *ex-vivo* je mogućnost selekcije ćelija u koje smo uspješno unijeli genetski materijal i kod kojih je došlo do izražavanja genskog produkta.

Metodom *in-vivo* genetski materijal direktno unosimo u tijelo putem krvnog sistema, disanjem aerosola (npr. kod cistične fibroze) ili ubrizgavanjem genetskog materijala direktno u bolesno tkivo (npr. tumorske ćelije). Najveći problem *in-vivo* terapije je efikasnost prenosa genetskog materijala u bolesno tkivo kao i kontrola genske regulacije genetskog materijala u transfeciranim ćelijama. Također, problem je uspješnog unošenja genetskog materijala u nervne ili mišićne ćelije (kod nervnodegenerativnih ili nervnomuskularnih bolesti) koje su visokodiferencirane i koje imaju jako ograničenu sposobnost regeneracije poslije rođenja. S druge strane, može integracija unesenog genetskog materijala poremetiti normalnu ekspresiju nekog drugog gena (prethodno "normalnog") ili čak pouzrokovati proces kancerogeneze.



Slika 14.1 Šematski prikaz postupka genske terapije kod familijarne hiperholesterolemije

1. uzimanje dijela jetre bolesnika,
2. kultiviranje ćelija u hranilištu,
3. unošenje gena za LDL receptor,
4. sekvenciranje ćelija koje sadrže LDL receptor i
5. vraćanje genetsko modificiranih ćelija u jetru bolesnika.

Somatske ili spolne ćelije

Teoretski može se genetski materijal unijeti putem genske terapije u spolne ili somatske ćelije bolesnika.

Prednost genske terapije spolnih ćelija je u sprečavanju ispoljavanja nasljednih bolesti kod potomaka roditelja s genetskom predispozicijom. Zapravo, kod potomaka uopšte ne bi ni došlo do početka procesa patogeneze bolesti, jer bi zigot i sve njegove ćelije nadalje imale "popravljen" genom. Dalje, unijeta genetska informacija bi se prenosila i u sljedeće generacije. Zbog nedovoljne kontrole i posljedično nepoznatih mogućih učinka na individuum, genska terapija spolnih ćelija za sada još nije etički prihvatljiva.

Tako se zasad genska terapija upotrebljava vezana sa somatskim ćelijama bolesnika. Potrebno je gensku terapiju više puta ponavljati zbog gubitka ćelija

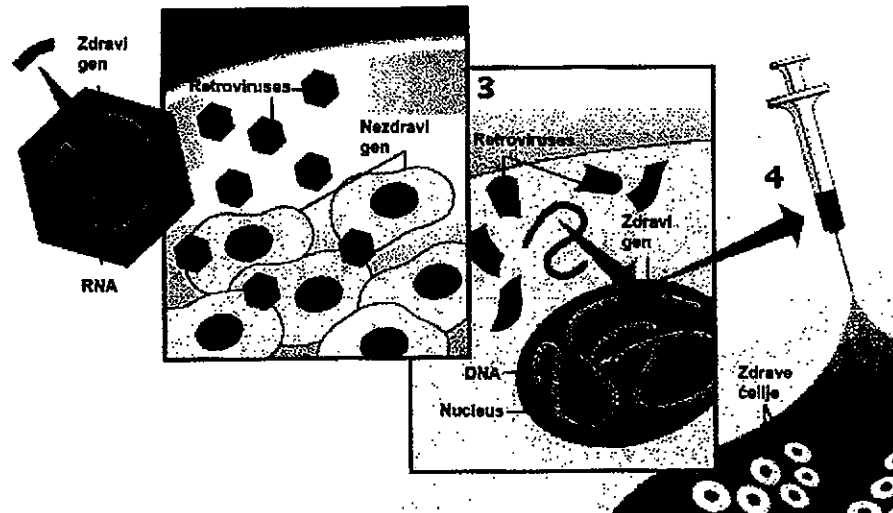
sa unesenim genetskim materijalom. Naprimjer, kod genske terapije cističke fibroze putem aerosola, epitelne ćelije transformirane "terapeutskim" genetskim materijalom imaju ograničen životni vijek, pa tako dolazi do njihovog gubitka i time do kraja terapijskog učinka.

NAČINI PRENOSA GENETSKOG MATERIJALA U ĆELIJE/TIJELO BOLESNIKA

Cilj svake genske terapije je što efikasniji prenos genetskog materijala u ćelije primaoca. Genetski materijal kojim se koristimo u svrhu genske terapije može biti "gol", to je ubrizgavanje molekula DNA/RNA direktno u krv ili tkivo. Efikasnost toga pristupa dakako je mala. Zbog toga obično upotrebljavamo za prenos genetskog materijala u ćelije genetske vektore. To su najčešće virusni vektori ili liposomi.

Virusni vektori

Virusi su zapravo najpogodniji za prenos genetskog materijala u tijelo primaoca. Oni mogu umnožavati svoj genetski materijal (odnosno virusne čestice) ili integrisati svoj genetski materijal u genom domaćina (sl. 14.2). U svrhu genske terapije virusi se modificiraju, tako da se eliminišu oni njihovi dijelovi koji su odgovorni za patogenost, sa druge strane, u njih se unosi genetski materijal koji služi za gensku terapiju.



Slika 14.2 Šematski crtež prikazuje retroviruse kao vektore u procesu prenosa genetskog materijala u ćelije primaoca u svrhu genske terapije. 1. Zdravi gen, 2. Retrovirusi, i nezdrave ćelije, 3. Retrovirusi i zdravi gen i 4. Zdrave ćelije.

U odnosu na obim genetskog materijala koji želimo unijeti u ćelije, sposobnost integracije u genom bolesnika, mogućnost inficiranja ćelija tkiva koje se ne dijele (neuron, mišićne ćelije), način prenošenja, dužinu ekspresije u bolesnom tkivu i patogenost možemo izabrati različite virusne vektore, što prikazuje navedena tabela (tabela 14.1).

Tabela 14.1

Vektor	Nukleinska kiselina	Kapacitet za nošenje gena	Infekcija visoko diferenc. tkiva	Integracija u hromosome	Način prenosa	Dužina ekspresije	Patogenost za bolesnika
Adenovirus	DNA	>30 kb	Da	Ne	Ex vivo i In vivo	Kratka	↑
Adenoasociirani virus	DNA	4.0 kb	Ne	Da	Ex vivo i In vivo	Duga	↓
Retrovirus	RNA	7-7.5 kb	Ne	Da	Ex vivo	Kratka	↓
Lentivirus	RNA	7-7.5 kb	Da	Da	Ex vivo i In vivo	Duga	↓

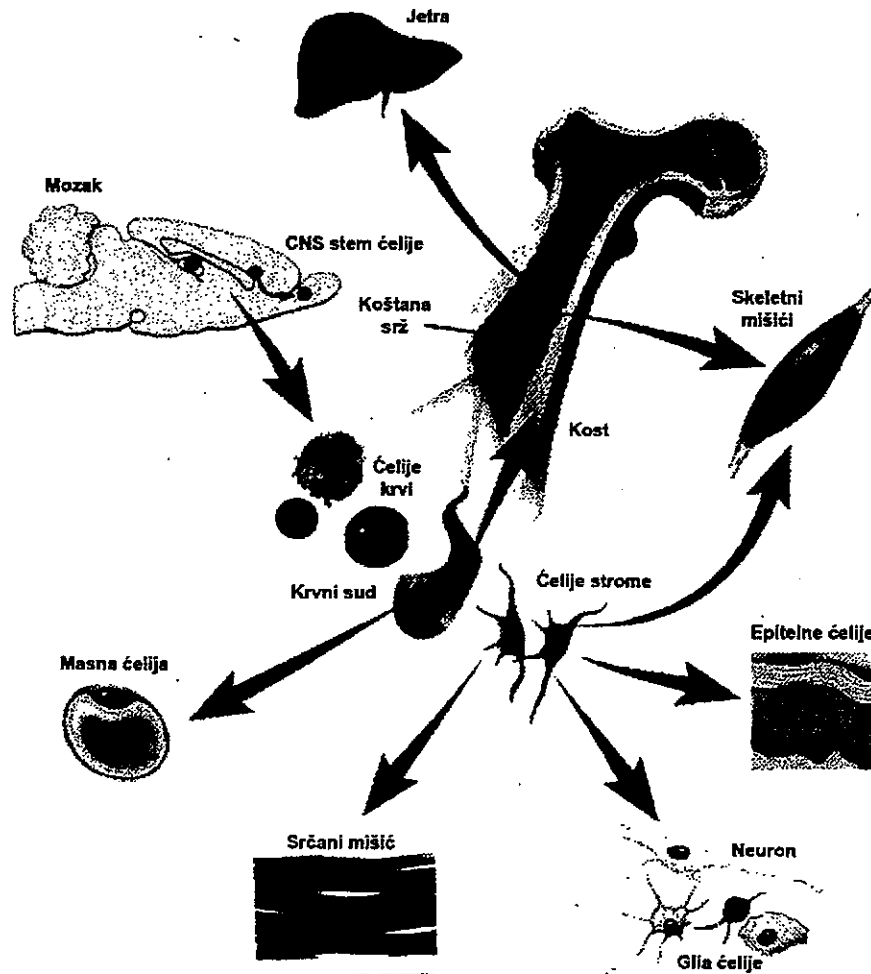
Liposomi

Genetski materijal u svrhu genske terapije može se uključiti u sferične vezikle koje su obavijene lipidnom dvoslojnom membranom koja je slična membrani ćelije. Liposomi se mogu upotrijebiti u in-vivo i u ex-vivo pristupu. Prednost liposoma je da praktično nema ograničenja za veličinu DNK genetskog materijala kojeg želimo upotrijebiti u genskoj terapiji. Nedostaci su u slaboj efikasnosti prenosa genetskog materijala u ćelije i kratka dužina ekspresije kada se unešena DNA ne integriše u genom primaoca.

Terapija genetsko modificiranim ćelijama

Za terapiju ćelijama (cell therapy) obično se upotrebljavaju nediferencirane - matične ćelije tkiva koje je zahvaćeno procesom bolesti. Matične ćelije se mogu poslije razmnožavati ex-vivo, prenijeti u tkivo bolesnika, odnosno mogu se genetski modificirati u svrhu ispravka genetskog defekta (sl. 14.3). Matične ćelije imaju sposobnost plastičnosti što znači da se mogu diferencirati u ćelije različitih tkiva Tako je moguće diferencirati matične ćelije krvi u neurone i obratno. Matične ćelije se uzimaju od osobe koja se liječi, pa tako ne dolazi do imunog odgovora. Uspješna transdiferencijacija može biti dakako u praktičnom pristupu problematična, jer je sposobnost pluripotencijalnosti ograničena. Alternativni izbor matičnih ćelija predstavljaju embrionalne matične ćelije, to su ćelije koje imaju visoku sposobnost

pluripotentnosti. Embriionalne matične ćelije u čovjeka se mogu dobiti kloniranjem. Iz somatskih ćelija bolesnika može se izolirati nukleus, prenijeti u jajašce kojemu je prethodno oduzet nukleus. U slučaju da se umjetno manipulirana ćelija jajašce počne dijeliti, dobijaju se klonirane ćelije čovjeka - bolesnika. Ako se razvoj klona prekine u ranom embriionalnom razvoju, embriionalne ćelije mogu se upotrijebiti za terapiju ćelijama. Još početkom prošlog vijeka izveden je čitav niz ovakvih uspješnih eksperimenata sa vodozemcima i drugim nižim eukariotipa. Bolesti koje bi se mogle liječiti terapijom ćelijama obuhvaćaju, npr. neurodegenerativne bolesti kao što su Huntingtonova ili Parkinsonova bolest, ishemičnu bolest srca ili šećernu bolest.



Slika 14.3 Terapija genetsko modificiranim ćelijama. Različite vrste matičnih (jetre, koštane srži, pljuvačnih žlijezda, krvnih ćelija, epitelnih ćelija, neurona, CNS stem ćelija i drugih) ćelija imaju sposobnost modifikacije, odnosno mogu se genetski modificirati u smislu korekcije genetskog defekta.

DNA TESTIRANJE U GENETSKO USLOVLJENIM BOLESTIMA

Dijagnoza genetsko uslovljene bolesti može se postaviti na različitim nivoima, odnosno različitim pristupima:

1. klinička dijagnoza je rezultat kliničke obrade pacijenta (anamneza, pregled, pomoćne kliničke metode - npr. mjerenje dužine ekstremiteta, rentgensko i druge vrste slikovnih metoda, patohistološka pretraga tkiva, organa),
2. na ćelijskom nivou mikroskopski se može analizirati ćelija, naprimjer, oblik eritrocita u srpastoj anemiji,
3. na proteinskom nivou može se analizirati aktivnosti enzima ili ih analizirati kvalitativno i kvantitativno pomoću Western blot metode ili antitijela - imunološki,
4. a na molekularnom nivou može se genetski defekt prikazati pomoću analize RNA (Northern blot metoda, reverzna transkripcija) ili DNK (Southern blot metoda, metoda PCR). Pomenute metode su različito senzitivne i specifične.

Senzitivnost testa je mjera za procjenu koliko bolesnika od svih oboljelih dijagnostični test otkrije (ako test otkrije 80 od 100 bolesnika, senzitivnost je 80%). Specifičnost testa je mjera za procjenu koliko ispitanika koje je test prepoznao kao bolesnike stvarno imaju tu bolest (ako ima 70 od 100 ispitanika koje je test prepoznao kao bolesne, specifičnost je 70%).

Prema molekularnoj logici genetski uslovljenih bolesti, bit će najbolji dijagnostički test onaj koji će prikazati mutaciju, što je osnovni uzrok bolesti.

PRISTUPI DNA TESTIRANJU

Direktan DNA test.

Direktnim DNA testom želi se otkriti mutacija u nekom genu. Za taj pristup treba znati u kojem ćemo genu tražiti mutaciju (za razliku od kariotipa u kojem analiziramo cijeli genom odjednom na nivou kromosoma). Taj gen treba prethodno identificirati i znati njegovu DNA. Senzitivnost direktnog DNA testa je uslovljena molekularnom patologijom istraživanog gena. U slučaju srpaste anemije javlja se jedna jedina mutacija odgovorna za bolest - to je substitucija adenina u timin (CAG u CTG) u 6. kodonu - globinskog gena. Drugim riječima, svi bolesnici imaju mutaciju CAG u CTG, a sa druge strane, mutacija nije prisutna kod zdravih osoba. Može se zaključiti da je senzitivnost i specifičnost DNA testa u primjeru srpaste anemije praktički 100%. Drugačiji je slučaj u nekih drugih bolesti gdje je senzitivnost 65%, 55% itd, što zavisi od toga da li je mutacija prisutna ili ne, ili nije otkrivena.

Direktan DNA test je u pravilu metoda izbora u dijagnostici genetsko uslovljenih bolesti. Njegova primjena je jednostavna u slučaju bolesti kod kojih je molekularna

patologija ograničena na jednu ili mali broj mutacija kao što je, naprimjer, već pomenuta srpasta anemija, sindrom fragilnog X kromosoma, miotonična distrofija, Huntingtonova horea, Friedreichova ataksija i neke druge. U bliskoj budućnosti očekuje se napredak na planu razvoja metoda za traženje mutacija u genima pa time i bolju senzitivnost DNA testa kod bolesti u kojih se mogu mutacije javljati bilo gdje u genu.

Indirektan DNA test

U slučaju kad gen za genetsko uslovljenu bolest (monogensku) još nije otkriven ili zbog veličine gena nije dostupan direktnom pristupu DNA dijagnostici, može se primijeniti indirektni DNA test. U ovom slučaju se upotrebljavaju polimorfni genetski - DNA markeri i fenomen vezanog nasljeđivanja.

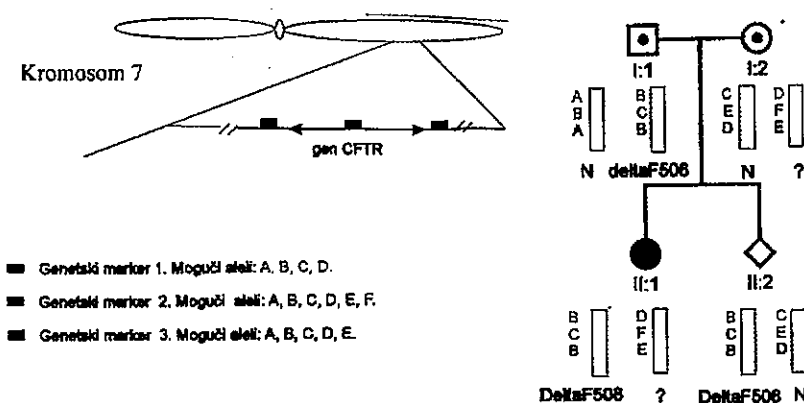
Po definiciji frekvencija najrjedeg alela u genomu treba da iznosi barem 1%. U genetskoj dijagnostici koristi se različitim vrstama genetske varijabilnosti u genomu. Kao prvi tip genetskih markera upotrebljavali su se takozvani RFLP (restriction fragment length polymorphism) genetski markeri. Ovi genetski markeri su restriktivni fragmenti DNA koji se dobijaju pomoću enzima restriktivne endonukleaze. To su bakterijski enzimi koji prepoznaju 4-12 sekvenci parova baza i cijepaju DNA na određenom mjestu.

Drugi tip genetskih markera su SNP markeri (single nucleotide polymorphisms) ili jedan promijenjeni nukleotid (različite forme jednog istog nukleotida u genomu).

Prednost SNP genetskih markera je u tome da su jako brojni - procjenjuje se da se javljaju na svakih 300-500 parova baza u genomu. U velikoj mjeri se upotrebljavaju i mikrosatelitni i minisatelitni genetski markeri, to su 2 do 4 para baza odnosno 100 do 2000 parova baza duge ponovljene sekvence DNA. Broj ponavljanja, pa time i broj alela u populaciji je mnogo veći. Ovim tipom polimorfni genetskih markera koristi se za identifikaciju ljudi (kriminalistika, očinstvo).

Vezano nasljeđivanje zapravo odstupa od trećeg Mendelovog zakona i opisuje fenomen da se dva lokusa koji su dovoljno blizu jedan drugome (manje od 5 cm odnosno 5 milijuna baznih parova) prenose u sljedeće generacije zajedno, a ne nezavisno. Taj fenomen koristi se za praćenje nasljeđivanja genetske predispozicije u porodici. Jedan od lokusa naime je polimorfan genetski marker, a drugi je fenotip - bolest (koji je posljedica mutacija u genu koji se nalazi u blizini genetskog markera) (vidi sliku 14.4).

Nedostatak ovog pristupa je u tome što je potrebno imati genetski materijal više članova porodice (po mogućnosti i više bolesnika). Dodatno može doći do problema u dijagnostici zbog rekombinacije (crossing overa) između polimorfni genetskog markera i gena. Da bismo izbjegli greške u dijagnostici, po mogućnosti upotrebljavamo intragenske markere (koji se nalaze u intronima), odnosno markere s obje strane gena.



Slika 14.4 Ilustracija hromosoma 7 u kojem se nalazi gen za cističnu fibrozu (CFTR) i nasljeđivanje ovog gena po principu vezanog nasljeđivanja

Tkiva za pretragu

Za DNA test obično se upotrebljava uzorak periferne krvi. Kao izvor genetskog materijala može, pak, poslužiti bilo koja ćelija sa jezgrom, naprimjer, amniociti, horionske ćelije, blastomera, ćelije bukalne sluznice, epitelne ćelije, kosa kao i arhivska tkiva (tkiva uklopljena u parafin ili smrznuta).

Specifičnosti DNA testa

DNA testovi imaju, za razliku od drugih testova u medicini, neke posebnosti koje određuju i drugačiji pristup dijagnostici. S jedne strane, otkrivanje mutacije nije neka prolazna promjena u organizmu čovjeka nego ga određuje za cijeli život. S druge strane pronalazak mutacije u jednog člana porodice odmah stavlja pod rizik i druge članove porodice. Njih treba informisati o toj mogućnosti i ako žele, omogućiti im DNA testiranje. Zbog toga se preporučuje da se DNA testiranje izvodi u okviru genetskog savjetovanja. To znači da ispitanik ima genetsko savjetovanje barem jedanput u postupku DNA testiranja, po pravilu prije i poslije testiranja.

Poseban primjer DNA testiranja predstavlja pre-simptomatska dijagnostika. Svrha je identifikacija genetske predispozicije u fazi kad osoba još nije oboljela od bolesti, odnosno nije razvila simptome i znake bolesti. Radi se često o bolestima koje se javljaju u odrasloj dobi kao što su, naprimjer, neke neurodegenerativne (Huntingtonova horea, Alzheimerjeva bolest) bolesti ili rak

(rak dojke). Postupak testiranja provodi se u više faza genetskog savjetovanja. Na prvom savjetovanju se osobi predstave sve informacije o testu kao i pozitivne i negativne posljedice, saznanje o statusu genetske predispozicije (nosilac ili ne). Ispitanik se uputi i do kliničkog psihologa koji procijeni stupanj stresa ispitanika. Poslije jednog do dva mjeseca (obavezan period koji služi da ispitanik može razmisliti o testiranju) slijedi drugi genetski savjet koji služi razjašnjavanju pitanja koja su se možda pojavila poslije prvog savjeta. Na drugom savjetovanju osoba se može odlučiti za testiranje i predati uzorak krvi ako je mišljenje kliničkog psihologa da stupanj stresa kod ispitanika nije prejak. Kad je nalaz gotov, slijedi treći genetski savjet na kojem se ispitanik opet može odlučiti da ne sazna za informaciju o testiranju. U suprotnom slučaju genetičar prosljediti nalaz ispitaniku sa čime postupak testiranja nije završen - zadatak je genetske službe da i poslije predaje DNA testa omogući dalje informacije ispitaniku i familji, po potrebi i pomoć kod organizacije potrebne kliničke obrade.

15

GENETSKA DETERMINACIJA IMUNOLOŠKIH SVOJSTAVA

Tjelesne tečnosti se dijele na vanćelijske i ćelijske. Čovjek osrednje tjelesne težine od oko 70 kg u sebi nosi oko 40 litara vode ili prosječno oko 57% svoje ukupne tjelesne težine. Od toga većinski dio od oko 25 litara otpada na volumen ćelijske tečnosti a preostali dio od oko 15 litara čini dio koji čini volumen vanćelijske tekućine. U vanćelijsku tekućinu se ubrajaju međućelijske tekućine, plazma, cerebrospiralna tekućina, intraokularna tekućina, tekućina u probavnom traktu i one tekućine koje se nadu u potencijalnim prostorima. Međućelijska tekućina, kao što samo ime kaže, nalazi se u prostoru između ćelija i manjim je dijelom u slobodnom tekućem obliku. Veći dio ove tekućine vezan je u dijelu međućelijskog prostora. Unutarćelijska tekućina dio je citoplazmatskog sadržaja svake ćelije u kojoj se nalaze mnogobrojne raspršene veće ili manje čestice i organele.

Zbog razlike u kvalitetu i kvantitetu otopljenih materija u navedenim predjelima membrane stvaraju se preduslovi za život. Naime, život je upravo promet materija i sadržaja kroz polupropusne, strogo selektivne membrane unutar i van ćelije. Otuda su i potrebne razlike u sadržaju odjeljaka tjelesnih tekućina. Kada te razlike nestanu ili izostanu regulacijski mehanizmi koji dozvoljavaju miješanje sadržaja između vanćelijske i unutarćelijske tekućine, nastupit će smrt ćelije, odnosno organizma. U dio vanćelijske tekućine ubrajamo i krvnu plazmu. U osnovi, to je vanćelijska tekućina krvi koja zajedno s krvnim ćelijama cirkulira zatvorenim cirkulacijskim sistemom. U čovjeka i većini životinjskih vrsta protokom krvi kroz cirkulacijski sistem osigurava se snabdijevanje svih ćelija organizma hranjivim materijama i kiseonikom, odnosno odvođenje nus produkata metabolizma i ugljen dioksida. Međutim, zahvaljujući posebnoj strukturi kapilarnog sistema u dijelu cirkulacijskog sistema, omogućena je neprestana izmjena tekućine i njenih sadržaja iz kapilara u međućelijski prostor i obrnuto. Pored pomenute vanćelijske tekućine i krvne plazme kao njenog sastavnog dijela izvan ćelija nalazi se i limfa - specijalna

tekućina koja cirkulira zatvorenim limfatičkim sistemom. S obzirom na to da su krv i limfa u dodiru preko vlastitih cirkulacijskih sistema, razumljivo da sadrže i neke slične elemente. Iako u limfi nema crvenih krvnih ćelija i disajnih pigmenata, može se naći kiseonik u topivom obliku kao i hranjive materije neopohodne ćelijama, tkivima i organima. Međutim, tu se nalaze ćelije bijele krvne loze.

KRV-SASTAV I FUNKCIJA ✕

Krv se u kičmenjaka sastoji od plazme i krvnih ćelija. Plazmu čini većinski maseni dio od oko 55%, a krvne ćelije sabijene u hematokritsku vrijednost (bez plazme) čine oko 45%. Osnovnu fazu plazme čini voda sa oko 91, 5%. U njoj su otopljene različite materije organske i anorganske prirode. Od neorganskih najzastupljeniji su hloridi, fosfate i bikarbonati, te joni natrija, kalija, kalcija i magnezija. Pored kristaloida od organskih molekula najviše ima hlorida. Od bjelančevina koje čine oko 7% plazme prisutni su albumini, globulini i fibrinogen. Najbrojniji i sa najmanjom molekularnom masom zastupljeni su albumini. Oni su odgovorni za kolooidno - osmotski pritisak plazme. Fibrinogen je bjelančevina zadužena za organizaciju ugruška u procesu zgrušavanja krvi. Konačno, globulini se dijele na: alfa, beta i gama frakcije. Alfa i beta globulini uključeni su u procese transporta različitih tvari dok se gama globulini dijele na podvrste, odnosno klase koje označavamo kao IgG, IgA, IgM, IgD i IgE. To je pet vrsta antitijela koje ubrajamo u bjelančevine plazme i odgovorni su za hormonalnu imunost domaćina. U krvne ćelije ubrajamo eritrocite, leukocite i krvne pločice ili trombocite.

Eritrociti ✕

Crvena krvna tjelešca ili eritrociti su ćelije bikonkavnog oblika čiji je glavni sastojak crveno obojena bjelančevina hemoglobin. Ovaj najvažniji sastojak eritrocita graden od hema i globina sadrži i željezo, te pomoću njega veže i kiseonik i ugljični dioksid u molekularnom obliku. Na taj način eritrociti služe za transport gasova od respiratornih organa do udaljenih ćelija, tkiva i obratno. Eritrociti se u odrasloj dobi stvaraju u koštanoj srži dok u embrionalno i fetalno doba njihova produkcija započinje najprije u žumanjčanoj vreći, pa slezeni i jetri, a pred sam porod započinje u koštanoj srži cjevastih i membranskih kostiju. Zreli eritrociti nemaju jezgru, odnosno gube je u toku dozrijevanja. Žive oko 120 dana i potom propadaju zaustavljanjem u uskim sinusima slezene koju stoga zovemo "grobljem eritrocita". Produkcijom eritropoteina iz specijalnih ćelija bubrega kontrolira se eritropoeza i nastanak novih eritrocita iz unipotentne matične ćelije - proeritroblasta koja se nalazi u koštanoj srži.

Trombociti ✕

Trombociti su sitne okrugle ili ovalne pločice do 4 μ m. Nastaju u koštanoj srži od megakariocita, veoma velikih ćelija homeopatskog reda koje same ne prelaze iz koštane srži u krv. Trombociti se pojavljuju poput pupoljaka na površini megakariocita, a zatim se odvajaju i otpuštaju u krv. Normalni broj trombocita u litri krvi iznosi 150 - 350 x 10⁹.

Mada trombociti nemaju jedro i ne mogu se dijeliti, oni, ipak, imaju mnoge funkcionalne osobine cijele. U njihovoj citoplazmi prisutni su aktivni faktori kao što su molekule aktina i miozina koje mogu izazvati kontrakciju trombocita. Tu su ostaci endoplazmatskog retikuluma i Golgijevog aparata koji sintetiziraju različite enzime i pohranjuju veliku količinu jona kalcija. Nadalje, enzimski sistemi koji mogu stvarati ATP i ADP kao i enzimski sistemi koji sintetiziraju prostaglandine, lokalne hormone koji uzrokuju mnogo različitih lokalnih tkivnih reakcija. Tu je i važna bjelančevina, nazvana faktor stabilizacije fibrina. Konačno prisutan je i odgovoran za zgrušavanje krvi faktor rasta koji može podstaknuti na diobu i rast vaskularne endotelne ćelije, ćelije vaskularnih glatkih mišića i fibroblaste, a rast ćelija koji zbog toga nastaje, pomaže u cjeljenju oštećenog zida krvnog suda. Na površini ćelijske membrane je glikoproteinski omotač zbog kojeg membrana lako prijanja uz oštećena područja zida krvnog suda naročito uz oštećene endotelne ćelije. Osim toga, membrana sadrži i velike količine fosfolipida koji mogu aktivirati jedan od sistema zgrušavanja krvi, tzv. "Unutrašnji" sistem. U membrani ima i enzima adenilat-ciklaze; koja kad se aktivira, u trombocitima izaziva stvaranje cikličkog AMP koji zatim potiče ostale trombocitne aktivnosti.

Prema tome, trombocit je veoma aktivan. Njegovo poluvijek u krvi je 8 - 12 dana, a na kraju tog razdoblja njegovi životni procesi počinju se gasiti. Trombociti se iz cirkulacije uklanjaju najčešće sistemom tkivnih makrofaga. Više od polovine trombocita odstranjuju makrofagi slezene, u kojoj krv prolazi mrežom gusto zbijenih trabekula. Stvaranje trombocitnog čepa je sposobnost začepljenja otvora trombocitima. Kada trombociti dodu u kontakt s oštećenom površinom suda, kao npr. s kolagenim vlaknima u zidu krvnog suda ili čak oštećenim endotelnim ćelijama, oni odmah drastično mijenjaju svoje karakteristike. Počinju bubriti i poprime nepravilne oblike sa zrakastim izdancima što strče iz njihove površine, postaju ljepljivi, te se zalijepe na kolagene niti i konačno luče velike količine ADP-a. Njihovi enzimi stvaraju tromboksan A, vrstu prostaglandina koju trombociti, također stvaraju, luče u krv. ADP i tromboksan A aktiviraju susjedne trombocite i čine ih ljepljivim, te se oni lijepe na prethodno aktivirane trombocite. Zbog toga na bilo kojoj pukotini krvnog suda, oštećenog zida ili ekstravaskularnog tkiva započinje aktivacija sve većeg broja trombocita koji se sakupljaju i stvore trombocitni čep. To je rahli čep, ali dostatan da zaustavi krvarenje ako je otvor na sudu mali. Tokom procesa zgrušavanja krvi stvaraju se (kasnije) fibrinske niti koje se pričvrste za trombocite formirajući čvrst i nepopustljiv čep.

leukociti *▷ ROČITO*

Bijele krvne ćelije ili leukociti dijele se na granulocite (neutrofili, bazofili i eozinofili) i agranulocite (monociti i limfociti). Sve vrste polimorfonukleara pored segmentirane jezgre sadrže i granule u citoplazmi pa ih zovemo i granulirani leukociti. Imena su dobili po afinitetu prema bojama u fazi bojanja ćelije. Tako u diferencijalnoj krvnoj ćeliji lako prepoznamo ćelije čija se granula boji crveno, kao *eozinofile*, a ona s plavim granulama kao *bazofile*. *Neutrofili* se boje neutralnom, ljubičastom bojom, jer njihove granule prihvaćaju plavu i crvenu boju. *Monocite* prepoznamo kao ćelije sa velikom mononuklearnom jezgrom. *Limfociti* su nakon neutrofila najbrojniji leukociti sa velikom jezgrom i vrlo malo citoplazme. Odgovorni su za imunološku reaktivnost domaćina. U borbi protiv stranih agensa poput bakterija, virusa ili čestica prašine prvu liniju odbrane domaćina čine neutrofili i monociti koji napadaju i uništavaju strano tijelo. Neutrofili su zrele ćelije koji mogu napasti i razoriti bakterije čak i u krvnom optoku. Međutim, krvni monociti su nezrele ćelije koje se slabo bore protiv stranih agensa. Ali, kada uđu u tkiva, započnu bubriti i povećavaju svoj promjer peterostruko. U svojoj citoplazmi pri tome umnožavaju lisosome i mitohondrije i tako prelaze u formu makrofaga koji su vrlo aktivni u borbi protiv stranog. Pored navedenog, bijele krvne ćelije a posebno neutrofili i monociti, odnosno, makrofazi pokazuju sposobnost ameboidne pokretljivosti tako da u jednoj minuti mogu prevaliti put trostruko duži od svojeg promjera. Tom procesu obično prethodi dijapedeza, odnosno, sposobnost marginacije uz zid krvnog suda i proces provlačenja kroz poru krvnog suda u međućelijski prostor. Ove su ćelije osjetljive i na hemotaksiju. Naime, u tkivima postoji čitav niz materija koje uzrokuju kretanje neutrofila i makrofaga u pravcu izvora te materije ili u suprotnom pravcu (hemotaktični agensi). Na taj se način neutrofili i makrofazi kreću prema suprotnom području, jer ih različite toksične materije iz upalnog područja privlače. Pored toga, najznačajnija funkcija neutrofila i makrofaga je fagocitoza ili sposobnost proždiranja. Da li će do fagocitoze neke materije doći li ne ovisi o selekciji. Naime, povećana hrapavost čestica izaziva fagocitnu reakciju. Nadalje, većina prirodnih tvari u domaćinu ima zaštitni proteinski omotač i niz zaštitnih mehanizama koji onemogućavaju fagocitozu. Konačno, sposobnost fagocita i jeste u tome da prepoznaje strane tvari, ćelije tkiva i organizme koje zatim napada i uništava. Često je proces fagocitoze potpomognut posredovanjem antitijela, bjelančevina stvorenih protiv stranih agenasa. Njihova je sposobnost da adheriraju na membranu bakterija i tako olakšavaju fagocitozu (proces prethodno opisan). Ovaj oblik zaštite od stranog tijela je nespecifičnog karaktera i vjerojatno evolucijski najstariji oblik samozaštite višestaničnih organizama od stranog tijela. Međutim, evolucijski gledano to nije bilo dovoljno i morali su se razviti specifični mehanizmi zaštite od stranog u kojem učestvuju i makrofazi, a podliježu reakcijama imunološkog sistema.

IMUNOLOŠKI SISTEM

Imunološki sistem štiti domaćina od uticaja stranih antigena, prioritarno mikroorganizama. U to su uključeni imunološki sistem kao i humoralna antitijela koja pomoću složenih odbrambenih mehanizama reagiraju sa stranim za domaćina nepoželjnim uljezom. Ćelije imunološkog sistema su Limfociti T i Limfociti B.

Ćelije imunološkog sistema

Limfociti T porijeklom su iz timusa gdje se stvaraju i specijaliziraju za funkcijske sposobnosti koje su vrlo različite. Na osnovu membranskih oznaka CD4 i CD8 svrstavamo ih u dvije subpopulacije. Oni limfociti koji nose CD4 molekule pripadaju T pomoćničkim limfocitima i obilježavamo ih kao CD4 + ćelije. U CD8+ ćelije ubrajamo T citotoksične limfocite koji su odgovorni za efektorski krak imunološke reakcije i zaduženi su za ubijanje stranog tijela. Tako CD4+ ćelije imaju sposobnost prepoznavanja stranog tijela u kontekstu antigena specifičnih za jedinku unutar vrste ili druge vrste, ali i za daljnju organizaciju efektorske faze imunološkog odgovora. S druge strane, CD8 + ćelije odgovorne su upravo za ćelijski tip imunološke reaktivnosti prema stranom. Limfocite T nalazimo u limfnim čvorovima i slezeni dok ih u perifernoj krvi ima od 55-70% svih limfocita. Preostalu populaciju limfocita čine B limfociti koji se pretvaraju -transformišu u plazma ćelije čiji produkti su antitijela (immunoglobulini), već ranije opisano u sastavu krvne plazme u frakciji gama globulina. Međutim, možemo ih naći i na površini samih B limfocita gdje služe prepoznavanju antigena. Osim antitijela ove ćelije na površini ispoljavaju i druge molekule poput receptora za komplement i Fc receptora. Interakciju između T limfocita i B ćelija potpomažu molekule CD40 koje se, također, nalaze na membranama B limfocita i čitav niz solubilnih faktora koji se ubrajaju u citokine, odnosno peptide koji omogućavaju komunikaciju među ćelijama.

Tokom imunološke reaktivnosti organizma uključene su i druge ćelije poput NK ćelija (natural killer) ili prirodnih ćelija ubice. Ispoljavaju niz karakteristika. Sposobne su same da prepoznaju strano tijelo i da ga unište. U cirkulaciji ih nalazimo od 10% svih bijelih krvnih ćelija. Broj i funkcija im se mijenja u različitim životnim okolnostima.

Antigeni

Antigeni su složene molekule koje imunokompetentne ćelije u organizmu prepoznaju kao tuđe. Međutim, ne izazivaju uvijek svi antigeni jednake reakcije organizma. Antitijela ne prepoznaju čitavu molekulu antigena već samo one

dijelove koji zovemo *antigenske determinante* ili *epitopi*. To su područja odgovorna za reakciju antigen-antitijelo. Broj antigenskih determinanti nekog antigena određuje njegovu reakciju. Specifičnost determinante, odnosno antigena određena je slijedom aminokiselina koje izgrađuju proteinsku strukturu. Najpogodniji i najsnažniji antigeni su oni koji pripadaju proteinima i koji imaju molekularnu masu veću od 10 000. Vrlo male molekule koje reaguju sa antitijelima ali same za sebe ne mogu potaknuti njihovu proizvodnju zovemo *haptanima*. Međutim, ukoliko se vežu sa nekim prenosiočcem mogu provocirati nastanak antitijela usmjerenih protiv tog istog haptena. Uočeno je da različite životinjske vrste različito reagiraju na antigene. Tako kunići, zamorčad i miševi reagiraju vrlo dobro u proizvodnji antitijela na izloženi antigen. U terapijske svrhe za proizvodnju antigena najčešće se koriste konji. Osim veće molekularne mase za dobru imunogeničnost nekog antigena važan je stepen različitosti koji što je veći, izaziva snažniji i brži odgovor domaćina. Konačno, dobru antigeničnost osigurava složenija struktura stranih molekula. Od najpogodnijih prirodnih antigena pored pomenutih proteina vrlo su važni i polisaharidi dok čisti lipidi ne pokazuju imunogeničnost kao ni nukleinske kiseline.

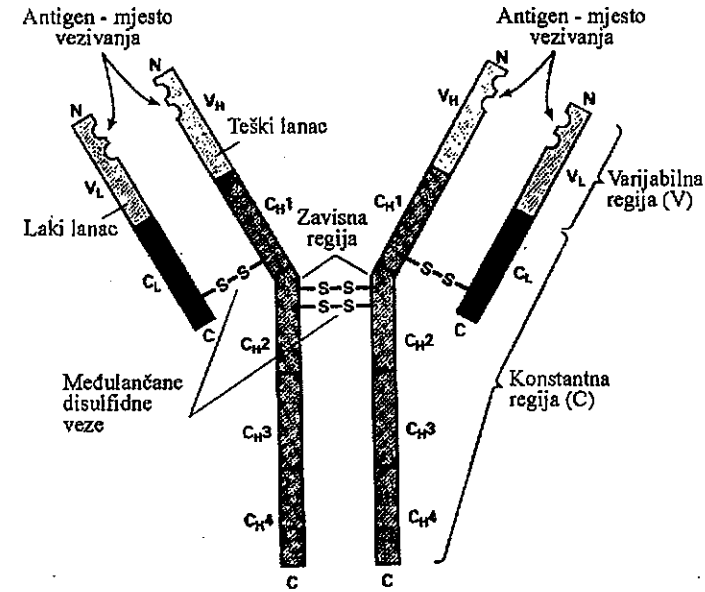
Antitijela- sinteza i molekulska struktura

Antitijela (protutijela) su glikoproteini koji se stvaraju nakon kontakta imunološkog sistema sa antigenima s kojima kada se stvore, imaju sposobnost specifičnog vezivanja. Antitijela pripadaju serumskoj frakciji gamaglobulina ili imunoglobulina. Osim u plazmi nalazimo ih u vanćelijskoj tekućini, na površini limfocita te egzokrinim sekretima žlijezda. Imunološka reaktivnost posredovana antitijelima zove se humoralna imunost. Antitijela sintetiziraju plazma ćelije, krajnji zreli oblici diferencijacije B limfocita. Osnovna je struktura svim atitijelima zajednička, ali velikom varijacijom primarnog slijeda aminokiselina po specifičnosti konfiguracije postaju ekstremno različita.

Antitijela se u molekularnoj građi po morfologiji i funkciji sastoje od dva dijela. Molekula koja ima oblik slova Y na krajevima dvaju krakova sadrži ukupno dva fragmenta (varijabilne regije) koji su sposobni za specifično vezivanje dviju molekula antigena. Preostali broj antitijela zovemo Fc fragment, a dobio je ime po konstantnosti grade(konstantne regije) kojom su uvjetovana različita biološka i funkcijska svojstva antitijela.

Poput ostalih serumskih bjelančevina i antitijela pokazuju sposobnost razdvajanja u električnom polju. Elektroforezom je dokazano da bjelančevine seruma ne samo da nisu homogene već da i unutar gama globulina postoje različitosti. Tako je utvrđeno imunoelektroforezom i radioimunološkim metodama postojanje 5 klasa (ili razreda) imunoglobulina i to: imunoglobulina

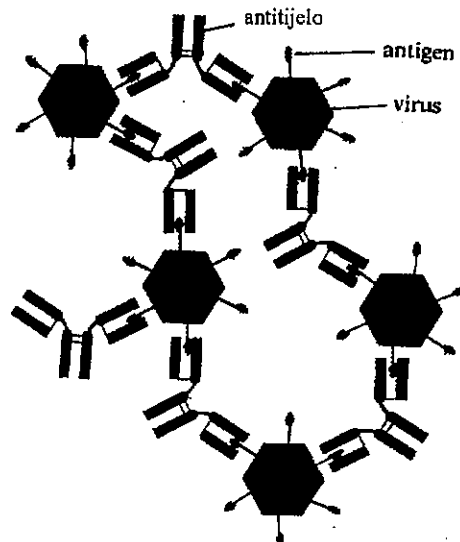
G (IgG), imunoglobulina M (IgM), imunoglobulina A (IgA), imunoglobulina D (IgD) i imunoglobulina E (IgE). Sve molekule antitijela sastoje se od jedne ili više vrlo sličnih četveročlanih jedinica. Osnovna jedinica tzv. monomer sastoji se od dva teška i dva laka lanca povezanih međusobno disulfidnim vezama, odnosno kovalentnim i nekovalentnim međulančanim vezama. (sl. 15.1)



Slika 15.1 Struktura antitijela(IgM monomera). Dva laka (L) i dva teška (H) lanca su vezana disulfidnim vezama. Svaki tip lanca ima varijabilne regije (VL i VH) karakteristične za svaku amino kiselinu koja gradi IgM molekulu. Laki lanac ima jednu konstantnu regiju (CL) dok teški lanci imaju četiri konstantne regije (CH). U svakoj IgM molekuli, konstantne regije sekvence amino kiseline su iste. Varijabilne regije na krajevima imaju mjesta vezivanja antigena.

Imunoglobulini koji se sastoje od više četveročlanih osnovnih jedinica zovu se polimerima imunoglobulina. Imunoglobulini klase IgG, IgD i IgE su monomeri dok IgA može biti monomer, dimer, trimer ili tetramer. Konačno, najveći od njih IgM imunoglobulin je pentamer sa pet osnovnih jedinica. Nadalje, molekule antitijela globularnog su i eliptičnog oblika. Odnosno, savijene su na karakterističan način tvoreći kuglaste (globularne) strukture nazvane domenama. Tako se laki lanci sastoje od dviju domena koje se nazivaju varijabilna domena (VL) i konstantna domena (CL). Teški lanac svih imunoglobulina sastoji se od jedne varijabilne regije (VH) i po tri (IgG, IgA i IgD) odnosno četiri (IgM i IgE) konstantne regije (CH). Varijabilne regije lakog i teškog lanca (VL i VH) nalaze se na N-terminalnom kraju fragmenta Fab čineći vezno mjesto za antigen, odnosno paratop. Sile vezivanja antigena i antitijela su slabe, reverzibilne i nekovalentne (sl. 15.2).

Slika 15.2 Aglutinacija između antitijela i antigena. Svaka molekula antitijela može vezati dvije molekule antigena; otuda vezivanje bakterijskih ili virusnih antigena drži ih u grupi. Ovdje su antigeni na površini proteina ili karbohidrata virusa. Aglutinacija pomaže u razgradnji veze antitijelo-bakterija ili virusa do makrofaga, ubija ćelije, ili komplement-sistem proteina.



Razlikuju se tri grupe antigena u odnosu na slijed amino kiselina u lancima, mogu se definisati tri nivoa heterogenosti antitijela. Izotipske determinante iste su, tj. zajedničke antigenske determinante imunoglobulina jednake u svih pripadnika iste vrste, alotipske determinante su drugačije ali redovno prisutne male antigenske razlike između identičnih imunoglobulina istog izotipa, ali dviju različitih skupina jedinki unutar iste vrste. Konačno, idiotipske determinante jesu vlastite antigenske determinante specifične za skupinu potpuno istovrsnih antitijela usmjerenih protiv određenog antigena koju je proizveo potpuno isti klon plazma ćelija.

Neke karakteristike pojedinih imunoglobulina ✕

IgG je najzastupljeniji serumski imunoglobulin, pa unutar krvne plazme zdravog čovjeka čini oko 3/4 ukupnih imunoglobulina. On je glavni imunoglobulin koji se stvara u sekundarnoj reakciji (ponovnom izlaganju istom antigenu), a najvažnije su mu funkcije neutraliziranje virusa, bakterijskih toksina, aktiviranje komplementa i opsonizacija kojom se pospešuje proces fagocitoze. Imunoglobulin IgG jedini prolazi kroz placentu tokom trudnoće i na taj način plodu na početku osigurava prirodno stečenu pasivnu imunost kojom je zaštićen od infekcija tokom prvih nekoliko mjeseci života. IgA imunoglobulin je po količini na drugom mjestu u plazmi, ali ga zato ima značajnije u vanćelijskim prostorima, a posebno u vanjskim sekretima. Tako ga ima u slini, suzama, sekretu probavnog i respiratornog sistema, vaginalnom sekretu, nazalnom sekretu i u kolostrumu. IgM imunoglobulin čini oko desetinu ukupnih serumskih antitijela, a zbog velike molekulske mase (pentamer sa

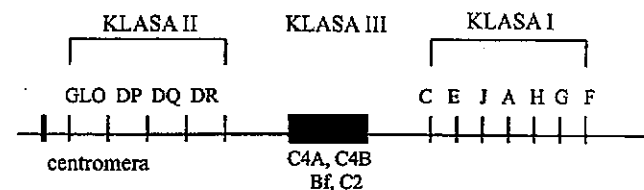
m.m. 900 000) često se naziva makroglubulinom. Prvi se pojavljuje u primarnoj reakciji. Vrlo je prijemčljiv za komplement. Zbog peterovalentnosti vrlo djelotvorno sudjeluje u procesu aglutinacije. Međutim, najvažnija uloga očituje se u zaštiti od bakterijemije. Konačno, bogato je zastupljen na površini limfocita B poput imunoglobulina IgD kojeg u serumu ima samo u tragovima. Antitijela IgE u serumu ima još manje, a ubrajamo ih u reagine ili antitijela koja posreduju u atopičnim alergijskim reakcijama. Čvrstim vezivannjem preko Fc fragmenta za površinu mastocita i bazofila uz vezivanje antigena dovode do degranulacije mastocita i oslobađanja medijatora anafilaksije. Tako dolazi do manifestiranja alergijske reakcije.

KOMPLEKS GENA GLAVNOG SISTEMA TKIVNE SRODNOSTI-PODUDARNISTI (HLA-sistem)

Kompleks gena nazvanih glavnim sistemom tkivne srodnosti, major histocompatibility complex (MHC); nazvan u čovjeka humanim leukocitnim antigenom (HLA) otkrio je 1952. Dausset. HLA geni su smješteni na kratkom kraku šestog kromosoma na sekvenci 6p21.3. gdje je smješten niz usko vezanih lokusa. (sl. 15.3).

Humani MHC, ovisno o haplotipu, zauzima dužinu od oko 3, 6 Mb na kratkom kraku 6. kromosoma. Regiju čini oko 224 gena s milion parova baza što je ekvivalentno s 0, 12% humanog genoma. Mnogi od tih gena kodiraju stvaranje proteina koji su odgovorni za imunološki nadzor. Između ova 224 identificirana genska lokusa funkcija 128 gena još je uvijek nepoznata. Više od 10% gena ima važnu ulogu u biologiji imunog sistema. Bitne su četiri funkcionalne kategorije koje su kodirane genima unutar MHC regije. a) razgradnja antigena i njegova prezentacija preko gena klase I i II; b) urođena imunost, reakcija na upalu i regulacija imunosti preko gena klase III; c) međućelijska saradnja preko MHC receptora i veznih mjesta; d) funkcija gena koja nije vezana uz imunost.

S obzirom na različite genske porodice humani MHC je podijeljen u tri genske regije: klasu I, klasu II i klasu III. Svi geni klase I zauzimaju telomerično 2Mb, klase II centromerično 1 Mb; a klasa III smještena je s 1 Mb između njih. Klasa III ima najveću gensku gustoću no mnogi od tih gena nisu uključeni u imuni sistem. Mnogi geni klase I i II su vrlo polimorfni, a najveći polimorfizam postoji u dijelu koji kodira hipervarijabilnu regiju kojom se veže strani peptid.



Slika 15.3 Dio kratkog kraka humanog kromosoma 6 s položajem gena klase I, II i III

Geni MHC regije pokazuju veliki polimorfizam, kako u ljudi, tako i u drugih sisavaca, te se pojedini aleli u više od 80-90% slučajeva iskazuju u heterozigotnom obliku. Postavljene su četiri hipoteze koje pokušavaju objasniti tako visok stupanj polimorfizma: visoke stope mutacije unutar MHC regije, moguća konverzija ili interlokus genska izmjena, overdominantna selekcija i selekcija ovisna o frekvenciji.

GENSKA REGIJA KLASE I ✕

Regija klase I zauzima dužinu od 2 Mb i sadrži 18 gena sa 826 alela, od toga je 6 gena i 12 pseudogena orijentiranih prema telomeri. Regija uz klasične HLA-A, -B i -C gene sadrži iHLA, -E, -F, -G, -H, -J, -K, -L, MICA i MICB i veliki broj pseudogena i drugih gena nepoznate funkcije. Ti geni se iskazuju u različitoj količini na tkivima. Neka tkiva iskazuju vrlo malu ili jedva vidljivu količinu proteina klase I. Ta tkiva uključuju spermu, ovocite, placentu i stanice srednjeg živčanog sistema. Manjak ekspresije klasičnih antigena klase I na fetu-maternalnoj barijeri izgleda olakšava preživljavanje fetalnog tkiva u majci. Količina HLA-C molekula na tkivima je oko deset puta manja nego molekula A i B. Bez obzira na to HLA-C molekule su funkcionalno aktivne i one su prva meta koju prepoznaju prirodno ubilačke ćelije (NK). HLA-G molekule prisutne su na placentarnom tkivu i njihova prisutnost povezuje se sa preživljavanjem fetusa. Regija klase I sadrži još mnoge druge gene ili genske fragmente. Među tim genima HLA-H, -J i -L su pseudogeni. Regija klase I sadrži još niz gena koji ne pripadaju MHC porodici.

Struktura antigena klase I.

Rutinskim određivanjem HLA antigena može se odrediti tri HLA lokusa klase I (HLA-A, -B i C) i tri lokusa klase II (HLA-DR, -DQ i DP). Kako je u somatskim ćelijama broj hromosoma diploidan to se može odrediti 12 antigena. Tih 12 antigena nasljeđuje se kodominantno i mogu se dokazati određenom metodom tipizacije. HLA antigene kodiraju vezani geni koji su strukturno i funkcionalno vrlo slični. Ovi antigeni su prisutni u svim ćelijama s jedrom te u trombocitima. Ovi antigeni čine identifikacijsku kartu organizma i omogućavaju organizmu prepoznavanje stranog tijela.

Imunogenetske studije pokazuju da je lokus B jako polimorfan. Imunološki je najznačajniji unutar regije klase I. Zatim slijedi HLA-A i C lokusi. Ostali lokusi nemaju HLA-E, F, G, H, J, K i L ulogu u prezentaciji peptida.

GENSKA REGIJA KLASE II ✕

Genska organizacija klase II mnogo je kompleksnija. Unutar nje nalaze se 22 gena s 588 poznatih alela i fragmenata pseudogena. Organizirani su u sedam podregija: HLA-DR, DQ, -DP, DOA, DOB, DM i DX. Ova regija zauzima 0.8 Mb kratkog kraka 6. hromosoma. Svaka podregija ima gene koji kodiraju sintezu A i B lanca.

Regija klase II sadrži više usko vezanih gena za B lanac i jedan za A lanac. Sedam definiranih gena klase II DPB2, DPA2, DRB2, DRB6, DRB7, DRB9 i DRB su pseudogeni koji sadrže neku mutaciju ili jaku deleciju koja pak sprečava aktivaciju gena i njegovu transkripciju. A i B lanac HLA-DQ gena jako je polimorfan. Polimorfizam izvan hipervarijabilne regije na drugom egzonu nije do kraja istražen. Polimorfizam HLA-DP je, također, izražen. Testovi tipizacije daju nam ograničen broj specifičnosti u ovoj regiji, svega šest od DP1 do DP6, a dokazano je i postojanje 116 alela. Kako u DQ tako i DP regija sadrže po par pseudogena. U regiji klase II postoji samo jedan gen koji nije vezan uz imuni sistem. To je RING3 čija je uloga još uvijek nepoznata.

Struktura antigena klase II.

Antigeni klase II su glikoproteini vezani za membranu. Nalaze se na imunokomponentnim ćelijama koje uključuju B limfocite, makrofage, endotelne ćelije i aktivirane T limfocite. Ekspresija ovih antigena na ćelijama na kojima se inače ne nalaze stimulirana je citokinima. Pomoćnički T limfociti (CD4+ ćelije) uključene su u prepoznavanje antigena klase II. Funkcija antigena klase II je omogućavanje imunološkog odgovora te aktivacija B limfocita, makrofaga i drugih ćelija uključenih u imunološki odgovor.

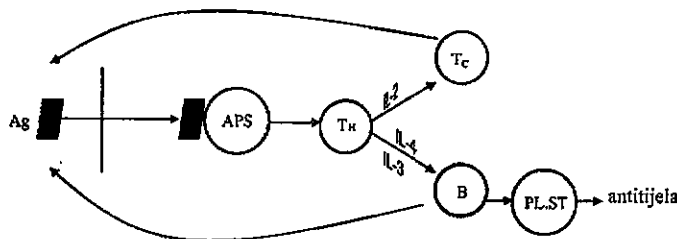
Antigeni klase II građeni su od jednog alfa i jednog beta lanca. Glukoprotein ima veličinu od oko 34 kD, a 30 kD. Lanci su međusobno povezani nekovalentnim vezama. Ekstracelularni dio lanca sadrži 229 amino kiselina a lanac 237. Molekula antigena građena je od tri dijela. Prvi je ekstracelularni dio koji je hidrofilan, transmembranski hidrofoban i intracelularni hidrofilan. Transmembranski i intracelularni dio lanca fiksira molekulu u ćelijsku membranu. Klasa II molekula u svom potpunom obliku nalaze se na površini ćelija kao heterodimeri s dva transmembranska glikoproteina. Sintetizira se u endoplazmatskom retikulumu.

GENSKA REGIJA KLASE III ✕

Ova regija smještena je na hromosomu 6. Između genske regije klase I i II. Zauzima dužinu od 1 Mb i sadrži oko 62 gena. Geni ove regije C4, C2 i Bf uključeni su u imunološki odgovor organizma kao i članovi porodice tumor nekroza faktora (TNF), te Hsp70 (heat shock protein). Hsp70 ima ulogu aktivatora urođenog imunog sistema, ali, također, može sudjelovati kao transportni peptid od tumora i virusom zaražene ćelije te potaknuti aktivaciju imunosti posredovane T citotoksičnim limfocitima. Molekula C4A nosi Rogers antigen, a C4B Chido antigen i oba se vežu na površinu eritrocita osoba koje posjeduju taj gen. HLA sistem sastoji se od multiplih alela. Frekvencija svakog pojedinog alela u nekoj populaciji je jako mala, a aleli se međusobno razlikuju u oko 30 amino kiselina. Ove dvije činjenice čine osnovu MHC polimorfizma. Svaka je vrsta sačuvala vlastiti MHC polimorfizam. To je vjerovatno posljedica toga što MHC geni imaju jaku sklonost mutacijama.

IMUNOLOŠKA REAKCIJA

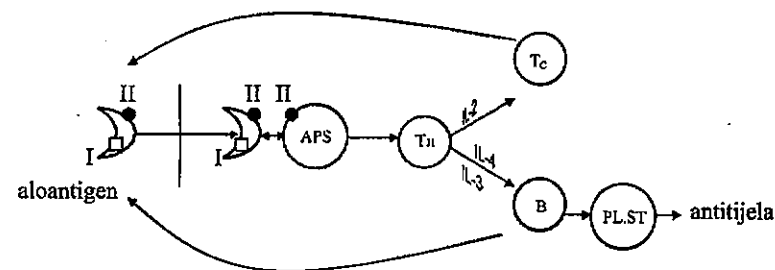
Kada strano tijelo kao antigen prodire u organizam domaćina uslijediti će imunološki odgovor. Čelije koje prve prepoznaju i obrađuju antigen zovu se antigen prezentirajuće ćelije (APC). U tu grupu ćelija ubrajamo prije svega makrofage ali i Langerhansove ćelije u koži ili pak astrocite u živčanom sistemu. Bilo koja antigen prezentirajuća ćelija prilazi antigenu, veže se na njega i po principu fagocitoze prepoznaje i proždire u fazi uništavanja. Kako se strana tijela poput bakterija, ukoliko se nadu u povoljnim uslovima, mogu izuzetno brzo razmnožavati (u povoljnim uslovima od jedne bakterije za 20 minuta običnom diobom nastaju dvije) važno je ne samo uništiti fagocitiranog uljeza već osigurati i daljnji tok odbrane. Zato nakon prepoznavanja i obrade antigen prezentirajuće ćelije prosljeđuju informaciju o stranom antigenu sljedećoj ćeliji u nizu imunološke reakcije - T pomoćničkoj ćeliji (TH). Što u direktnom kontaktu s njim, što lučenjem solubilnih faktora poput interleukina - 1 APC prenosi informaciju o stranom ćeliji organizatoru imunološkog odgovora - T pomoćničkom limfocitu. Ovaj lučeći solubilne faktore potiče efektorsku fazu imunološke reakcije u dva smjera. Lučeći interleukin - 2 pokreće ćelijsku imunost preko umnožavanja i aktivacije T citotoksičnih limfocita. S druge strane T pomoćničke ćelije oslobađaju interleukin - 4 i interleukin - 5 posredstvom kojih se stimulira preobrazbu B limfocita u plazma ćelije i sekreciju antitijela usmjerenih prema antigenu koji je provocirao imunološku reakciju. Time je potaknut i humoralni tip odgovora na strano tijelo. Učinak T citotoksičnih limfocita i humoralnih antitijela iskazivat će se sve dok se antigen ne uništi i prestane inicijalna faza imunološke reakcije (sl. 15.4).



Slika 15.4 Shematski prikaz imunološke reakcije nespecifičnog tipa

Aloreaktivnost je imunološki odgovor domaćina na aloantigene, odnosno antigene druge jedinice unutar iste vrste (sl. 15.5). Ksenoreaktivnost je odgovor na ksenoantigene koji potječu od jedinice druge vrste. Kao što je ranije pomenuto, aloantigeni su ćelijska obilježja kodirana genima koji pripadaju glavnom sistemu tkivne srodnosti ili glavnom sistemu tkivne podudarnosti. Imunološka reakcija na aloantigene specifičnog je oblika i usmjerena je na tačno određenu aloantigensku karakteristiku. U principu, imunološka reakcija

teče poput one u nespecifičnoj imunološkoj reaktivnosti, ali je faza prepoznavanja stranog aloantigena strogo specifična. Naime, i u ovom obliku odgovora domaćina na strano prepoznavanje vrše antigen prezentirajuće ćelije i to na vrlo sofisticirani način. Kao što je ranije opisano, na površini antigen prezentirajućih ćelija poput makrofaga nalazimo ispoljene njene vlastite aloantigene kodirane iz vlastitog MHC kompleksa. Dakle, u kontekstu vlastitih aloantigena razreda II SPS sposobne su razlučiti različitost aloantigena klase II na prispjelom uljezu. Što je razlika u aloantigenima klase II veća to će aloreaktivnost na njih biti brža i snažnija. Obradene karakteristike aloantigena APC dalje predaje T pomoćničkim ćelijama direktnim kontaktom i lučenjem solubilnih faktora. Kao organizatori specifične imunološke reakcije T-helperi lučeći svoje solubilne faktore pokreću efektorsku fazu preko aktiviranja i umnožavanja T-citotoksičnih ćelija. S druge strane podstiču i usmjeravaju humoralnu imunost stimulirajući B limfocite odnosno, plazma ćeliju na sekreciju specifičnih antitijela.



Slika 15.5 Shematski prikaz aloreaktivnosti gdje APC u kontekstu vlastitih aloantigena klase II prepoznaje strano

GENETSKA DETERMINACIJA KRVNIH GRUPA U ČOVJEKA ABO-SISTEM

Najbolje proučeni sistem genetske kontrole supstanci krvnih grupa kod čovjeka je ABO sistem. Pitanja iz ovog područja omogućila su otkrivanje uzroka aglutinacije eritrocita u primaocu nakon fuzije. Landsteiner i suradnici (1900.) na osnovu svojih eksperimentalnih radova otkrili su četiri grupe ljudi prema tome da li posjeduju na eritrocitima jednu, dvije ili više antigenskih supstanci. Ove grupe su obilježene sa A, B, O i AB. Dakle, eritrociti posjeduju ova tri srodna antigena. Izraziti antigen su A i B. Antigen O skoro je bez efekta. Ispitivanja su pokazala da eritrociti posjeduju, također, čitavu seriju sličnih aglutinogenih tipa A/A1A2A3A4 itd/. Postoji, također, i serija grupe B/B1 B2 B3 B4 itd/. Aglutinogeni sposobnost svakog člana serije opada sa njegovim udaljavanjem od prvog člana A1 ili B1.

Antigene ABO sistema kontroliraju serije multiplih alela, smještenih u autozomnim kromozomima. ABO sistem determinira serija od tri alela IA, IB, IO. Geni IA i IB determiniraju antigene A i B. Za gen IO pretpostavljalo se da je recesivan, međutim, danas se zna da ni jedan od ova tri alela ne dominiraju (kodominirani geni). Svi ovi geni imaju svoje alelne varijante koje smo prethodno naveli. Nasljeđivanje ovih grupa vrši se po Mendelovim pravilima. Na osnovu čega je moguće zaključiti i da osobe krvne grupe A ili B mogu biti ili homozigotne ili heterozigotne dok za krvnu grupu O su samo homozigotne. Osobe sa različitim krvnim grupama fenotipski međusobno se ne razlikuju.

Osobe krvne grupe O u serumu sadrži anti -A i anti -B antitijela, pa prema tome mogu da pri transfuziji prime krv samo od osoba O krvne grupe. S druge strane, oni su "univerzalni" davatelji krvi, jer ne sadrže A i B antigene.

Genotipovi, fonotipovi i tipovi gameta ostvareni kombinacijom 4 alela IA, IB, IO, i O

GENOTIPOVI	FENOTIPOVI	GAMETE	GENI
A ₁ A ₁	A ₁	A ₁	I _A
A ₂ A ₂	A ₂	A ₂	I _B
BB	B	B	I ₀
A ₁ A ₂	A ₁	A ₁ ili A ₂	
A ₁ B	A ₁ B	A ₁ ili O	
A ₂ B	A ₂ B	A ₂ ili B	
A ₂ O	A ₂	A ₂ ili O	
B0	B	B ili O	

Genotipovi i fenotipovi ostvareni kombinacijom tri para Rhesus alela, D - d, C - c i E - e

GENI	ALTERNATIVNI SIMBOLI
CD	R ¹
cde	r ²
cDE	R ⁰
cDe	R
cde	r ²
cdE	r ²
CDE	R _y
CdE	r

Genotipovi i fenotipovi X - vezanog sistema krvne grupe, Xq

Fenotipovi	Xq (a+): Xq(a-)
Geni	Xqa: Xq
Genotipovi - žene	Xqaxqa : XqaXq: XqXq
Genotipovi muškarci	XqaY : XqY
Antitijelo	Anti - Xqa
Antigen	Xqa

Takoder, osobe AB krvne grupe, sadrže A i B antigene, mogu da prime svaku krvnu grupu krvi, "univerzalni" primaoci. Ustvari, ako su antitijela normalno prisutna u krvi, što znači ne javljaju se kao odgovor na strane antigene, označeni su kao "normalna" anti -A i anti - B. Po kemijskoj prirodi pripadaju IgM (imunogamaglobulinima). "Imuno" anti - A i anti - B antitijela se javljaju kao odgovor na prisutne strane antigene i pripadaju IgG imunogamaglobulinima.

Rh-SISTEM

Antigen Rh sistema prvi puta je otkriven u eritrocitima Rhesus-majmuna. U pogledu genetske terminacije sinteza Rh - sistema antigena (a otkriveno ih je oko 30) kontroliraju tri blisko locirana gena. Geni su obilježeni D, C i E. Svaki ovaj gen ima više alelnih varijanti, npr. gen D: D, Dv i dr. Gen C se javlja u varijantama: C, Cv, Cn, Cx i c. Gen E ima alele: E, Ew, Ev i c. Otuda je broj različitih fenotipskih kombinacija izuzetno velik. Najaktivniji, najimunogeniji je D antigen. On je aktivan u stvaranju Rh antigena. Sve osobe koje sadrže pomenuti antigen na svojim eritrocitima (DD) su homozigotne ili (Dd) heterozigotne dok je genotip osoba dd - homozigotan recesivan.

Nasljeđivanje Rh faktora, takoder, se vrši po Mendelovim pravilima. U braku između Rh- (negativne) majke i Rh+ (pozitivnog) oca, gdje otac ima genotip DD, svi će potomci F1 generacije biti Rh pozitivni sa genotipom Dd. Međutim, ako je genotip Rh pozitivnog oca Dd (heterozigotan), samo polovina potomaka u F1 generaciji posjedovati će Rh+ antigen, a druga polovina imati će Rh- antigen. Za proces embriogeneze bitno je i značajno da li će biti prisutan ili odsutan gen koji determiniše Rh faktor. Embrio nastao od Rh+ oca i Rh+ majke, najčešće je Rh+. Međutim, ako je embrio Rh- (negativan), Rh- faktor iz fetusa preko placente prodire u organizam majke. Rh- antigen u majčinom organizmu inducira produkciju antitijela koja reaguju na Rh antigen. Stvorena antitijela istim putem iz majčinog organizma prelaze u organizam fetusa i mogu reagirati sa njegovim eritrocitima. Kod prvog poroda obično ne dolazi do posljedica, jer je količina majčinih antitijela u fetusu mala da bi dovela do težih posljedica. Međutim u drugoj trudnoći količina

antitijela u krvi majke naglo se povećava uslijed novopristiglih Rh - antigena ploda. Nakon toga, iz majčinog organizma mnogo veće količine antitijela prelaze u fetus i u njegovoj krvi dovodi do hemolitičkih poremećaja, koagulacije koja često rezultira jakom anemijom (eritroblastozis fetalis), a često dovodi i do povrede moždanih kapilara i obustave rada srca. Svaka daljnja trudnoća izaziva veliko nagomilavanje antitijela koja su u stanju da prouzrokuju smrt novorođenčeta ukoliko odmah nakon poroda brzom transfuzijom ne bude zamijenjena cjelokupna krv.

MNSs-SISTEM

Drugi otkriveni sistem krvnih grupa je MN (Landsteiner Levine, 1928.). MN sistem krvnih grupa determinira jedan genski lokus sa dva alternativna alela. To znači da osoba M - krvne grupe ima genotip MN, a na eritrocitima se nalaze M - antigeni. U serumu ovih osoba nalaze se N - antitijela koja aglutiniraju M - antigene. Osobe MN krvne grupe imaju genotip MN, a u krvnom serumu ne sadrže ni anti-M ni anti-N antitijela. Osoba krvne grupe N imaju genotip NN, na eritrocitima N - antigene, a u serumu se nalaze M-antitijela koja aglutiniraju N-antigene.

Gen koji determinira njihovo formiranje smješten je, također, u autosomima. Javlja se u obliku serije alela koji determiniraju podgrupe sistema MN. Postoji 16 alela u seriji a najzastupljeniji su: MS, Ms, NS, Ns. Mogu dati 9 fenotipova, a u grupama ne postoji dominantnost. Kada se samo promatraju faktori M i N, nasljeđivanje je jednostavno, po Mendelovim pravilima. Oni zavise od 2 alelomorfina gena, M i N, neovisni su od ostalih lokusa i oba se manifestiraju kada se nađu zajedno u jednoj količini u genotipu. Odnos fenotipova i genotipova je, dakle, genotipovi: M/M, M/N, N/N ; fenotipovi: M, MN, N.

Neposredno uz genski lokus MN - sistema nalazi se genski lokus sa alelima S i s koji determiniraju S i s - antigene. Za faktor S dokazano je da je učestaliji kod osoba nosilaca faktora M nego kod osoba koje ga nemaju. Ustanovljena je veza između MN i S-sistema. Naime, dokazana je genetska veza u brojnim genealoškim stablima. Npr. roditelj MN koji je heterozigotan M/N, također, je heterozigotan S/s. Roditelj M koji je homozigotan M/M, također, je homozigotan za Ss/s., također, se smatra da je S faktor usko povezan sa MN u procesu prenosa na potomstvo. Možemo pretpostaviti da lokuse MN i S nosi isti kromosom. Onda možemo gene M i N podijeliti na: - gen M može sadržavati S: MS; - gen M može sadržavati s: Ms; - gen N može sadržavati S: NS- gen N može sadržavati s:Ns.

Ako se izdvojeno promatraju geni S i s, očito je da predstavljaju jedan alelomorfni par gena. Izuzetno su rijetki slučajevi da osobi nedostaju faktori S ili s. Dakle, osobe koje sadrže M-antigene imaju dva puta veću šansu da će imati S - antigen nego osobe N - krvne grupe. S druge strane osobe N krvne grupe u 97% slučajeva sadrže s - antigen. Znači, alel S dominira u određenom stupnju nad alelom s iako je ovaj alel češći (90%).

Otkrivene su tri grupe autosomnih gena, blisko lociranih (vezanih) koji imaju ulogu u determinaciji imunoloških svojstava uopšte. Prva grupa gena je obilježena sa Lu - Se. Prvi gen determinira sintezu specijalnog aglutinogena, a gen Se uvjetuje rastvorljivost u vodi antigena ABO. Druga je grupa obilježena sa Rh i El. Prvi gen je odrednica Rh faktora, a drugi gen uvjetuje oblik eritrocita. Treću grupu čine geni N koji determiniraju pojavu defekta nokata i čašice u koljenu i gen koji determinira ABO sistem.

HEMOGLOBINOPATIJE I IMUNOGLOBINOPATIJE ERITROCITO

To su bolesti koje se javljaju kao posljedica anomalija molekula hemoglobina. Jedan od klasičnih primjera *hemoglobinopatija* koji ukazuje na stepen složenosti između primarne genetske strukture i konačne fenotipske ekspresije jeste oboljenje (prethodno opisano) nazvano anemija srpastih ćelija. Ova bolest se uglavnom sreće u Africi, nekim područjima Mediterana i u Indiji. Osobe pate od hemolitičke anemije i često umiru u djetinstvu. Poznato je da se hemoglobin (HbS) razlikuje od hemoglobina HbA. Ustanovljeno je da se razlika između ova dva hemoglobina odnosi na β lanac. Naime, tačnije rečeno, u šestoj "poziciji" u β lancu gdje se normalno nalazi glutaminska amino kiselina sada se nalazi amino kiselina valin. Supstitucija amino kiseline je posljedica mutacije na DNA.

Zna se da je defektni hemoglobin manje solubilisan u odnosu na normalni hemoglobin i pokazuje tendenciju kristalizacije, što dovodi do deformacije eritrocita koji tada poprimaju srpasti oblik. U ovom slučaju organizam uništava izmjenjene srpaste ćelije, što dovodi do teške anemije. Ovo je recesivno oboljenje što znači da se manifestira u homozigotitetu. Druga hemoglobinopatija je HbC oboljenje, također, se sreće najčešće u Africi. Radi se o tipu mutacije koja se odnosi, također, na β lanac hemoglobina, u istoj "poziciji" time što se ovdje umjesto normalne glutaminske kiseline nalazi aminokiselina serin. Neke hemoglobinopatije uzrokovane su poremećenom sintezom α i β lanaca u odnosu na normalnu dužinu. Naime, i RNA za Hb je duža, pa se može reći da se ove anomalije javljaju kao posljedica mutacija s minimalnim (završnim) kodonom. Treća grupa hemoglobinopatija podrazumijeva oboljenja uzrokovana poremećajima sinteze globulinskih lanaca. Na primjer, u slučaju α - talasemije radi se o deleciji (gubitku) α lanca hemoglobina. U ovom slučaju homozigoti umiru već u toku intrauterinog života dok u slučaju β - talasemije pokazuju znakove teške anemije.

Imunoglobulinopatije su bolesti sa deficitom u jednoj ili dvije imunoglobulinske od 5 prethodno navedenih grupa imunogamaglobulina, pri čemu su ostale grupe zastupljene normalno ili imaju povećanu koncentraciju. Ove anomalije poznate su kao disgamaglobulinemije. Pogodene osobe pokazuju osjetljivost prema respiratornim infekcijama. Postoje i hipogamaglobulinemije gdje su sniženi nivoi IgG, ali nisu odsutna antitijela.

KRVNE GRUPE I BOLESTI ✕

Velika polimorfnost antigena unutar vrste, što je odraz genetske polimorfnosti organizma, dovela je do razlika od jednog do drugog organizma u reagiranju na pojedine bakterijske i virusne antigene. Utvrđeno je, naprimjer, da su osobe sa O krvnom grupom "boljeg zdravlja" u odnosu na osobe krvne grupe A. Prema ispitivanjima Vogela (1975.), osobe sa O krvnom grupom češće postaju seronegativne poslije izlaganja sifilisu, koleri, tuberkulozi, cirozi, na osnovu čega bi se moglo zaključiti da bi mogle biti otpornije na infekcije ovih bolesti.

Uočene su izvjesne zakonitosti između pojedinih krvnih grupa ABO sistema i pojave nekih neinfektivnih bolesti. Prema Vogelu između nekih bolesti krvnih grupa postoje statistički jasne korelacije, naprimjer, osobe krvne grupe A češće oboljevaju od kancera stomaka, pankreasa, jajnika, dojki ili osobe krvne grupe O češće oboljevaju od ulkusa duodeni, ulkus ventrikuli itd. Utvrđeno je, također, da osobe koje imaju A krvnu grupu rjeđe oboljevaju od upale respiratornih organa dok su osjetljivije na neke druge infekcije.

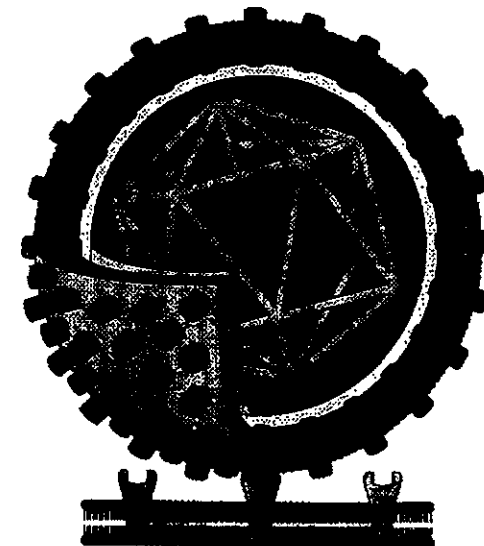
Interesantan je jedan rijedak sindrom koji se sastoji od odsustva patele i anomalije noktiju (nail-patella sindrom) vezan za ABO krvnu skupinu. Tako se ovaj sindrom prenosi u jednoj porodici sa krvnom grupom A, u drugoj familiji sa krvnom grupom B, a u trećoj familiji sa krvnom grupom O. Znači, ovaj sindrom nije povezan sa specifičnom krvnom grupom. S jedne strane izgleda da su ova dva stanja međusobno uzročno udružena, s druge strane stanja uslovljena međusobno vezanim genima ne pokazuju uzročne odnose. Sličan primjer posebno jake asocijacije je u slučaju ankilozirajućeg spondilitisa i HLA antigena

Molekularna medicina**HIV i AIDS**

Poznati imuno-deficijentni sindrom (AIDS) je nova bolest, prvi put opisana 1981. Sada je rasprostranjena širom svijeta sa više od 47 miliona ljudi inficiranih sa HIV a blizu 14 miliona je umrlo od AIDS. Klinička manifestacija AIDS-a rezultira u principu smanjenjem funkcije imunog sistema. U odnosu na normalni imunitet AIDS pacijenti su osjetljivi na infekcije (virusa, bakterija, gljivica i protozoa), na šta organizam treba biti rezistentan. Ljudi sa AIDS, također, imaju povećanu frekvenciju kancera, limfoma i Kaposis sarkoma.

Molekularna analiza je pokazala da AIDS uzrokuje retrovirus (humani imunodeficitni virus ili HIV) otkriven od grupe Robert Gallo i Luc Montagnier 1983. HIV inficira specifični tip limfocita (T4 limfocite) odgovornih za normalni imuni sistem. U suprotnom, mnogi drugi retrovirusi kao Rous sarcoma virus, HIV, ne uzrokuju kancer. HIV eventualno ubija ćelije u replikaciji što ima za posljedicu smanjenje populacije T4 limfocita i opadanje imunog sistema u inficiranim individuama. Prekid imunog sistema i povećanje infekcije su klinički simptomi AIDS. HIV se prenosi na tri načina: kroz seksualni kontakt, transfuzijom krvi i preko majke u toku trudnoće. Prevencija HIV infekcije podrazumijeva individualnu zaštitu, na prvom mjestu, seksualnu zaštitu, zatim intravenoznu i testiranje krvi za transfuziju. Dalje otkrivanje HIV kao uzročnika AIDS otvara mogućnost za prevenciju i tretman vakcinama. Alternativa su lijekovi koji inhibiraju replikaciju virusa što je efektivna terapija individua inficiranih HIV. Lijekovi djeluju kao inhibitori HIV reverzne transkriptaze ili HIV proteaze čiji je enzim odgovoran za sintezu virusnih proteina. Kombinacijom ovih lijekova prolongira se život AIDS pacijenata. Nužno je potreban dalji rad na razvoju lijekova koji su, ne samo, više efektivni već i manje skupi i više praktični za upotrebu.

Struktura AIDS virusa Svako jezgro sadrži dvije molekule RNA, zajedno sa dvije ili više molekula enzima reverzne transkriptaze, koji reguliše proces transkripcije RNA u DNA.



Kancer je rezultat defekata osnovnih ćelijskih regulatornih mehanizama. To je bolest koja se javlja na molekularnom i ćelijskom nivou. Kancer je mnogo godina objekt istraživanja molekularne i ćelijske biologije. Mnogi proteini ćelije imaju važnu ulogu u signalizaciji ćelije, regulaciji ćelijskog ciklusa, u kontroli i programiranju ćelijske smrti i upravo su u kancer ćelijama identificirane abnormalnosti u ovim procesima kao i u nekontrolisanoj proliferaciji ovih ćelija. Studije kancer ćelija doprinijele su značajnoj mjeri razumijevanju normalne ćelijske regulacije kao i obrnuto.

RAZVOJ I UZROCI KANCERA ?

Osnovna abnormalnost koja rezultira u razvoj kancera je kontinuirana, neregulisana proliferacija kancer ćelija. Kancer ćelije se dijele, rastu nekontrolisano, napadaju normalno tkivo, organe i eventualno se šire kroz tijelo. Poremećaj regulatornog sistema se reflektuje u više aspekata ćelijskog ponašanja određenog kancera.

Tipovi kancera ?

Kako kancer može rezultirati abnormalnom proliferacijom više vrsta tipova ćelija u tijelu, tako ima više vrsta kancera. U patologiji kancera najbitnije je odrediti benigne odnosno maligne tumore. Neke tumorske ćelije ostaju na mjestu nastanka. Tumori koje one formiraju često nisu opasni (benigni, dobroćudni), jer se mogu lako odstraniti. Druge tumorske ćelije mogu da migriraju na drugo mjesto u organizmu i napadaju druga normalna tkiva, a šire se preko cirkulatornog i limfnog sistema (metastaze), to su maligni-zloćudni tumori.

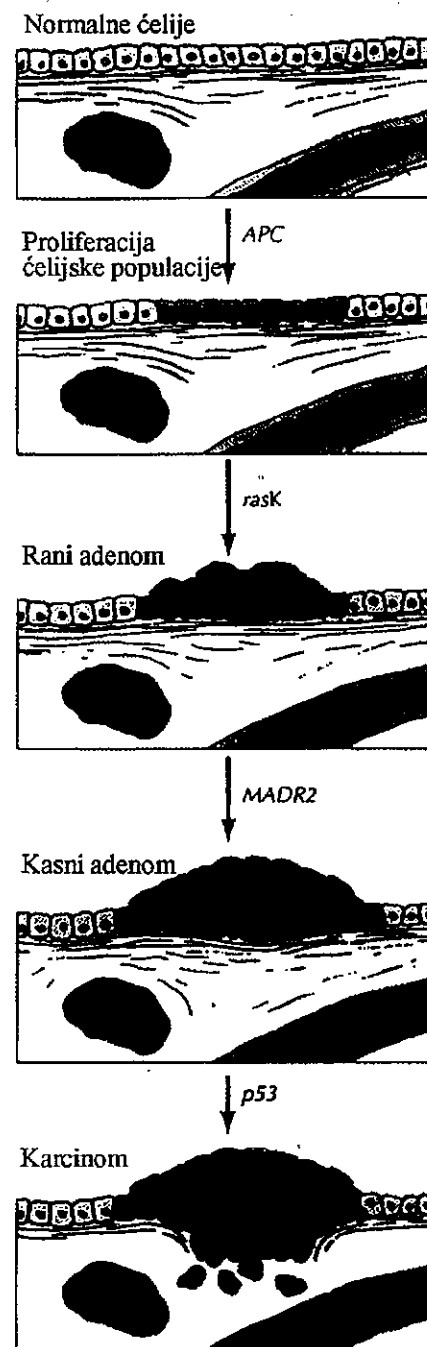
Benigni i maligni tumori se klasificiraju prema tipu ćelije koja je zahvaćena. Najviše kancera spada u jednu od tri grupe: karcinomi, sarkomi i leukemije ili limfomi. Najčešći su karcinomi epitelnih tkiva. Sarkomi su rjeđi i to su najčešće tumori konektivnog tkiva, mišićnog, fibroznog tkiva i kostiju. Limfomi zahvataju krvne ćelije i ćelije imunog sistema.

Razvoj kancera ?

Jedna od osnovnih fundamentalnih karakteristika kancera je kloniranje tumora, tj. razvoj tumora od samo jedne ćelije koja započinje abnormalnu proliferaciju ćelija. Inicijalna ćelija od koje se razvija tumor pokazuje sve karakteristike kancer ćelije. Razvoj tumora je složen proces u kojem ćelije postepeno prelaze u maligne progresivno se mijenjajući. Jedna od indikacija višestepenog razvoja kancera je da se najviše kancera razvija u kasnijim godinama života. Naprimjer, u slučaju kancera debelog crijeva (kolon kancer), za deset procenata je češći između 30. i 35. godine ili neke druge vrste se isto tako povećavaju između 50. i 70. godine. Ovako dramatično povećanje kancera sa starosnom dobi sugerise da je najviše kancera posljedica višestrukih abnormalnosti koje se akumuliraju sa životnom dobi. Razvoj tumora se odvija na ćelijskom nivou kao višestruki proces koji uključuje mutacije, selekciju ćelija, povećanje kapaciteta proliferacije, preživljavanje, širenje i metastaze. Prvi korak u ovom procesu je inicijacija tumora, što je rezultat genetske promjene koja vodi u abnormalnu diobu i umnožavanje jedne ćelije. Proliferacija jedne ćelije prerasta u populaciju kloniranih-proizvedenih tumorskih ćelija. U ćelijama progresivno rastućeg tumora dešavaju se mutacije kojima se pripisuje selektivna prednost ćelije, brži rast, preživljavanje, i metastaziranje. Mutacije se prenose na potomstvo unutar tumorske populacije ćelija. Ovaj proces je poznat kao klonalna selekcija (klonalne ćelije tumora se razlikuju po funkciji). Proučavanje karcinoma debelog crijeva je jasan primjer koji ilustruje razvoj i progresiju tumora, a što je zajedničko za sve opšte malignosti. Rani stadij u razvoju karakterise umnožavanje epitelnih ćelija crijeva. Jedna ćelija iz populacije proizvodi adenom ili polip. Nakon nekoliko krugova klonalne selekcije adenom (tumor) raste i povećava se. Maligni karcinom nastaje od benignog adenoma inducirajući invaziju tumorskih ćelija kroz osnovnu laminu ispod konenktivnog tkiva crijeva. Kancer ćelije se nastavljaju umnožavati i širiti kroz zidove crijeva (sl. 16.1) Eventualno, penetriraju kroz zid crijeva i napadaju druge abdominalne organe. Napadaju krv i limfu preko koje metastaziraju u organizmu.

Uzročnici kancera ?

Supstance koje uzrokuju kancer nazvane su kancerogeni, mogu se identificirati pri eksperimentalnim studijama kao i pri epidemiološkoj analizi. Razvoj kancera je složen proces, najvjerovatnije multifaktorski. Mnogi agensi uključujući radijaciju, hemikalije, virusi mogu uzrokovati kancer u eksperimentalnim životinjama i ljudima. Radijacija i mnoge hemikalije djeluju na DNA inducirajući mutacije gena što predstavlja glavni faktor u razvoju kancera. Neki inicijalni agensi su i dijelovi UV zračenja (uzrokuju kancer kože). Zatim, kancerogene materije duhana (uključujući benzo(a)pirin, dimetilnitrosamine i nikl spojeve) su identificirani



Slika 16.1 Ilustracija razvoja i proliferacije karcinoma debelog crijeva.

uzročnici humanih kancera. Pušenje neosporno uzrokuje 80-90% kancer pluća kao i inokulaciju kancera oralne šupljine, farinksa, laringusa, ezofagusa i drugih sistema. U cjelini procijenjeno je da je pušenje odgovorno za najmanje u jedan-tri slučaja smrtnosti od kancera što je velika cijena za jedan kancerogeni agens.

Druga grupa kancerogena razvijaju kancer stimulišući diobu ćelije i njeno umnožavanje, drugi pak induciraju mutacije, označeni su kao promotori tumora, slično svi povećavaju proliferaciju ćelijske populacije, induciraju rast u različitim stadijima razvoja tumora. Hormoni su, također, uzročnici nekih humanih kancera, naprimjer, estrogen i drugi. Humani kancer uzrokuju i virusi. Virusi su važni ne samo kao uzročnici već imaju ulogu u objašnjenju molekularnih aktivnosti odgovornih za razvoj viralnih i nevirálnih karcinoma.

Specifičnosti kancer ćelija ?

Jedna od osnovnih specifičnosti jeste poremećeni mehanizam ćelijskog ciklusa, nediferenciranost ćelija i sposobnost brzog dijeljenja. Poremećeni su faktori regulacije diobe i rasta ćelija. Pojačana dioba i rast kanceroznih ćelija povlači još niz promjena u metabolizmu i enzimskoj aktivnosti ćelija. Imaju drugačiju RNA i više slobodnih ribosoma, a manje granularnog ER u citoplazmi. Kod mnogih tumorskih ćelija primijećen je pad glikogena u citoplazmi usljed smanjenog normalnog mehanizma unošenja glukoze u ćeliju. Osim diferenciranosti na nivou

embrionalnih ćelija, kancerogene ćelije imaju još neke zajedničke antigene s embrionalnim ćelijama. Naime, u tumorskim ćelijama se nalazi još šest skupina antigena koji se nalaze u ćelijama embrionalnih tkiva. Dalje, poremećeni su mehanizmi međućelijskih interakcija. Upadljivu razliku u međućelijskim interakcijama između normalnih i kancer ćelija ilustruje fenomen kontakt inhibicije. Naprimjer, normalni fibroblasti kontakt inhibicijom migriraju na površinu kulture u pravilnom redu. Međutim, tumorske ćelije migriraju jedna preko druge i rastu u neredu u višeslojnom uzorku.

VIRUSNI TUMORI ?

Članovi sedam posebnih familija virusa, nazvanih tumori virusa uzrokuju kancer mnogih eksperimentalnih životinja i ljudi (tabela 16.1). Virusi su važni ne samo kao uzročnici kancera već i kao model za istraživanje ćelijske molekularne transformacije. Mali genom u tumorskih virusa je pogodan za molekularnu analizu i za identifikaciju viralnih gena odgovornih za indukciju kancera na molekularnom nivou (Zur Hausen, H.1991.)

Hepatitis B virus

Hepatitis B virus ima najmanji genom (oko 3kb). Animalni DNA virus ima specifičnu razornu moć u ćelijama više vrsta uključujući i čovjeka. Hronična infekcija ovim virusom asocira sa kancerom jetre. Ćelijska transformacija uzrokovana Hepatitis B virusom odvija se posredstvom viralnog gena (nazvan X gen).

SV40 i Poliomavirus

Najbolje proučeni DNA tumorski virus na polju molekularne biologije je SV40 majmunski virus (poliomavirus) i ujedno je najbolji model za razumijevanje molekularne osnove ćelijske transformacije. Nakon infekcije animalnih ćelija ovim virusom virusi se repliciraju, potom dolazi do lize ćelije domaćina i oslobađanja potomaka-viralnih partikula koje napadaju nove ćelije. U ovom slučaju, viralni genom (DNA) se ponekada integriše u DNA ćelije domaćina, nakon čega dolazi do ekspresije specifičnih viralnih gena što rezultira transformacijom inficirane ćelije.

SV40 poliomavirusni geni koji dovode do ćelijske transformacije mogu biti identificirani molekulskom analizom. Genom i mRNA ovog virusa su komplet sekvencirani. Mutacije koje indukuju transformaciju ćelije mogu biti izolirane i transformirani proteini pojedinih viralnih gena, također, mogu biti determinisani i analizirani nakon izolacije gena.

Papilomavirusi

Papilomavirusi su virusi sa malom količinom DNA (genom oko 8kb) indukuju benigne i maligne tumore u ljudi i drugih životinjskih vrsta. Ima oko 60 različitih vrsta papiloma virusa koji inficiraju epitelne ćelije nekih tkiva. Neki od ovih vrsta

uzrokuju samo benigne tumore (kao bradavice). Ćelijska transformacija koju uzrokuju animalni papilomavirusi rezultat je ekspresije dva regiona E6 i E7 gena.

Herpesvirusi

Najsloženiji animalni virusi sa genomom od 100-200 kb su herpesvirusi. Neki herpesvirusi induciraju tumore kod više životinjskih vrsta kao, žaba, ptica, majmuna itd. Dva člana herpesvirusne familije, kaposis sarcoma-herpesvirus i Epstein-Barr virus, asociraju sa humanim kancerom.

Adenovirus

Ovaj virus ne uzrokuje razvoj kancera u ljudi i drugih vrsta, ali je važan model u proučavanju kancera. Njihova transformacija proteina je u interakciji sa Rb i p53 faktorima.

Retrovirusi

Retrovirusi su članovi familije RNA virusa. Retrovirusi uzrokuju kancer u različitih životinja uključujući i čovjeka. Jedan humani retrovirus je agens koji djeluje na T-krvne ćelije leukemije. Transformacija T-limfocita rezultat je ekspresije viralnog gena *tax* koji kodira regulatorni protein.

AIDS je uzrokovan drugim retrovirusom. HIV ne uzrokuje kancer pri direktnoj preobrazbi normalne ćelije u tumorsku. Međutim, AIDS pacijenti nose visoki rizik za neke limfome i Kaposis sarkome.

Najviše retrovirusa sadrži samo tri gena (*gag*, *pol*, *env*) odgovornih za virusnu replikaciju, ali nemaju ulogu u ćelijskoj transformaciji. Retrovirusi ovog tipa indukuju rijetke tumore, što je posljedica mutacija nakon integracije proviralne DNA i ćelijske DNA. Drugi retrovirusi sadrže specifične gene odgovorne za indukciju ćelijske transformacije. Prototip ovih visoko onkogenih retrovirusa je Rous sarkoma virus (RSV), prvi put izolovan iz sarkoma pileta od strane Peijtona Rous 1911. Više od 50 godina kasnije proučavan je RSV kada je identificiran prvi viralni onkogen koji je bio model za razjašnjenje mnogih aspekata razvoja tumora na molekularnom nivou (Cooper, 2000).

Tabela 16.1 Virusni tumori

Virusne familije	Humani tumori	Veličina genoma (kb)
DNA tumori virusa		
Hepatitis B virusi	kancer jetre	3
SV40 i poliomavirusi	nijedan	5
Papilomavirusi	vratni karcinom	8
Adenovirusi	nijedan	35
Herpesvirusi	Burkitts limfom, nasofaringalni karcinom, sarkom	100-200
RNA virusi tumora		
Retrovirusi	Odrasle T-ćelije leukemije	9

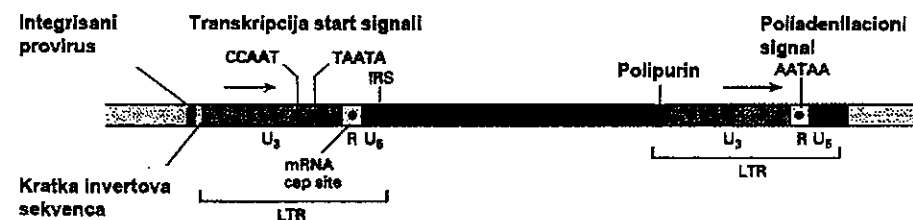
ONKOGENI

Mehanizam nastanka tumora svodi se u krajnjoj liniji na detalje grade, djelovanja i funkcije gena. Aktivirani gen uzrokuje tumor, a njegovu aktivaciju izazivaju mutacije, prelomi hromosoma, virusi itd. Dakle, to su ćelijski geni koji aktiviranjem započinju promjenu do tada zdrave ćelije. Znači, čovječije ćelije zaista sadrže gene koji uzrokuju karcinom. Ti se geni nazivaju *onkogeni*. Proučavanjem tumorskih virusa otkriveni su specifični geni (onkogeni) koji induciraju ćelijsku transformaciju, nakon čega su i stečena shvatanja o molekularnoj osnovi kancera. Međutim, najviše humanih karcinoma (oko 80%) nije indukovano virusima već drugim uzročnicima. Ali, vrlo je važna studija viralnih onkogenata za razumijevanje i otkrivanje ćelijskih onkogenata koji su ugrađeni u razvoj ne-viralnih induciranih kancera. Proučavanjem retroviralnih onkogenata razjašnjena je veza između viralnih i celularnih onkogenata.

Retroviralni onkogeni

Karcinogeni RNA virusi se mogu podijeliti na akutne i hronične. Prvi izazivaju karcinom u domaćinu brzo, za 2-4 nedelje i s učestalošću od blizu 100% izazivaju zloćudnu preobrazbu ćelija kultiviranih in vitro. Tu spada, naprimjer, Rousov virus sarkoma. Kronični izazivaju karcinom samo u 20-60% primaoca i to tek nakon 4-12 mjeseci. Svi retrovirusi imaju tri genomske regije koje sudjeluju u replikaciji: *gag* za sintezu unutrašnjih virusnih proteina, *pol* za

sintezu DNA polimeraze kojom upravlja RNA, i *env* za sintezu glukoproteina virusne ovojnice. U virusnom genomu nalazi se i specifični gen koji u ćeliji domaćina može izazvati zloćudnu transformaciju (onkogen). Građa retrovirusa čini retrovirus izuzetno sposobnim za regulaciju ekspresije eukariotskih gena. Redoslijedi nukleotida LTR su promotori genske ekspresije (sl. 16.2) A ekspresija retrovirusnog onkogenata vodi ćeliju domaćina na put zloćudne preobrazbe. Kronični karcinogeni RNA virus ne nosi onkogene. Integriraju se u genom domaćina i svojom sposobnošću (LTR) stimulacije genske ekspresije dovode do ekspresije ćelijskog onkogenata. Taj se model virusne karcinogeneze naziva model umetanja promotora.



Slika 16.2 Osnovna genetska struktura najvećeg broja onkogenih retrovirusa i karakteristike LTRs. (LTR sekvence su prikazane mnogo šire da bi se prikazale njihove karakteristike)

Izolovano je više od 40 različitih visoko-onkogenih retrovirusa iz različitih životinja (tabela 16.2) miševa, štakora, mačaka, kokošaka, majmuna kao i humani imunodeficitni virus HIV (Tabela). Svi ovi virusi sadrže slično RSV (Rous sarkoma virus), po jedan onkogen (u nekim slučajevima po dva) što ne obezbjeđuje virusnu replikaciju, ali je odgovoran za ćelijsku transformaciju. Različiti virusi sadrže različite onkogene koji se mogu identificirati. Mnogi geni virusa (kao *ras*, *rat* i *scr*) kodiraju proteine koji su sastavne komponente procesa stimulacije ćelijske proliferacije.

Tabela 16.2 Neki retroviralni onkogeni

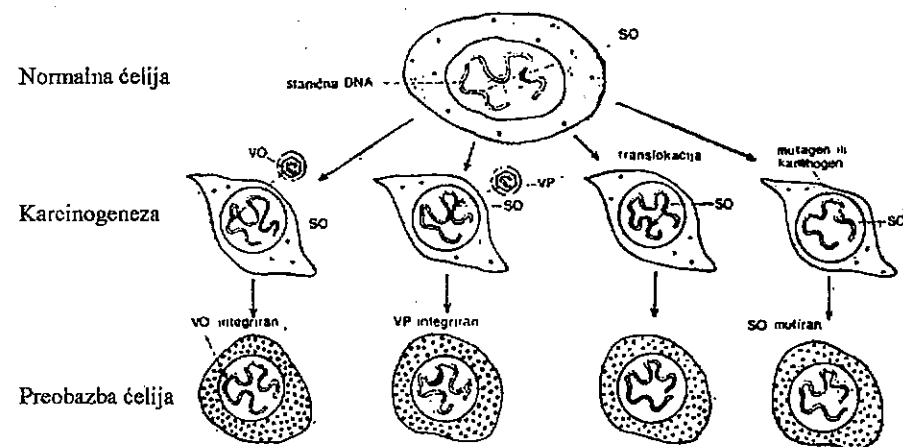
Onkogen	Virus	Vrsta
abl	Abelson leukemia	Miš
crk	Ct sarcoma	pile
fes	Gardner-Arnstein feline sarcoma	Mačka
rasH	Harvey sarcoma	Štakor
sis	Simian sarcoma	Majmun
jun	Avian sarcoma-17	pile
rel	Reticuloendotheliosis	ćurka

Proto-onkogeni
(onkogeni u humanim kancerima)

Normalni ćelijski geni od kojih potječu onkogeni nazvani su proto-onkogeni. To su važni regulatorni geni u ćeliji u mnogo slučajeva kodiraju proteine sa funkcijom signaliziranja normalne ćelijske proliferacije. Onkogeni (sra, ras, iraf) imaju mutantne forme koje prelaze u proto-onkogene. Kao posljedica promjena onkogeni induciraju abnormalnu ćelijsku proliferaciju u razvoju tumora.

Prvobitna istraživanja u području onkogeneze pokazuju postojanje gena koji mogu uzrokovati transformaciju normalne ćelije in vitro. Za ove gene, označene kao onkogeni (onc), u početku se smatralo da potječu od onkogenih retrovirusa, a za transformaciju ćelije se smatralo da je rezultat infekcije normalne ćelije onkogenim retrovirusom. Međutim, nakon toga se dokazalo da normalna eukariotska ćelija sadrži genske sekvence koje su homologne onkogenima, ali ne uzrokuju transformaciju ćelije. Ovi geni su nazvani proto-onkogeni i dokazano je da kodiraju proteine koji su na razne načine uključeni u regulaciju ćelijske proliferacije. Prema funkciji proteinskog produkta koga kodiraju, onkogeni su podijeljeni u više grupa. Prvu grupu čine proto-onkogeni čiji produkti funkcionišu kao protein-kinaze koje utiču na provođenje signala između vanćelijske tečnosti i unutrašnjosti ćelije. Drugi produkti dovode do deficita u aktivnosti GTPaze čime se poremete specifični regulatorni procesi ćelijskog rasta i diobe. Jednu grupu čine onkogeni za čije je proteinske produkte poznato da se direktno vežu na DNA molekulu ili su to DNA-vezani nuklearni proteini. Njihovom aktivnosti se remeti regulacija normalne mitoze. Neki onkogeni produkuju proteine koji se u ćeliji ponašaju kao faktori rasta.

Proto-onkogeni se aktiviraju, tj. prelaze u onkogene na nekoliko načina (Tabin, C.et.al. 1982.) Svaka normalna ćelija nosi u svom genomu onkogene (proto-onkogene) koji imaju svoju funkciju u životu ćelije. Bez obzira na svoj onkogen, ćelija može da se transformiše ako neki retrovirus donese u ćeliju dodatni onkogen. Ovaj se integrira u genom ćelije i stvara veću količinu proteina nego što je to potrebno, a to djeluje stimulatивно na proto-onkogen ćelije domaćina što ima za posljedicu transformaciju ćelije. U drugom slučaju, u genom domaćina integrira se samo virusni promotor koji dovodi do pojačane aktivacije ćelijskog onkogen. Različite hromosomske aberacije kao translokacije, delecije duplikacije i druge, mogu da aktiviraju ćelijski onkogen. I, na kraju, različiti kancerogeni, mutageni iz vanjske sredine mogu da mijenjaju gradnju ćelijskog onkogen i time njegovog produkta-proteina, što može dovesti do transformacije u tumorsku ćeliju (sl. 16.3).



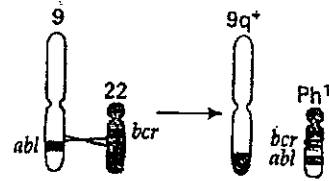
Slika 16.3 Načini aktivacije onkogeni SO-ćelijski onkogen, VO-virusni onkogen, VP-virusni promotor, TSO-translokacija ćelijskog onkogen.

Tabela 16.3 Primjeri onkogeni u humanim tumorima

Onkogen	Tip kancera	Mehanizam aktivacije
abl	Hronična mieloidna leukemija	Translokacija
akt	Karcinom ovarija i pankrasi	Amplifikacija
gip	Adrenal kortikalni i ovarijalni karcinom	Tačkasta mutacija
ret	Karcinom tiroidee	DNA promjene
PDGFR	Hronična mielomonocitna leukemija	Translokacija
E2A/pbx1	Akutna limfocitna leukemija	Translokacija
ret	Multipla endokrini neoplazma	Tačkasta mutacija
SMO	Karcinom bazalnih ćelija	Tačkasta mutacija
c-myc	Burcitts limfom	Translokacija

Prvi identificirani, analizirani i opisani humani onkogen je u slučaju mijeloidne leukemije. Mali Philadelphia hromosom u ćelijama pacijenata sa hroničnom mieloidnom leukemijom (sl. 16.4) zapravo nosi aktivirani proto-onkogen u onkogen (abl). Philadelphia hromosom (Ph+) je prva opisana specifična hromosomska anomalija tumorskih ćelija. Ph+nastaje recipročnom translokacijom između hromosoma 22 i hromosoma 9 (mehanizam translokacije opisan u prvom poglavlju). Translokacija između hromosoma 22 i 9 dovodi do formiranja Ph+ hromosoma, a time do aktivacije proto-onkogeni u leukemičnim ćelijama. Tabela 16.3 prikazuje neke primjere onkogeni u humanim tumorima.

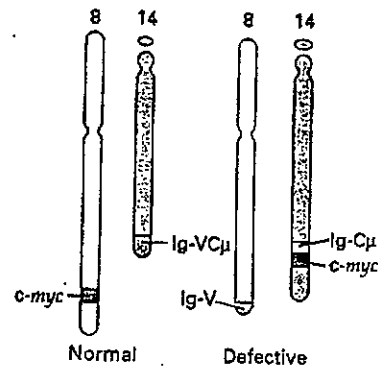
Slika 16.4 Filadelfija hromosom u slučaju mijeloidne leukemije nastaje recipročnom translokacijom između hromosoma 9. i 22 (Solomon, E.et.al. 1991.)



Burkitt-ov limfom je tumor B ćelija (sl. 16.5) Tumorske ćelije daju antitijela (imunoglobuline) i imaju karakterističnu translokaciju. Translokacija uključuje hromosom 8 i jedan od tri hromosoma koji nose gen za lake ili teške lance antitijela.

Tačke prekida hromosoma su uvijek specifične i uvijek iste u različitim tumorima. Istraživanja pokazuju da je u translokaciju hromosoma 8 uključen c-myc proto-onkogen. Ovaj proto-onkogen leži na dugim krakovima hromosoma 8 (8q24) u dužini od oko 5kb. Gen ima tri egsona. Translokacija uključuje hromosom 14, c-myc je zajedno sa distalnim krajem q kraka hromosoma 8 priključen na DNA koja kodira teški lanac imunoglobulinskog gena i sintetiše se samo jedna vrsta imunoglobulina, što znači da je samo na jednom hromosomu aktivan imunoglobilinski gen i to na netranslociranom. Smatra se da translokacija koja uključuje c-myc onkogen dovodi do promjene u transkripciji gena što proizvodi maligne transformacije. Translokacije c-myc proto-onkogene ne mijenjaju kodirajuću regiju gena već njegovu ekspresiju. Direktan dokaz su sekvencije myc onkogene iz tumorskih ćelija u kojima nije zamijenjen niti izostavljen jedan jedini nukleotid.

Slika 16.5 U Burkitt-s limfomu je prisutna translokacija između 8. i 14. hromosoma. Dijagram prikazuje normalni i aberantni hromosom. Prikazana je odprilike lokacija c-myc sekvence imunoglobulinskog gena.



Tumor supresorni geni

Onkogeni uzrokuju abnormalnu ćelijsku proliferaciju što je posljedica genetskih promjena; ekspresije gena ili nekontrolisane aktivnosti onkogenog proteina. Tumor supresorni geni su na strani normalnog ponašanja i rasta ćelije nastojeći da inhibiraju ćelijsku proliferaciju i razvoj tumora. U mnogim tumorima ovi geni su izgubljeni ili ne aktivni što opet doprinosi nenormalnoj proliferaciji tumorskih ćelija. Prvi identificirani tumor supresorni gen je u slučaju retinoblastoma (Rb). Rijedak tumor koji se javlja rano u djetinjstvu od 1 do 3 godine i može biti uspješno tretiran. Neki oblici retinoblastoma su nasljedni. U ovom slučaju oko 50% djece nasljeđuje retinoblastom od roditelja. Bolest se nasljeđuje preko autosomalnog dominantnog gena po Mendelovim principima. Oko 75% oboljelih ima bilateralne tumore (na oba oka) i to najčešće tumorsko bujanje započinje u više ćelija. Utvrđeno je kod neke djece da imaju hromosomske aberacije u koje je uključen hromosom 13 i to najčešće deleciju dijela hromosoma 13q14 regije. Ova delecija može biti u homozigotitetu ili hemizigotitetu. Najnovija istraživanja pokazuju postojanje gena za sklonost retinoblastoma u ovoj regiji hromosoma 13. Gen sadrži oko 12 egsona u regiji od oko 100kb, te kodira DNA dugu 4, 6 kb. Utvrđeno je da prepis ovog gena može biti promijenjen ili ga uopšte nema u tumorskim ćelijama. Drugi tumorsupresorni identificirani gen je p53, široko je zastupljen u humanim kancerima uključujući leukemiju, limfome, sarkome, karcinome mnogih tkiva. Mutacije p53 imaju ulogu u 50% svih kancera sa prisutnim genetskim promjenama u humanim malignomima. Također, interesantno je da mutacije p53 su odgovorne za genetsku transmisiju rijetkih kancer sindroma i u pogodnih osoba se razvija nekoliko različitih tipova kancera. p53 protein (sličan Rb) je meta za onkogene proteine od SV40, adenoviruse, i humane poliomaviruse.

Produkti tumor supresornih gena su kodirani proteini, inače, aktivni inhibitori ćelijske proliferacije, a i preživljavanja tumorskih ćelija. Rb, INK4 i p53 proteini su negativni regulatori progresije ćelijskog ciklusa. Protein 53p je, naprimjer, uključen u proces apoptoze (genetski regulisana ćelijska smrt), DNA promjene i druge stimulacije, tako da se inaktivacijom ovog proteina povećava preživljavanje tumorskih ćelija (Weinberg, R.A. 1991.)

Na kraju, tumor supresorni geni inhibiraju razvoj tumora. Prototip tumor supresornih gena, Rb je identifikovan pri proučavanju nasljeđivanja retinoblastoma. Gubitak ili inaktivacija mutacijom tumor supresornog gena Rb i drugih tumor supresornih gena uključujući i p53, doprinosi u razumijevanje široke raznolikosti humanih kancera.

SAVREMENE TEORIJE O MEHANIZMU NASTANKA TUMORA

Kako smo prethodno naveli, metodom transformacije je dokazano postojanje onkogeno u ljudskim tumorima. Oko 150 virusa uzrokuje tumore u životinja, 1/3 od njih čine DNA virusi, a 2/3 RNA virusi. Uglavnom su zastupljeni (oko 100) RNA virusi. Oni se u ćelijama domaćina istovremeno umnožavaju i mijenjaju ćelije, a da ih pri tome ne unište. Njihovo onkogeno djelovanje uslovljeno je neprestanim prepisivanjem DNA i RNA u ćelijama. Da bi se mogli razmnožiti, RNA virusi moraju se prepisati u DNA, pri tome im pomaže povratna transkriptaza enzim koji "piše" DNA čitajući RNA. Najpoznatiji oblik u kojem RNA viruse nalazimo u ćelijama jesu tzv. čestice C. Mnoge čestice C jesu endogeni virusi integrisani u genetski materijal ćelije domaćina.

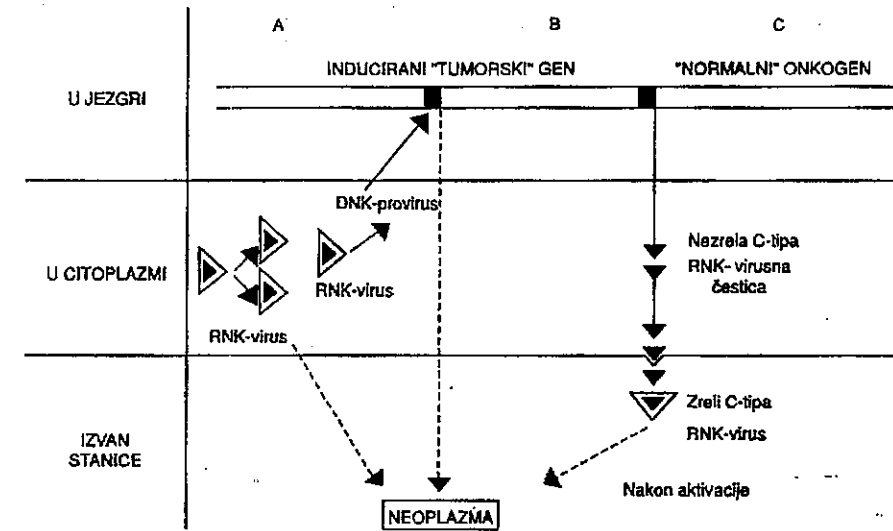
Na osnovu opštih saznanja o kancerogenezi, na osnovu već poznatih mehanizama o transformaciji normalne u tumorsku ćeliju, postavljene su hipoteze o etiologiji tumora. Savremene teorije uglavnom se zasnivaju na saznanjima iz područja molekularne biologije. Na osnovu ovih saznanja postavljeno je nekoliko hipoteza koje pokušavaju protumačiti mehanizam razvoja kancera.

Hipoteza o djelovanju onkogenih RNA virusa

Postoje tri tumačenja koja pokušavaju opisati virusnu etiologiju kancera. Prvo, onkogeni mehanizam uključuje pojavu raka zbog aktivacije endogenih RNA virusa određene vrste. Primarno mjesto nastanka tumora jeste citoplazma inficirane ćelije, gdje se nalazi RNA virus u latentnom stanju. Nakon aktiviranja latentnog RNA virusa nekim hemijskim, fizičkim faktorima iz spoljašnje sredine, virus se oslobađa iz primarnog mjesta i odlazi u organizam. Aktivni RNA virus može da smanji imunu reakciju organizma na određeni virus ili, pak, da senzibilizira odgovarajući organ na virus ili čak da djeluje na ćeliju kombinirajući sve te učinke (sl. 16.6A).

Na osnovu drugog tumačenja, onkogeni RNA virusi djeluju preko njihovih DNA provirusa i njihovim ugrađivanjem u DNA genom ćelije. Naime, RNA virusi induciraju ćeliju na stvaranje DNA provirusa procesom obratne transkripcije i oni služe kao model, kalup za dalju replikaciju RNA virusa. DNA provirusi mogu se ugraditi u genom ćelije i inducirati "tumorski gen" na nastanak tumora. (sl. 16.6B)

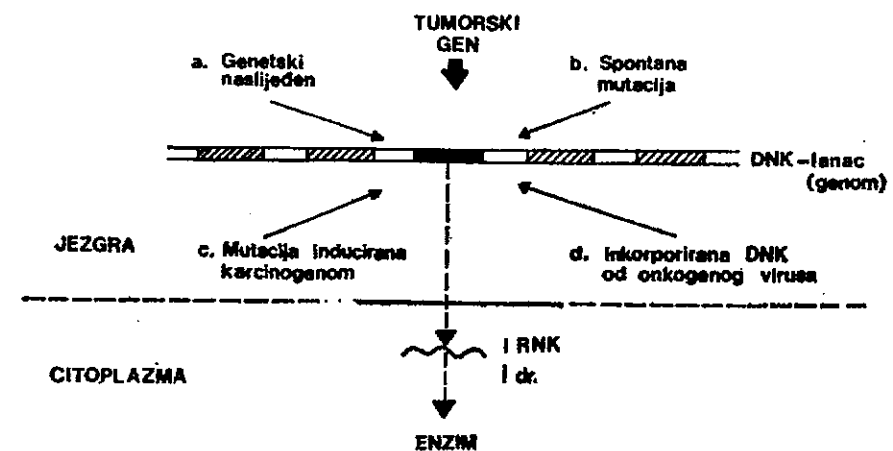
Treća hipoteza temelji se na eksperimentalnim činjenicama. Najpoznatiji oblik u kome nalazimo RNA viruse jesu tzv. čestice C. Po ovoj hipotezi RNA virusi C-tipa potencijalni su uzročnici svih tipova raka, jer su jako rasprostranjeni u tkivima sisara. Oni predstavljaju prirodni izvor genetskih informacija za tumorske promjene (sl. 16.6C).



Slika 16.6 Tri varijante mehanizma indukcije tumora s RNA virusima (A, B, C).

DNA virusna hipoteza

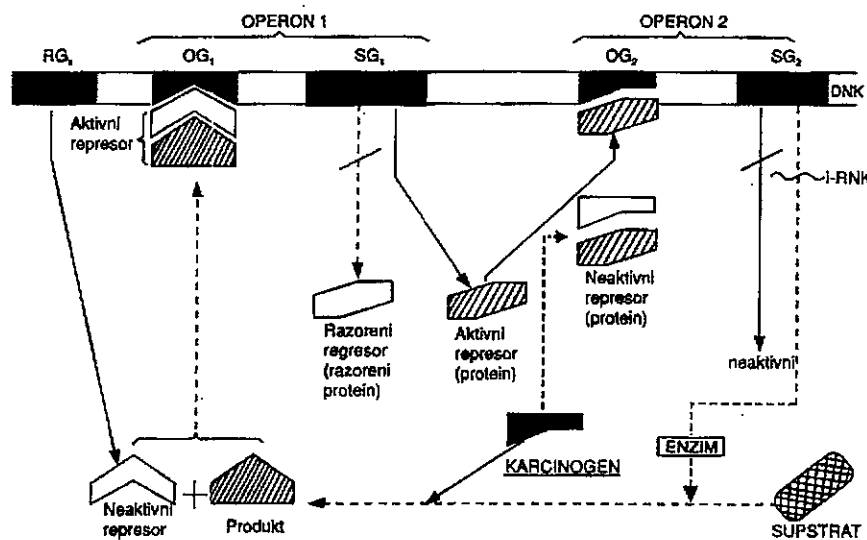
Po ovoj hipotezi, tumori nastaju kao posljedica promjena u genomu ćelije, tj. aktivacijom onkogeno ili tumorskog gena. Onkogen se može aktivirati na više načina, kako smo prethodno naveli: nasljednom transmisijom, spontanom somatskom mutacijom, induciranom mutacijom nekim hemijskim i fizičkim kancerogenima iz spoljašnje sredine i ugrađivanjem dijela onkogeno virusne DNA u genom ćelije (sl. 16.7)



Slika 16.7 Tumori mogu nastati kao posljedica djelovanja različitih agensa na DNA.

Tumori kao posljedica poremećaja genetske kontrole transkripcije

Osnova ove hipoteze je Jacob-Monodova teorija genetske kontrole procesa sinteze proteina (vidi sliku 16.8). Naime, produkt strukturnog gena (SG1) aktivni je proteinski represor koji može djelovati na gen operator (OG1) nekog operona (operon 1) i na taj način spriječiti njegovu transkripciju. Neka kancerogena materija u organizmu ili njen metabolit (djeluje kao induktor) može da se veže za represor operona 1, što dovodi do njegove inaktivacije, ali nastaje depresija OG2 i posljedica je transkripcija njegovih strukturnih gena (enzima). Enzim (E) gena operatora 2 (OG2) katalizuje reakciju čiji se produkt (metabolit kancerogena) vezuje s inaktivnim represorom OG1 prouzrokujući njegovu aktivaciju. Sve dok je produkt (P) prisutan u organizmu operon 1 ostaje represiran, njegov protein se razara u ćeliji, a operon 2 nastavlja dalje transkripciju iRNA, odnosno enzima (E) koji je odgovoran za stalnu produkciju metabolita karcinoma i stalan rast ćelij



Slika 16.8 Mehanizam nastanka tumora kao posljedica poremećaja genetske kontrole procesa transkripcije. RG-gen regulator; OG-gen operator; SG-strukturni gen. Puna linija označava normalnu aktivnost gena, a isprekidana linija aktivnost gena u prisustvu kancerogena.

Imunogenetska hipoteza

Polazeći od toga da se imunološki sistem, ipak, mora analizirati kao glavni prirodni protivnik raka, postavljena je imunološka hipoteza. Osnovna postavka ove hipoteze odnosi se na sam začetak tumora, a zasniva se na nalazima da tumorske ćelije nose antigene kojih nema u odgovarajućim normalnim ćelijama i da ti antigeni izazivaju imunološku reakciju. Po ovoj hipotezi postoje dva mehanizma nastanka tumora, neovisno jedan o drugom. Jedan pretpostavlja stvaranje genotipa zbog promjena izazvanih hemijskim kancerogenima. Hemijski kancerogeni oslabe imunsku reakciju normalnih ćelija, vezuju se za ćelijske proteine i time slabe ćelijske kontrolne faktore, a inducirani tumori stvaraju "tumor specifične" antigene. Drugi mehanizam dovodi do promjena u genomu ćelije zbog djelovanja virusa, pa se stvaraju "tumor prateći" antigeni, specifični za određeni onkogeni virus. Imunološkoj kontroli izmiču manje imunogene ćelije iz populacije primarnog tumora i one prouzrokuju progresivno rastući tumor.

Dakle, sve savremene hipoteze temelje se na principima genetike, bilo da se kao primarno mjesto uzimaju DNA-šifre ćelije, RNA-transkripcija ili translacija ili je u genetskom kontrolnom sistemu ili u imunološkoj teoriji klonalne selekcije. Svi dosadašnji navedeni uzroci bili su tačni i doveli su do poremećaja ekspresije gena i zloćudne transformacije. Što uključuje i viruse kod ljudi. Međutim, odlučujuću ulogu nemaju vanjski faktori, već endogena metabolička aktivnost organizma i stvaranje oksidativnih radikala.

U zaključku, do zloćudne transformacije ne dolazi poremećajem bilo kojeg gena već poremećajem rada posebnih gena, tj. onkogeni. To su normalni ćelijski geni čija se funkcija uopšteno povezuje s kontrolom rasta, a specifično s određivanjem protein-kinaze. U genomu ih ima oko 100, a u živom svijetu jako su rasprostranjeni i evolucijski konzervirani. Poremećaji ekspresije onkogeni u korelaciji su sa virusnim infekcijama, mutacijama i hromosomskim oštećenjima. Zahvaljujući fascinantnom napretku molekularne biologije, genetike i molekularne medicine, danas je moguće približno tačno opisati mehanizme nastanka više vrsta zloćudnih tumora u ljudi, npr. retinoblastom, Burkittov limfom, neke vrste leukemija i druge.

APLIKACIJA MOLEKULARNE BIOLOGIJE U KANCER PREVENCIJI I TRETMANU

Razvoj i napredak molekularne biologije predstavlja veliki doprinos u razumijevanju i objašnjenju kancera kao i u prevenciji i tretmanu. Direktno nasljedni kancer je rezultat defekta poznatih gena u oko 50% svih kancera. Molekularna analiza onkogenih i tumorsupresornih gena uključenih u posebne tipove tumora, obezbjeđuje informaciju potrebnu za dijagnostiku kancera, monitoring i tretman. Zapravo molekularna dijagnostika započinje u kliničkoj praksi. Detekcija mutacija specifičnih onkogenih ili tumorsupresornih gena daje značajnu informaciju u izboru između različitih terapijskih opcija. Analiza mutacija pomaže u predviđanju reakcija-odgovora tumora na zračenje i hemoterapiju. Potpuna informacija podrazumijeva skup podataka o genetskim promjenama (mutacije) u determinaciji tumora i ponašanju što upotpunjava molekularnu dijagnozu. Mnogi karcinomi mogu biti izliječeni ako se detektuju rani stadiji razvoja tumora, zatim, ako se izvedu genetski testovi na osnovu kojih je moguće identificirati nasljednu osjetljivost individua na karcinom. Sve to može doprinijeti ranoj detekciji i primjeni visokoefektnih tretmana u visokorizičnih pacijenata.

LITERATURA

Ključne reference:

Ford, E.B.: Genetics for Medical studies. London. 19998.

Kičić, M.K. Krajinčanić, B. Medicinska genetika. Medicinska genetika. Beograd. 1994.

Pasternac, J.J.: An intruduction to Human Genetics, 1999.

Strach, T., Read, A.P.: Human Molecular Genetics. Oxford, 1996.

Venter, G.J.: Sequencing human genome. Science, 291.2001.

Zergollern, Lj.i sar.: Humana genetika. Zagreb. 1994.

Blattner, F.R.: The complete genome sequence of Escherichia coli.: Science, 1997.

Butler, M.G.: Parental origin of chromosome 15 deletion in Prader Willi syndrome, Science, 1993.

Comings, D.E.: Mechanisms of chromosome banding and implications for chromosome structure. Genet. 1978.

Collins, F.S., Patrions, E., Jordan, A. et al.: New goals for the U.S. human genome Proyectz. Science, 1998.

Coopur, G.M.: The Cell a Molecular Approach. Boston University, 2000.

Dunham, J. and 216 others. The DNA sequence of human hromosome 22. Nature. 1999

Europen union Arabidopsis Genome. Sequencing and analisys chromosome 4. Nature, 1999.

Human Genome Proyectz. Science, 282, 1998.

Miklos, G.L.G. and Rubin, G.M.: The role of the genome project in determining gene function. Cell, 1996.

Russel, P.J.: Genetics, 1992.

Solomon, E., Borrow, J. and Goddard, A.D.: Chromosome aberrations and cancer. Science, 254.1991.

Tabin, C. et al.: Mechanisam of activation of a human oncogenr. Nature, 300.1982.

Zur Hauses, H.: Viruses in human cancer. Science, 1991.

Weinberg, R.A.: Tumor suppressor genes. Science, 254.1991.

Watson, I.D.: Molecular biology, 1990.

A

aleli - Jedna kopija gena

apoptoza - Aktivni proces programiranja ćelijske smrti

aktin - Bjelančevina koja struktuirala tanka mišićna vlakna u mišićnim ćelijama susreće se i u drugim ćelijama

aktivno mjesto - Region enzima za koje se vezuje supstrat i katalizuje enzimatsku reakciju

aktivni transport - Transport makromolekula kroz membranu uz učešće energije

adenin - Baza koja se vezuje sa timinom ili uracilom

atcherens junction - Region ćelija-ćelija kojim se učvršćuje aktin citoskeleta za plazma membranu

amino kiselina - Dio proteina

aminoacilna tRNA sintetaza - Enzim koji povezuje specifične amino kiseline za odgovarajući antikodon specifične tRNA u procesu sinteze proteina

anafaza - Faza mitoze u kojoj se odvajaju sestre hromatide na suprotne polove vretena

antikodon - Triplet baza tRNA komplementaran tripletu baza iRNA

archaebacteria - Jedna od dvije većih

grupa prokariota, mnoge vrste žive u ekstremnim uslovima sličnim primitivnim oblicima na Zemlji

ATP - Adenosin 5 prim-trifosfat, adenin sadrži nukleozid trifosfat. Služi kao izvor slobodne energije u ćeliji

autophagija - degradacija citoplazmatskih proteina i organela sadržanih u vezikulama ER koje se fuzionišu sa lisosomima

antigena determinanta - dio molekula antigena koji učestvuje u vezivanju s antitjelom

alotipski markeri (alotipovi) - razlike između lakih i teških lanaca imunoglobulina, kod različitih jedinki izazvane zamjenom jedne amino kiseline drugom

antimutageni - materije koje mogu u specifičnim uslovima da umanje štetno dejstvo mutagena

amplifikacija - parcijalno umnožavanje gena u toku diferencijacije ćelija

aneuploidija - smanjenje ili povećanje broja pojedinačnih hromosoma ($2n-1$) ili ($2n+1$)

anomalija - blaža promjena organizma najčešće morfološkog tipa

adenilciklaza - enzim koji katalizuje formiranje ciklin HMP od ATP.

B

bakteriofage - Bakterijski virusi
bazalno tijelo - Struktura na bazi trepetljika ili biča slična centriolu
Barr bodi - Kondenzovani hromatin ili inaktivni X hromosom, nalazi se u nukleusu normalnih žena ali ne i u ćelijama normalnih muškaraca
bivalent - Homologni par hromosoma - sinapsis koji se formira u toku prve mejotičke diobe
bazni analozi - Hemijski mutageni koji dovode do tautomernih promjena u DNA, tj. do zamjena naspramnih baza

C

centriol - Male parne dvostruke organele sastavljene iz mikrocevčica, sastavni su dio diobenog vretena
centromera - Primarno suženje hromosoma. Mjesto za koje se prihvaćaju niti mitotičkog vretena
citokineza - Dioba ćelijske citoplazme koja uslijedi nakon diobe jezgre u mejozi i mitozu
cancerogen - Kancer-inducirajući agensi
catalaza - Enzim koji dekompenzira hidrogen peroksid
Cdc2 - Protein-serin /treonin kinaza koji reguliše mitozu eukariotskih ćelija
Cdk - Ciklin (CKI) - Kompleks koji svojom aktivnošću reguliše fosforilaciju, defosforilaciju i druge mehanizme u S fazi
Cdks - Ciklin pripadajući protein kinaze kontroliše ćelijski ciklus u eukariotskih organizama kao i Cdc2
Centralna dogma - Koncept genetske informacije tokom translacije DNA-RNA-protein
CGMP fosfodiesteraza - Enzim

degradirajući cGMP

ciklin AMP (Camp) - Adenozin monofosfat čija je fosfatna grupa kovalentno vezana od 3prim prema 5prim kraju karbon atomima, formirajući ciklin strukturu
ciklin GMP - Guanozin monofosfat u čijoj su fosfatnoj grupi kovalentno vezana oba 3prim i 5prim karbonatamina i formira ciklin strukturu
citohrom oksidaza - Protein kompleks u elektronskom transportnom lancu vezan za elektrone
цитоскелет - Mreža protein filamenata pruža se kroz citoplazmu eukariotskih ćelija

D

diploid - Ćelija koja ima homologne parove hromosoma, dvostruko više od osnovnog haploidnog broja
diploten - Četvrti stadij profaze mejoze I
dominantan - Osobina koja se izražava u fenotipu u slučaju heterozigotnog genotipa
drumstick - Bastičasta tvorba, nalazi se u jezgrama granulocita žena
dimeri - Lezije uzrokovane ultraljubičastim zracima. Dva pirimidina (najčešće timina) međusobno se spajaju ciklobutanskim prstenovima
dijakineza - završni dio profaze mejoze I
dermatogrift - Model kožnih grebena prstiju, ruku i nogu, dlanova i tabana
desmosom - Region kontakta između epitelnih ćelija čiji keratin filamenti ulaze u plzma membranu
dicentrični hromosomi - Hromosomi sa dvije centromere
development - Proces regulacije rasta i rezultat je interakcije genoma sa citoplazmom u razvoju

E

E.coli (Escherichia coli) - Vrsta bakterije upotrijebljena kao model za biohemijska i molekularna istraživanja
elektrohemijski gradijent - Razlika između hemijske koncentracije i električnog potencijala kroz membranu
embrionalne stem ćelije (ES) - Ćelije rane embriogeneze u kulturi
endocitoza - Izbacivanje ekstracelularnog materijala preko vezikula formiranih od plazma membrane
endosom - Vezikularni podjeljak uključen u izdvajanje i transport materijala preko lisosoma u procesu endocitoze
enhance - Transkripcione regulatorne sekvence lokalizovane na mjestima udaljenim od promotora
epidermalni faktor rasta (EGF) - Faktor rasta koji stimulise ćelijsku proliferaciju
estrogen - Steroidni hormon proizvodi se u ovariju
eubakterije - Jedna od dvije najveće grupe prokariota
euhromatin - Dekondenzovani transkripcioni aktivni interfazni hromatin
exon - Segment gena koji obuhvata kodirajuće sekvencije
episom - Dvolančana cirkulatorna DNA u citoplazmi bakterija, može se ugraditi u bakterijski hromosom

F

fibroblast - Tip ćelije, nalazi se u konektivnom tkivu
fluorescentna in situ hibridizacija (FISH) - Metod za lociranje gena na hromosomu upotrebom fluorescentnih proba
fakultativni heterohromatin - Nalazi se u različitim količinama na različitim mjestima

fenotip - Spoljašnji izgled jedinke (fizički) uslovljen interakcijom sredine i genotipa
fenokopije - Svojstva indukovana faktorima sredine, ali slična onim za koje se zna da su genetski uslovljena
farmakogenetika - Proučava genetski uslovljene razlike u ponašanju na određeni lijek
fragilno X - Prekid kontinuiteta obojenosti na hromosomu X
fluorescentno tjelašće - Y hromatin vidljiv u interfaznim jedrima somatskih ćelija kod muškarca, tj. q-regija donjeg kraka Y hromosoma vidljiva samo fluorescentnim mikroskopom
fotoreaktivacija - Jedan od načina popravka oštećene DNA UV-zracima za koju nije potrebna komplementarnost baza drugog neoštećenog lanca
frekvencija gena - Neki gen u populaciji ima istu frekvenciju iz generacije u generaciju tako dugo dok neki faktor sredine ne djeluje u smislu promjene frekvencije
fag - Virusi bakterija, bakteriofagi

G

gen - jedinica nasljedna koja određuje redoslijed amino kiselina jednog polipeptida ili molekula neke RNA
genetski kod - Triplet nukleotida baza koji kodira neku amino kiselinu u procesu sinteze proteina
gamet - Polna ćelija (spermij ili jaje) sa haploidnim broje hromosoma (n)
genotip - Genetska osnova individue
genom - Sveukupni nasljedni materijal individue
genokopije - Pojava u kojoj različiti geni daju jednak ili sličan fenotip

glukoza-6-fosfat dehidrogenaza - Teške hemolitičke reakcije nakon primanja nekih lijekova uzrokovane nedostatkom ovog enzima

genetski drift - Proces nesistematskih promjena u frekvencijama alela iz generacije u generaciju

G1 faza - Faza ćelijskog ciklusa između kraja mitoze i početka DNA sinteze

G2 faza - Faza ćelijskog ciklusa između kraja S faze i početka mitoze

gap junction - Kanal između plazma membrana formiran direktno između susjednih ćelija

genska amplifikacija - Broj kopija kao rezultat ponavljanja replikacije regiona DNA

generalna homologna rekombinacija - Izmjena segmenata između homolognih DNA molekula

generalni transkripcijski faktor - Transkripcijski faktor je dio opšteg transkripcijskog mehanizma

glikokaliks - Karbohidratni pokrivač ćelijske površine

glikogen - Polimer glukoze

glikoliza - Anaerobna razgradnja glukoze

glikoprotein - Protein vezan za oligosaharide

glikozilacija - Dodatak karbohidrata u proteine

Goldžij aparat - Citoplazmatski organel uključen u proces razdvajanja proteina i lipida. U biljnim ćelijama je mjesto sinteze ćelijskog zida polisaharida

gametogeneza - Formiranje muških i ženskih gameta u mejozi

gametogeneza - Formiranje muških i ženskih gameta u mejozi

H

Hfr ćelije - Muške ćelije u bakterija *E. coli* sa integrisanim faktorom polnosti F u bakterijski hromosom

humani genom projekt - Projekt koordiniran od Janes Watsona obuhvata sekvencije kompletnog 3x10⁹ nukleotid p.b. humanog genoma i mapu svih ispitanih 50-100.000 humanih gena

H-y antigen - Y-vezani geni imaju histokompatibilni lokus, nazvan H-Y lokus. Produkt ovog lokusa je H-Y antigen. U ranom embrionalnom stadiju rezultira u testis formaciju..

haploid - Organizam ili jedna ćelija ima samo jednu kopiju svakog hromosoma

heterohromatin - Kondenzovani transkripciono inaktivni hromatin

histoni - Proteini vezani za DNA u eukariotskim ćelijama

Hollidej junction - Model procesa rekombinacije genetskog materijala između dva homologna hromosoma

homeobox - Smještene DNA sekvencije od oko 180 p.b.

homeodomajn - Tip DNA područja naden u transkripcionim faktorima regulatornih gena odgovornih za ekspresiju gena u toku embrionalnog razvoja

homologna rekombinacija -

Rekombinacija između segmenata DNA sa homolognim nukleotid sekvencijama

hibridizacija - Oplodjenje između dvije genetski različite jedinke, nakon čega nastaju ćelije sa genetskim uputama

roditeljskih ćelija

hijazmata - Mjesto rekombinacije između dva homologna hromosoma

hromatin - Kompleks eukariotske DNA i proteina histona

hromatosom - Nosilac gena sastoji se od duge niti DNA i asociira sa proteinima

himere - Individue sastavljene od dvije populacije ćelija sa različitim genotipom

holandrično nasljeđivanje -

Nasljeđivanje gena porijeklom sa Y-

hromosoma. Zahvaćene samo muške osobe

homozigot - Jedinka koja posjeduje dva identična alela na jednom određenom lokusu para homolognih hromosoma

heterozigot - Diploidni organizam sa različitim alelima za jedan ili više gena

hermafroditizam - Jedinka koja posjeduje i muške i ženske spolne organe

I

imunoglobulin - Protein sintetisan u plazma-ćelijama koji prepoznaje specifični antigen u reakcijama antigen-antitijelo

inkompatibilnost - Donor i recipijent su inkompatibilni ukoliko ovaj posljednji odbacuju kalem porijeklom od onog prvog

intron - Region molekule DNA koji stvara onaj dio molekula prethodnica DNA koji se isijeca iz primarnogh RNA transkripta

insercijske sekvencije - Dijelovi DNA koji se mogu ugraditi na različitim mjestima u genomu ćelije i prekinuti ekspresiju susjednih gena

inverzije - Hromosomske mutacije nastaju kao posljedica jednostrukih ili dvostrukih prekida pri čemu se prekinuti segmenti okrenu za 180 stepeni

K

kodon - Triplet baza nukleotida iRNA komplementaran tripletu baza nukleotida na DNA tj genetskom kodu koji šifrira ugrađivanje specifične amino kiseline u peptidni lanac

kariotip - Kompletan set metafaznih hromosoma jedne ćelije

kinetohor - Dio centromera ima ulogu u pokretanju hromatida, tj. hromosoma u anafazi mitoze i mejoze

kataboliti - Jedinjenja koja predstavljaju degeneracione proizvode hrane

katalizator - Supstancija koja povećava brzinu hemijskih reakcija, a sama se ne troši

kloniranje - Proizvođenje mnogih kopija DNA sekvence naziva se kloniranje

kongenitalne - Stečene anomalije u toku intrauterinog života, prisutne sa rođenjem

konsagvini brak - Brak između krvnih srodnika, tj. osoba koje imaju jednog zajedničkog pretka

konstitutivni enzimi - Enzimi koji se sintetisu u toku cijelog života ćelije uvijek u istoj količini

krebsov ciklus - Reakcije oksidativnog metabolizma pirogrogđane kiseline u eukariotskim ćelijama

kolagen - Bjelančevina-glavni sastavni dio tkiva

kriste - Invaginacije unutrašnje mitohodrijalne membrane različite dužine. Povećavaju ukupnu unutrašnju membranu više puta, na njima se odvija proces oksidativne fosforilacije, tj. sinteza ATP

L

laminin - Glavni adhezioni protein bazalne lamine s unutrašnje strane ćelijske membrane

lamine - Unutrašnji filamenti proteina formiraju nukleolarnu laminu ćelijske membrane leptoten - Početni stadij profaze mejoze I u toku koje se spare hromosomi prije kondenzacije

lizogeni - Viralna infekcija kada se integriše u inaktivnu kopiju viralne DNA ćelijskog genoma

lisosomi - Citoplazmatske organele, obuhvataju hidrolitičke enezime koji razgrađuju biološke polimere

letalni alleli - Alleli koji rezultiraju smrću ćelije

LINES - Duge repetitivne sekvencije u genomu ćelije koje mogu sintetisati proteine a funkcija im nije dovoljno poznata

linkedž - Geni vezani za određene hromosome i zajedno sa njim prenose u potomstvo

lokus - Položaj gena na hromosomu
litički ciklus - Virusna infekcija koja dovodi do lize ćelije i "raspršavanja" novonastalih virusa

M

M faza - Mitotička faza ćelijskog ciklusa

makrofage - Tip bijelih krvnih ćelija specijaliziranih za fagocitozu

matrix - Unutrašnji mitohondrijalni prostor

mega baza (Mg) - Jedan milion nukleotida ili nukleotid parova baza

meiosis - Dioba diploidnih ćelija na haploidno potomstvo

mesoderm - Embriionalno tkivo

metafaza - Faza mitoze u toku koje se hromosomi nalaze u metafaznoj ploči

mikrofilamenti - citoskeletni filamenti koji sadrže aktin

mikrotubule - Komponente citoskeleta

mitohondriji - Ćelijski organeli u kojima se sintetiše najveća količina ATP u ćeliji pri oksidativnoj fosforilaciji

miton - nukleolarna dioba mitotičkog vretena

mutacija - Genetske promjene koje se nasljeđuju

monocistronska - Prepisivanje genetske šifre sa samo jednog gena u eukariota

multipli alleli - Alternativne forme ili različite varijante osnovnog gena nastale

uslijed hemijske promjene osnovnog gena na različitim pozicijama unutar gena

monosomija - Gubitak jednog člana hromosomskog para, tako da ih ima za jedan manje od diploidnog broja hromosoma ($2n-1$)

modifikacije - Fenotipske promjene koje se ispoljavaju samo dok traje djelovanje određenih činilaca sredine, a rezultat su izražajnosti gena bez promjena u strukturi

morganida - Osnovna jedinica rastojanja između 2 gena u hromosomskoj mapi (po Morganu)

mikrovil - Prstoliki izdanci vanjske ćelijske membrane

miofibrili - Snopovi mišićnih niti iz kojih su sastavljeni kontraktilni elementi mišićnih ćelija

mitotički crossover - Rekombinacija genetskog materijala između rijetkih parova homolognih hromosoma u toku mitoze u diploidnim ćelijama

monohibridno ukrštanje - Ukrštanje između dva identična hromosoma za neki par allelela

N

neuron - Ćelija specijalizirana za primanje i transmisiju signala kroz tijelo

neurotransmiter - Male hidrofилne molekule koje prenose signal od stimulatornih neurona

nuklearni envelope - Barijera koja odvaja nukleus od citoplazme, povezuje unutrašnju i vanjsku membranu, nuklearnu laminu i nukleolarne pore kompleks

nukleolus - Nukleolarna mjesta rRNA transkripcije, procesing i formiranje ribosoma

nukleosom - Osnovna strukturalna jedinica hromatina (oktamer histona i 200 parova baza)

nukleoid - Fosforilizacijski nukleosid

nukleofilament - Fiber hromatina debljine 10 nm

nukleus - Ćelijska struktura obavijena nuklearnom membranom, sadrži genetski materijal ćelije

NOR - Region organizator nukleolusa asocira sa nukleolarnim hromosomima u jedru

O

oligonukleotid - Kratki polimer od samo pet nukleotida

oligosaharid - Kratki polimer od samo pet šećera

onkogen - Gen sposoban da inducira jednu ili više karakterističnih kancer ćelija

operator - Regulatorne sekvencije DNA koje kontrolišu transkripciju operona

operon - Grupa susjednih gena transkribovanih kao jedinstvena iRNA

okazaki fragment - Replikacija je diskontinuirana, relativno kratki lanac DNA (fragmenti) se sintetišu u toku DNA replikacije i subsekventno vezuju u kontinuirani lanac

oogeneza - Razvoj ženskih germinativnih ćelija

olakšana difuzija - Prenos molekula kroz membranu uz pomoć energije

oocit - Neoplodena jajna ćelija

ovum - Zrela jajna ćelija. U sekundarnoj mejotičkoj diobi sekundarna oocita proizvodi dvije haploidne ćelije; velika ćelija brzo sazrijeva u zrelo jaje-ovum

P

pahiten - Stadij mejoze u toku kojeg se rekombinuju dva homologna hromosoma

parenhimske ćelije - Tip biljnih ćelija

sposobnih za najviše metaboličke aktivnosti

peroxisomi - Citoplazmatične organele

pinocitoza - Ispuštanje tekućine ili molekula iz ćelije preko malih vezikula

plazma membrana - Fosfolipidi vezani sa proteinima obavijaju ćeliju

plazmid - Male cirkulatorne molekule DNA autonomno se repliciraju u ćeliji bakterija

plazmodezma - Citoplazmatska veza između biljnih ćelija formirana od kontinuiranih regija plazma membrane

plastidi - Familija biljnih organela sadrže hloroplaste, hromoplaste, leukoplaste, amiloplaste i elaioplaste

policistroni - Multipli polipeptidni lanac kojeg kodira iRNA

polinukleotid - Polimer koji sadrži milione nukleotida

polipeptid - Polimer amino kiselina

polisaharid - Polimer koji sadrži stotine i hiljade molekula šećera

polisom - Serija ribosoma povezana sa iRNA

pre-iRNA - Primarni transkript iRNA u eukariotskim ćelijama

pre-rRNA - Primarni transkript koji je proizveden od pojedinačnih ribosomalnih rRNAs (28S, 18S i 5.8S) u eukariotskim ćelijama

pre-tRNA - Primarni transkript koji proizvodi prenosnu tRNA

primarna struktura - Sekvence amino kiselina u polipeptidnom lancu

primaza - Enzim RNA primaza inicira početak DNA replikacije

pseudogeni - Nastaju reverznom transkripcijom iRNA od mutiranog gena pretka, nefunkcionalna genska kopija
proteum - Skup svih proteina u čovjeku

promotor - DNA sekvencije za koje se RNA polimeraza vezuje u inicijaciji transkripcije

pronukleus - Dva haploidna nukleusa u novom fertilizacionom jajetu

prostetička grupa - male grupe željeza, šećera ili drugih materija u složenom proteinu

proteosom - Veliki proteinski kompleks degradiranih proteina

proteoliza - Degradacija polipeptidnog lanca

proto-onkogen - Normalni ćelijski gen može biti preveden u onkogen

pahinema - Stadij mejoze u toku kojeg homologni parovi hromosoma izmijeni homologne regije

pedigre analiza - Ispitivanje fenotipa za neko nasljedno svojstvo kroz više generacija

penetracija - Frekvencija dominantnog ili recesivnog gena u populaciji

politeni hromosomi - Posebni hromosomi rezultat su endomitoze kada nastaje veliki broj hromonema koje ostaju zajedno

poliploidija - Ćelije ili organizmi sa više hromosoma od normalnog broja

Q

q-bend tehnika - Tehnika bojenja hromosoma kvinakrindihloridom. Q-bend je jedinica obojenosti ovom tehnikom. Posmatra se samo fluoroscentnim mikroskopom

kvantitativna genetika - Studiji nasljeđivanja kvantitativnih svojstava

R

recesivan - Alleli koji se ne ispoljavaju kada su u kombinaciji sa dominantnim alelom

rekombinantna DNA - Sekvencija DNA koja se sastoji od fragmenta DNA i fragmenta vektorske DNA u procesu kloniranja

rekombinacija - izmjena genetskog materijala između dva homologna hromosoma koji potječu od različitih roditelja

restrikciona mapa - Mjesta DNA sekvencija koja sijeku enzimi restriktivne endonukleaze

retrovirus - Virus koji se replicira sa DNA u kopije RNA koristeći enzim reverznu transkriptazu

ribosomi - Partikule sastavljene od RNA i proteina u kojima se odvija proces sinteze proteina

RNA-polimeraza - Enzim koji katalizuje sintezu RNA

RNA splajsing - Povezivanje egsona u postsintetskoj obradi prim-transkripta iRNA

regulacijski geni - Geni koji su aktivni, imaju regulatornu funkciju u ekspresiji genske aktivnosti u ćeliji

replikoni - Mjesta replikacije u genomu ćelije

represori - Regulatori geni koji proizvode proteine koji kontrolišu transkripcionu aktivnost dijela operona

restrikcione endonukleaze - Enzimi koji presjecaju specifična mjesta DNA u procesu kloniranja DNA

ribonukleaze - Enzimi koji katalizuju degradaciju RNA nukleotida

ribonukleotid - Osnovna jedinica RNA sadrži šećer-ribozu, jednu bazu i fosfatnu grupu

ribosim - RNA molekule mogu funkcionisati kao enzim u cijepanju specifičnih sekvenci RNA molekula

Robertsonova translokacija - Tip

translokacije u koje se dugi kraci dva akrocentrična nehomologna hromosoma povežu jednom centromerom

S

S-faza - Faza ćelijskog ciklusa u kojoj se DNA replicira

sarkom - Kancer ćelija vezivnog tkiva

sekundarna struktura - Normalna izmjena konfiguracije primarnog polipeptidnog lanca u alfa i beta konfiguraciju

sekundarne vezikule - Transport proteina od Goldžijevog kompleksa na površinu ćelije

Southern blotting - Metoda u čijim se radioaktivnim probama upotrebljavaju specifični fragmenti DNA, fragmenti koji će biti izdvojeni za gel-elektroforezu

splajsosomi - Veliki kompleksi SnRNAs proteina koji katalizuju sljepljivanje egsona nakon post sintetske obrade primarnog transkripta iRNA

START - Regulatorna tačka u ćelijskom ciklusu kvasca u kasnoj G fazi. Nakon ove tačke ćelija može u S i dalje u ćelijski ciklus

stem ćelije - Ćelije se dijele proizvode kćeri ćelije ove se mogu diferencirati u druge ili mogu ostati kao stem ćelije

sinapsis - Povezivanje homolognih hromosoma u toku mejoze

sinaptonemalni kompleks - Proteinska struktura formirana duž homolognog para hromosoma u zigotenu profaze mejoze I

SINES - Kratke intermedijalne repetitivne sekvence DNA u humanom genomu, građene od oko 50 hiljada parova baza, mogu da kodiraju proteine

sestre hromatide - Hromatide proizvedene replikacijom od jednog

hromosoma u toku interfaze ćelijskog ciklusa

somatska ćelijska hibridizacija - Metoda za mapiranje humanih gena. Ovom metodom se fuzionišu dvije genetski različite somatske ćelije istih ili različitih vrsta u generaciju somatskih hibrida za genetsku analizu

somatske mutacije - Mutacije somatskih ćelija koje se ne prenose na potomstvo

specifična transdukcija - Tip transdukcije u kojoj se samo specifični geni prenose

spontane mutacije - Nastaju van upotrebe hemijskog ili fizičkih mutagenih agensa

strukturni geni - Geni koji kodiraju sintezu proteina

submetacentrični hromosom - Hromosom kod kojeg je centromere blizu jednom ili drugom kraju

supresorni geni - Geni koji sprečavaju aktivnost drugih gena

sinkarion - Nastaje fuzijom nukleusa dvije gamete različitih ćelija

stroma - Labavo raspoređeno membransko područje u hloroplastu u kojem se odvijaju tamne reakcije

segregacija - Odvajanje alela u toku mejoze tako da svaki gamet dobije samo po jedan član svakog alelnog para

sindrom - Skupina znakova i simptoma koji nastaju zajedno u nekoj određenoj bolesti

seksdukcija - Prenos genetskog materijala preko sekundarnih F ćelija

sekundarno suženje - Suženje spojene sa jedne strane za nukleolus, a sa druge strane za kraj gornjeg kraka hromosoma organizatora nukleolusa i svako drugo suženje, osim primarnog

T

TATA box - Regulatorne DNA sekvence nadene u promotorima mnogih eukariotskih gena transkribovani RNA polimerazom II

telomere - Sekvence DNA nastale reverznom transkriptazom nalaze se na krajevima hromosoma ili ponovljene sekvencije DNA na krajevima linealnih hromosoma

telofaza - Finalna faza mitoze u toku koje se nukleusi re-formiraju, a hromosomi se dekondezuju

testosteron - Steroidni hormon proizvode testisi

tiroidni hormon - Hormon sintetisan u tireoidnoj žlijezdi

tight junction - Čel-čel interakcija ili ćelijska indukcija u procesu komunikacije epitelnih ćelija

transkripcioni faktor - Protein aktivator RNA polimeraze

transkripcija - Sintaza RNA molekula sa kalupa DNA

transcitoza - Izdvajanje i transport proteina u različite dijelove plazma membrane prateći endocitozu

transformirani faktor rasta beta (TGF-beta) - Polipeptidni faktor rasta općenito inhibira proliferaciju animalnih ćelija

translacija - Prenos genetske informacije do mjesta sinteze proteina - ribosoma

transpozicija - Promjena položaja DNA sekvencija u genomu transposon - DNA sekvencije koje mogu mijenjati mjesta u genomu ćelije

tumor - Nastaje abnormalnom proliferacijom ćelija

Turnerov sindrom - Monosomija spolnog para hromosoma kod žena (45,X)

tetrada - Skupina od četiri hromatide

nastale pri sparivanju homolognih hromosoma spojenih sinapsisom

totipotentnost - Sposobnost da iz jedne ćelije nastane cjelovit organizam

tubulin - Globularna bjelanjčevina, osnovni sastojak mikrocjevčica

transfekcija - Prijenos genetskog materijala posredstvom viralne DNA

transformacija - Prenos genetskog materijala posredstvom bakterija

tautomerne promjene - Promjene protona u molekuli što dovodi do promjena hemijskih osobina

test komplementarnosti - Ubacivanje dva mutirana hromosoma (dijelova hromosoma) u istu ćeliju da bi se utvrdilo da li su se odgovarajuće mutacije odigrale na istom genu

U

ubiquitin - Visokokonzrvirani protein, ima ulogu markera za određivanje drugih ćelijskih proteina za bržu degradaciju

uniport - Transporti pojedinačnih molekula kroz membranu

uracil - Pirimidin naden u RNA u paru sa adeninom

unique - (singl kopija) Klasa sekvencija DNA javljaju se u 1-5 kopija u genomu

ultracentrifuga - Upotrebljava se za brzo sedimentiranje makromolekula pomoću velike brzine

V

vakuole - Velike membranske cjeline u citoplazmi eukariotskih ćelija

vektor - DNA molekule virusa ili plazmida, upotrebljavaju se u procesu kloniranja kao vektori za prenos strane DNA u ćeliju domaćina gdje će se reprodukovati-klonirati

vinblastin - Lijek inhibitor polimerizacije mikrotubula

inkristin - Lijek inhibitor, također, polimerizacije mikrotubula

varijacija genske frekvencije - Varijacije u frekvenciji alela u grupi unutar populacije

viralni onkogeni - Vidi ćelularni onkogeni :onkogeneza

virulentni fagi - Fage slične T4 koji uvijek prate litički ciklus kada je infekcija bakterija

virus - Nećelijski organizam može se reprodukovati samo van domaćina ćelije. Sadrži genetski materijal DNA ili RNA

vezani geni - Geni koji se nalaze na istom hromosomu i sa njim se prenose u potomstvo

vezano nasljeđivanje - Zajedničko ispoljavanje niza gena kroz niz generacija smještenih na istom hromosomu

Wilsonova bolest - Bolest koja se javlja kao posljedica poremećaja metabolizma proteina citoplazme

X

X-vezana svojstva - Recesivne mutacije gena na X hromosomu, obično se nasljeđuju kao recesivna svojstva. Ispoljavaju se kod muškaraca, a žene su najčešće konduktori

X hromosom - Spolni hromosom u dvije kopije kod homogametnog spola (XX) i u jednoj kopiji kod heterogametnog spola (XY)

Y

Y hromosom - Spolni hromosom u jednoj kopiji kod heterogametnog spola (XY)

Y hromatin - "F" tjelešce ili q12 regija

dugog kraka Y hromosoma muškarca vidljiva u interfaznom jedru samo po d fluoroscentnim mikroskopom

Z

zigota - Oplodeno jaje

zigoten - Stadij mejoze I u toku kojeg se formiraju homologni parovi hromosoma-sinapsis

žečije usne - Autosomalna recesivna anomalija

zona pelucida - Ovojnica jajeta na kojoj se nalaze receptori za pripajanje spermija