

ATCGTCTGGCAGCACGAGGC  
AGCTGGAGTCGTACATGCGT  
АСОСНОВИГНАGATAGGTAC  
GСМОЛЕКУЛАРНАТАТGСAG  
АТБИОЛОГИЈАСИGTCAGCC  
AGМОЛЕКУЛАРНАТАСТСАТ  
СGГЕНЕТИКАТGGAGTGTAC  
ААТGTGTСGСAGCTGGAGTC  
GTСашоАПановGTTGTСGC  
AGCGGTСGTACAAAGTCGTTG  
TCGCAGGTСGTACATGTСGT



Универзитет „Св. Кирил и Методиј“  
Природно-математички факултет-Скопје  
*електронско издание*  
2014

Рецензенти:

д-р Маја Осмак, научен советник на Заводот за молекуларна биологија при Институтот „Руѓер Бошковиќ“ во Загреб, Република Хрватска,

д-р Мирјана Кочова, редовен професор на Медицинскиот факултет при Универзитетот „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје и

д-р Владимир Јуруковски, истражувач на Државниот универзитет во Њујорк, САД (State University of New York at Stony Brook).

Лектура: проф- д-р Елка Јачева-Улчар и авторот

Техничка обработка: авторот

Издавач: Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Скопје

Со одлука на Наставно-научниот совет на Природно-математичкиот факултет - Скопје, во состав на Универзитетот „Св. Кирил и Методиј“, бр. 07-3238/6 од 12.6.2007 година се одобрува употребата на овој универзитетски учебник.

Со одлука на Ректорот на Универзитетот „Св. Кирил и Методиј“, бр. 11-379 од 17.5.2011 година се одобрува издавањето на учебникот.

Сите права се заштитени. Ниту еден дел, ниту книгата во целост, не смее да биде ре-продуциран или пренесен во која било форма или со кои било средства, електронски, дигитални или механички, вклучително и печатење, фотокопирање, преснимување, скенирање и чување во информациски системи, без претходна писмена дозвола од издавачот.

CIP - Каталогизација во публикација

Народна и универзитетска библиотека „Св. Климент Охридски“, Скопје

577.2(075.8)

ПАНОВ, Сашо З.

Основи на молекуларната биологија и молекуларната генетика / Сашо З. Панов - Скопје : Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, 2013. - 578 стр. : илустр. ; 26 cm  
Библиографија: стр.: 575-577. - Содржи и: Прилози А-Г

ISBN 978-9989-43-368-9

а) Молекуларна биологија - Високошколски учебници б) Молекуларна генетика - Високошколски учебници

COBISS.MK-ID 94986762



Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Скопје  
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ  
ИНСТИТУТ ЗА БИОЛОГИЈА

**д-р Сашо З. Панов**

вонреден професор по молекуларна биологија,  
молекуларна генетика и генетски инженеринг

# Основи на молекуларната биологија и молекуларната генетика

Скопје, 2014 година

*електронско издание*





## ПРЕДГОВОР

Оваа книга е одобрена како универзитетски учебник (со меѓународна рецензија) од страна на Универзитетот "Св. Кирил и Методиј" во Скопје наменет да биде основна литература и водич кој ќе им помогне на студентите да ја совладаат предвидената наставна програма. Покрај тоа, усвојувањето на македонската терминологија од оваа интердисциплинарна област ќе го олесни следењето и совладувањето на стручната литература на англиски јазик.

Попрецизно, учебников првенствено е наменет за теоретските предавања на првиот циклус (додипломски) студии по предметите: **основи на молекуларната биологија** за студиските програми молекуларна биологија и биохемија-физиологија; **молекуларна ġенетика, ġенетски инженеринġ** и **ġеномика и ѳроѳеомика** за студиската програма молекуларна биологија; **молекуларна биологија** за студиската програма за наставен кадар по биологија, како и за изборните предмети **биологија на ѳуморската клетка** и **молекуларна ġенетика** за студиските програми молекуларна биологија и биохемија-физиологија, сите наведени на Институтот за биологија при Природно-математичкиот факултет на Универзитетот „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје. Покрај тоа, наменет е и за истиот вид настава по предметите: **молекуларна биологија** и **ġенетика** за студиската програма аналитичка биохемија на Институтот за хемија при истиот факултет, како и за предметот **основи на молекуларната биологија** за студиските програми биотехнологија и прехранбена технологија на Технолошко-металуршкиот факултет на Универзитетот „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје. На вториот циклус (постдипломски) студии, овој учебник е наменет за наставата по предметите **молекуларна ġенетика** и **ġенетски инженеринġ** за студиската програма молекуларна биологија. Се разбира, учебникот ќе биде корисен и за студентите од третиот циклус (докторски) студии по биологија, како и за сродните факултети, какви што се студиите по медицина, фармација, ветерина, земјоделски науки, шумарство, како и за сите заинтересирани за областите кои ги покрива.

Во однос на организацијата на текстот, првите три глави од учебникот се воведни и, иако не можат да ги заменат ниту надоместат биолошките и хемиските предзнаења (особено определени поглавја од биохемијата и клеточната биологија, како и од други поопшти дисциплини), наменети се како потсетување на поважните концепти и терминологијата која е неопходна за полесно разбирање на натамошниот текст. Главите 4-6 се наменети за објаснување на структурата и основните функции на биолошките макромолекули: нуклеинските киселини и протеините. Начинот на кој геномската DNA се поврзува со протеините градејќи ги хромозомите во еукариотските клетки е прикажан во следната глава. Трите основни молекуларно-биолошки процеси во клетката: репликацијата, транскрипцијата и трансляцијата се обработени во главите: 8, 9 и 10, соодветно. Механизмите за регулација на генската експресија се прикажани во следната глава: 11. Текстот во главите 12 и 13 е посветен на основните концепти во класичната, трансмисиска генетика со акцент врз молекуларните аспекти и толкувања на Менделовото наследување и бројните форми на отстапувања од истото. Мутациите во гените, механизмите за нивната појава и последиците врз клетката и органозмот, како и репарацијата на мутациите се објаснети во главата: 14. Во следната глава се прикажани спецификите на генетските механизми и процеси кај вирусите и кај прокариотските организми. Една од најпро-

пулзивните дисциплини во модерната наука, геномиката, е основна тема на главата: 16. Кусиот осврт кон генетските аспекти на имунолошкиот систем кај вишите вертебрални организми е даден во следната глава од учебникот. Генетските механизми кои ги регулираат клеточната делба, развојот и диференцијацијата кај еукариотските организми се објаснети во главата: 18, а во следната глава се прикажани модерните сознанија за молекуларната биологија и генетика на малигните заболувања. Концептите на современите методи во молекуларната биологија, генетика и генетскиот инженеринг се објаснети во главите 20 и 21. Примената на генетскиот инженеринг во биотехнолошките процеси, како и во биоинформатиката се прикажани во следните две глави: 22 и 23, соодветно. Прилозите (приказ на моделните организми, збирка на решени задачи, речник на почесто користени изразии табели со корисни информации) се наоѓаат во последниот дел од учебникот.

Создавањето на првиот универзитетски учебник на македонски јазик во Република Македонија по теоретската настава по молекуларна биологија, молекуларна генетика и генетски инженеринг е тешка, долготрајна и деликатна задача. Имено, и покрај изобилството на печатени и електронски изданија на книги, енциклопедии и учебници на англиски јазик, кои ги покриваат наведените наставно-научни области и кои се достапни на македонските студенти во различен обем, во последниве десетина години се појави потреба од постоење на референтен универзитетски учебник на македонски јазик.

Задоволство ми е да ја изразам својата благодарност до сите личности, споменати или не во оваа прилика, кои допринеле за мотивирањето овој учебник да се напише, како и да се подготви за издавање. Изразувам благодарност за сета поддршка и соработка на моите почитувани колеги од Институтот за биологија при Природно-математичкиот факултет, како и на колегите и соработниците од Медицинскиот факултет, сите при Универзитетот „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје.

Голема благодарност изразувам на Ректорот на Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Скопје, проф. д-р Велимир Стојковски за поддршката за издавање на ракописот и на д-р Игор Есмеров за помошта во организацијата на техничката подготовка на текстот. Посебна благодарност изразувам на професорката д-р Даница Рогановиќ-Зафирова, која е заслужна за започнувањето на мојата академска кариера на Природно-математичкиот факултет.

Книгава ја посветувам на своите студенти, претходни и сегашни, повеќе од илјада досега, кои беа основниот мотив за долгогодишното пишување на учебникот.

Во текот на пишувањето на текстот, како и при неговата проверка и обработка, вложен е голем напор за минимизирање на печатните, граматичките и суштинските грешки, но, возможно е некоја од нив да опстои во првото издание. Оттаму ќе бидам многу благодарен на сите добронаменри критики и сугестии кои можат да го подобрат квалитетот на следните изданија на учебникот.

Скопје, ноември 2013 година

Сашо Панов

## Куса содржина

Глава 1: Основни концепти и историски осврт	1
Глава 2: Хемиски состав на живите организми	9
Глава 3: Кус осврт кон клеточната биологија	23
Глава 4: Нуклеинските киселини како носители на генетските информации	39
Глава 5: Структура на нуклеинските киселини	47
Глава 6: Протеини	65
Глава 7: Структурна организација на DNA-молекулот во хромозомите	117
Глава 8: Репликација и рекомбинација на DNA	129
Глава 9: Транскрипција - синтеза на RNA	163
Глава 10: Транслација - синтеза на протеини	197
Глава 11: Регулација на генската експресија	225
Глава 12: Кус осврт кон Менделовата генетика	251
Глава 13: Отстапувања од Менделовите принципи и други типови наследување	267
Глава 14: Генски мутации и нивната поправка	287
Глава 15: Молекуларна генетика на бактериите и вирусите	313
Глава 16: Геномика	345
Глава 17: Генетика на имунолошкиот систем	377
Глава 18: Генетски аспекти на клеточната делба и циклус, развојот и диференцијацијата	383
Глава 19: Молекуларна биологија и генетика на малигните заболувања	407
Глава 20: Основни методи во молекуларната биологија и молекуларната генетика	437
Глава 21: Генетски инженеринг	485
Глава 22: Примена на генетскиот инженеринг во биотехнологијата	513
Глава 23: Примена на биоинформатиката во молекуларната биологија и генетиката	523

Прилог А: Организми-моделѝ во молекуларната биологија и генетика	<b>533</b>
Прилог Б: Решени задачи	<b>543</b>
Прилог В: Речник на често користени изрази и кратенки	<b>555</b>
Прилог Г: Табели со корисни информации	<b>569</b>
Користена литература	<b>575</b>

# СОДРЖИНА

## Глава 1: Основни концепти и историски осврт 1

- 1.1 Дефинирање на молекуларната биологија и молекуларната генетика 2
- 1.2 Кус осврт кон историскиот развој на молекуларната биологија и молекуларната генетика 3

## Глава 2: Хемиски состав на живите организми 9

- 2.1 Вода 9
- 2.2 Неоргански дел 10
- 2.3 Органски соединенија 11
- 2.4 Макромолекулите се клучни компоненти за молекуларната биологија и генетиката 12
- 2.5 Кус осврт кон хемиските врски 12
  - Ковалентни врски 13
  - Нековалентни врски и слаби интеракции 13
- 2.6 Функционални групи 17
- 2.7 Тридимензионална структура: молекуларна конфигурација и конформација 19
- 2.8 Макромолекуларни интеракции 19
- 2.9 Ултрацентрифугирање на биолошките макромолекули 21

## Глава 3: Кус осврт кон клеточната биологија 23

- 3.1 Клеточна градба на организмите 24
- 3.2 Класификација на биолошките организми 25
- 3.3 Прокариоти 26
- 3.4 Еукариоти 26
- 3.5 Повеќеклеточни организми 27
- 3.6 Основни карактеристики на прокариотските клетки 28
- 3.7 Основни карактеристики на еукариотските клетки 29
  - Плазмалема (клеточна мембрана) 30
  - Јадро (нуклеус) 31
  - Ендоплазматски ретикулум (ЕР) 31
  - Голџиев апарат (систем, комплекс) 32
  - Митохондрии 32
  - Рибозоми 32
  - Пероксизоми (микротелца) 33
  - Лизозоми 33

Хлоропласти	33
Центриоли (микротубуларен организатор)	33
Цилии (трепки) и флагелуми (камшичиња)	34
Цитоскелет	34
Екстрацелуларен матрикс	36
Клеточен сид	36
Вакуоли во растителните клетки	37

#### **Глава 4: НУКЛЕИНСКИТЕ КИСЕЛИНИ КАКО НОСИТЕЛИ НА ГЕНЕТСКИТЕ ИНФОРМАЦИИ 39**

4.1	Бактериска трансформација - експериментот на Грифит	39
4.2	Првичен доказ дека DNA е носител на наследноста - експериментот на Авери, МекЛоуд и МекКарти	41
4.3	Конечен доказ дека DNA-молекулите ги пренесуваат генетските информации - експериментот на Хиршеј и Чејс	42
4.4	RNA-молекулите се генетскиот материјал кај некои вируси - експериментот на Френкел-Конрат и Сингер	44
4.5	Централна догма на молекуларната биологија	45

#### **Глава 5: СТРУКТУРА НА НУКЛЕИНСКИТЕ КИСЕЛИНИ 47**

5.1	Состав на нуклеинските киселини	47
5.2	Првични истражувања на структурата на DNA	50
5.3	Вотсон-Криков модел за структурата на DNA-молекулот	51
5.4	Главни форми на DNA	55
5.5	Алтернативни форми на DNA	57
5.6	Денатурација и ренатурација на DNA-молекулите	59
5.7	Структура на RNA-молекулите	61
5.8	Класификација на RNA-молекулите според функцијата	63

#### **Глава 6: ПРОТЕИНИ 65**

6.1	Аминокиселини	66
6.2	Пептидни врски	68
6.3	Номенклатура на протеините	70
6.4	Големина на протеинските молекули	71
6.5	Хиерархиски нивоа на протеинската структура	72
	Примарна структура	73
	Секундарна структура	74
	Терциерна структура	78
	Кватернарна структура	84

6.6	Постигнување на нативната форма на протеините и денатурација	<b>85</b>	
6.7	Молекуларни придружници - хаперони и хаперонини		<b>88</b>
6.8	Протеолиза	<b>89</b>	
	<i>Разградување на протеините посредувано со убиквитин</i>	<b>90</b>	
6.9	Абнормална конформацијата на протеините	<b>92</b>	
6.10	Алостерија и алостерична модификација	<b>95</b>	
6.11	Хемиски модификации на протеините	<b>96</b>	
6.12	Структурна класификација на протеините	<b>97</b>	
	<i>Фибриларни (кончести) протеини</i>	<b>97</b>	
	<i>Глобуларни протеини</i>	<b>97</b>	
6.13	Биолошки функции на протеините	<b>97</b>	
6.14	Примери за структура и функција на протеините		<b>102</b>
	<i>Структурни протеини: колаген</i>	<b>102</b>	
	<i>Структурни протеини: кератин</i>	<b>104</b>	
	<i>Пример за транспортни протеини: миоглобин</i>		<b>105</b>
	<i>Мембрански протеини</i>	<b>106</b>	
	<i>Мембрански транспортни протеини</i>	<b>109</b>	
	<i>Молекуларни мотори</i>	<b>113</b>	

## **Глава 7: СТРУКТУРНА ОРГАНИЗАЦИЈА НА DNA-МОЛЕКУЛОТ ВО ХРОМОЗОМИТЕ    117**

7.1	Суперспирална структура на циркуларните DNA-молекули	<b>118</b>	
7.2	Тополошки параметри на суперспиралните DNA-молекули	<b>118</b>	
7.3	Нуклеозомска организација на DNA кај еукариотите		<b>120</b>
7.4	Хромозоми	<b>124</b>	
7.5	Анализа на хромозомите и кариотип	<b>125</b>	

## **Глава 8: РЕПЛИКАЦИЈА И РЕКОМБИНАЦИЈА НА DNA    129**

8.1	Експериментот на Мезелсон и Стал	<b>130</b>	
8.2	Основен механизам на DNA-репликацијата		<b>132</b>
	<i>Репликациски виљушки</i>	<b>132</b>	
8.3	Модел на репликација	<b>133</b>	
	<i>Тета-модел на репликација</i>	<b>134</b>	
	<i>Ротирачки модел на репликација</i>	<b>135</b>	
	<i>Модел на репликација на линеарните еукариотски хромозоми</i>	<b>135</b>	
8.4	DNA-полимерази	<b>136</b>	

	<i>Прокариотски DNA-полимерази</i>	<b>138</b>
	<i>Еукариотски DNA-полимерази</i>	<b>139</b>
8.5	Иницирање на репликацијата	<b>141</b>
8.6	Елонгација на репликацијата	<b>142</b>
	<i>Реплизом - молекуларна машина за репликација</i>	<b>144</b>
	<i>Динамика на репликацијата</i>	<b>147</b>
8.7	Регулирање на суперспиралноста во текот на репликацијата	<b>149</b>
8.8	Терминирање на DNA-репликацијата	<b>151</b>
8.9	Брзина и прецизност на репликацијата	<b>152</b>
8.10	Специфики на DNA-репликацијата кај еукариотите	<b>153</b>
8.11	Теломери и теломераза	<b>155</b>
8.12	Генетски рекомбинации	<b>158</b>
	<i>Хомологна (општа) генетска рекомбинација</i>	<b>158</b>
	<i>Рекомбинација специфична за позиција</i>	<b>161</b>

## **Глава 9: ТРАНСКРИПЦИЈА - СИНТЕЗА НА RNA 163**

9.1	Транскрипцијата е ензимска синтеза на RNA според DNA-урнек	<b>164</b>
9.2	Примарни транскрипти и mRNA	<b>166</b>
9.3	Споредба на транскрипцијата со DNA-репликацијата	<b>166</b>
9.4	Прокариотска RNA-полимераза	<b>167</b>
9.5	Промотори	<b>168</b>
9.6	Иницирање на транскрипцијата кај <i>E. coli</i>	<b>170</b>
9.7	Елонгација на транскрипцијата кај <i>E. coli</i>	<b>171</b>
9.8	Терминацијата на транскрипцијата кај <i>E. coli</i>	<b>172</b>
	<i>Интринсична или Р<sub>о</sub>-независна терминација</i>	<b>173</b>
	<i>Р<sub>о</sub>-зависна терминација</i>	<b>174</b>
9.9	Прецизност на транскрипцијата	<b>174</b>
9.10	Транскрипција кај еукариотите	<b>175</b>
	<i>Еукариотски DNA-полимерази</i>	<b>176</b>
	<i>Основен регулаторен елемент</i>	<b>177</b>
	<i>Општи транскрипциски фактори</i>	<b>178</b>
	<i>Други специфичности на еукариотската транскрипција</i>	<b>179</b>
9.11	Процесирање на 5'- и 3'-краевите на примарниот транскрипт од протеин-кодирачките гени	<b>180</b>
	<i>Додавање 7-метилгуанозинска капа на 5'-крајот</i>	<b>180</b>
	<i>Додавање полиаденилатна (поли-А) опашка на 3'-крајот</i>	<b>181</b>
9.12	RNA сплајсинг - преспојување на примарниот RNA-транскрипт	<b>182</b>



	<i>Механизми на RNA сплајсингот</i>	<b>184</b>
	<i>Преспојување со сплајсеозом</i>	<b>184</b>
	<i>Самопреспојување</i>	<b>186</b>
	<i>Алтернативен RNA-сплајсинг</i>	<b>190</b>
	<i>Алтернативно пресекување на 3'-крајот од примарниот транскрипт</i>	<b>192</b>
	<i>Алтернативни промотори</i>	<b>192</b>
9.13	<i>RNA-уредување</i>	<b>192</b>
	<i>RNA-уредување со хемиска измена на постојните рибонуклеотиди</i>	<b>193</b>
	<i>RNA-уредување со вметнување или со отстранување на рибонуклеотиди</i>	<b>194</b>
9.14	<i>Транспорт на mRNA-молекулите од јадрото во цитоплазмата</i>	<b>195</b>

## **Глава 10: ТРАНСЛАЦИЈА - СИНТЕЗА НА ПРОТЕИНИ 197**

10.1	<i>Откривање на генетски код</i>	<b>197</b>
10.2	<i>Концепт за генетскиот код</i>	<b>199</b>
	<i>Генетскиот код е повторлив, но, недвосмислен</i>	<b>201</b>
	<i>Генетскиот код е речиси универзален</i>	<b>201</b>
10.3	<i>Рамки на читање на кодот</i>	<b>202</b>
10.4	<i>Транспортната RNA како носач на специфични аминокиселини</i>	<b>203</b>
10.5	<i>Структура на tRNA молекулите</i>	<b>204</b>
10.6	<i>Транскрипција и процесирање на tRNA-молекулите</i>	<b>205</b>
10.7	<i>Феномен на колебање</i>	<b>207</b>
10.8	<i>Поврзување на аминокиселините со tRNA</i>	<b>207</b>
10.9	<i>Препознавање на mRNA-кодонот-експериментот на Бенцер</i>	<b>208</b>
10.10	<i>Транскрипција и процесирање на rRNA-молекулите</i>	<b>209</b>
10.11	<i>Рибозомите како трансляциска машинерија</i>	<b>210</b>
	<i>Експериментот на Бренер, Жакоб и Мезелсон</i>	<b>212</b>
	<i>Транслацијата е полипептидна синтеза според RNA-урнек</i>	<b>212</b>
10.12	<i>Иницирање на транслацијата</i>	<b>214</b>
10.13	<i>Елонгација на полипептидната верига</i>	<b>216</b>
10.14	<i>Терминирање на транслацијата</i>	<b>218</b>
10.15	<i>Општ осврт кон транслацијата</i>	<b>219</b>
	<i>Полирибозоми</i>	<b>220</b>
10.16	<i>Разлики во транслацијата меѓу прокариотите и еукариотите</i>	<b>221</b>
	<i>Регулација на транслацијата</i>	<b>221</b>

- 10.17 Посттранслациска модификација на протеините **222**  
10.18 Посттранслациски случувања **222**

## **Глава 11: РЕГУЛАЦИЈА НА ГЕНСКАТА ЕКСПРЕСИЈА 225**

- 11.1 Регулација на генската експресија кај прокариотите **225**  
*Оперони - континуирани транскрипциски единици* **226**
- 11.2 Негативна и позитивна контрола на експресијата на гените во оперонот **228**  
*Пример за негативно индуцибилна контрола:*  
***lac*-оперон 231**  
*Пример за негативно репресибилна контрола:*  
***trp* оперон 232**  
*Пример за позитивно индуцибилна контрола* **234**
- 11.3 Регулација на генската експресија кај еукариотите **236**
- 11.4 Регулирање на транскрипцијата со ремоделирање на хроматинот **237**
- 11.5 Транскрипциска регулација на генската експресија кај еукариотите **238**  
*Регулаторни DNA-елементи* **239**  
*Регулаторни протеини кои се врзуваат со DNA* **242**
- 11.6 Координирана експресијата на гените **244**
- 11.7 Посттранскрипциска регулација на генската експресија кај еукариотите **246**
- 11.8 Регулација на генската експресија со мали RNA-молекули (микро-RNA и интерферирачки RNA) **247**
- 11.9 Транслациска и посттранслациска регулација **249**

## **Глава 12: КУС ОСВРТ КОН МЕНДЕЛОВАТА ГЕНЕТИКА 251**

- 12.1 Основни концепти и терминологија во генетиката **251**  
*Номенклатура на гените* **254**
- 12.2 Монохидридни вкрстувања **254**
- 12.3 Молекуларен фенотип на формата на семиња грашок **256**
- 12.4 Принцип на сегрегација - прв Менделов закон **258**
- 12.5 Принцип на независна распределба - втор Менделов закон **260**
- 12.6 Молекуларни аспекти на доминантноста и рецесивноста **262**  
*Хипоморфни мутации кои имаат полза за организмот* **265**

## **Глава 13: ОТСТАПУВАЊА ОД МЕНДЕЛОВИТЕ ПРИНЦИПИ И ДРУГИ ТИПОВИ НАСЛЕДУВАЊЕ 267**

13.1	Отстапувања од целосната доминантност	<b>267</b>
	<i>Интермедиерно наследување</i>	<b>269</b>
	<i>Кодоминантно наследување</i>	<b>269</b>
13.2	Полигени, мултифакторијални и комплексни особини	<b>270</b>
13.3	Плеотропен ефект	<b>270</b>
13.4	Влијание на еден ген врз друг - епистаза	<b>270</b>
13.5	Енвиронментални влијанија	<b>271</b>
13.6	Импринтирање	<b>273</b>
13.7	Пенетрантност и експресивност	<b>273</b>
13.8	Феномен на генетско предвидување	<b>274</b>
13.9	Мултипли алели	<b>275</b>
13.10	Родословни стебла	<b>277</b>
13.11	Наследување на заболувањата и типови родословни стебла	<b>279</b>
	<i>Родословни стебла кај автозомното наследување</i>	<b>279</b>
12.12	Наследување врзано со половите хромозоми	<b>281</b>
	<i>Полови хромозоми кај луѓето</i>	<b>281</b>
	<i>Наследување врзано со X-хромозомот</i>	<b>282</b>
	<i>Наследување врзано со Y-хромозомот</i>	<b>283</b>
13.13	Цитоплазматско наследување	<b>284</b>
13.14	Наследување кај близнаците и конкорданција	<b>285</b>

## **Глава 14: ГЕНСКИ МУТАЦИИ И НИВНАТА ПОПРАВКА 287**

14.1	Класификација на мутациите на ниво на DNA-молекулите	<b>289</b>
14.2	Класификација на мутациите на ниво на протеинскиот продукт	<b>290</b>
	<i>Адиции или делеции на еден до неколку нуклеотидни пара</i>	<b>292</b>
14.3	Номенклатура на генските мутации	<b>293</b>
14.4	Причини за мутациите	<b>294</b>
	<i>Спонтани мутации</i>	<b>294</b>
	<i>Индуцирани мутации</i>	<b>297</b>
	<i>Мутации предизвикани со мобилни гени</i>	<b>301</b>
14.5	Мутациска стапка	<b>301</b>
14.6	Биолошка репарација на DNA-мутациите	<b>303</b>
	<i>Транслезиска DNA-синтеза</i>	<b>304</b>
	<i>Пострепликациска репарација</i>	<b>305</b>

	Директна репарација	307	
	Репарација со базна ексцизија	308	
	Репарација со нуклеотидна ексцизија	309	
	Репарација на двоверижни прекини	310	
14.7	Еволуциско и биолошко значење на мутациите	311	

## **Глава 15: МОЛЕКУЛАРНА ГЕНЕТИКА НА БАКТЕРИИТЕ И ВИРУСИТЕ 313**

15.1	Размножување на бактериите и издвојување на мутантни соеви	313	
15.2	Плазмиди - екстрахромозски DNA-молекули кај бактериите	317	
15.3	Рекомбинации кај бактериите	319	
15.4	Бактериска конјугација	320	
	<i>F</i> -фактор	323	
	<i>Hfr</i> -клетки	324	
	Мапирање на бактериските гени со прекинато спарување	325	
15.5	Бактериска трансформација	327	
15.6	Трансдукција	329	
15.7	Кус осврт кон вирусите	330	
15.8	Основна структура на вирусите	331	
15.9	Вирусни геноми	332	
15.10	Генетика на бактериофазите	333	
	Размножување на бактериофазите со литички или лизоген циклус	334	
15.11	Животен циклус на вирусите кои ги инфицираат еукариотските клетки	336	
15.12	Репликација на вирусниот геном	337	
	Репликација и животен циклус на ретровирусите	340	
	<i>HIV</i> - вирус на сидата	340	
15.13	Вироиди - инфективни нуклеински киселини	342	

## **Глава 16: ГЕНОМИКА 345**

16.1	Структурна геномика	346	
	Геномско секвенционирање базирано на генски мапи	346	
	Геномско секвенционирање според методот на „случаен истрел“	347	
16.2	Функционална геномика	348	
16.3	Прокариотски геноми	349	
16.4	Еукариотски геноми	350	

16.5	Споредба на еукариотските геном со прокариотските	<b>351</b>
16.6	Мобилни генски елементи	<b>352</b>
	<i>Транспозони</i>	<b>353</b>
	<i>Процес на транспозиција</i>	<b>353</b>
16.7	Типови на DNA-секвенци во еукариотските геноми	<b>357</b>
	<i>Репетитивни секвенци и мобилни елементи во еукариотскиот геном</i>	<b>358</b>
16.8	Структура на протеин-кодирачките гени	<b>358</b>
16.9	Геном на човекот	<b>360</b>
	<i>Единечни нуклеотидни полиморфизми и хаплотипови</i>	<b>364</b>
16.10	Компаративна геномика	<b>365</b>
	<i>Најмали прокариотски и еукариотски геноми</i>	<b>367</b>
	<i>Најголеми прокариотски и еукариотски геноми</i>	<b>368</b>
16.11	Еволуција на гените и генски фамилии	<b>369</b>
	<i>Еволуција на глобинските гени</i>	<b>369</b>
	<i>Генски стебла</i>	<b>370</b>
16.12	Митохондриски и хлоропластни геноми	<b>371</b>
	<i>Митохондриски геноми</i>	<b>372</b>
	<i>Репликација на митохондриската DNA</i>	<b>374</b>
	<i>Хлоропластни геноми</i>	<b>375</b>

## **Глава 17: ГЕНЕТИКА НА ИМУНОЛОШКИОТ СИСТЕМ   377**

17.1	Основна структура на имуноглобулините и на Т-клеточните рецептори	<b>378</b>
17.2	Генетски основи на создавањето на разновидноста на антителата и на Т-клеточниот рецептор	<b>379</b>

## **Глава 18: ГЕНЕТСКИ АСПЕКТИ НА КЛЕТОЧНАТА ДЕЛБА И ЦИКЛУС, РАЗВОЈОТ И ДИФЕРЕНЦИЈАЦИЈАТА   383**

18.1	Клеточна делба	<b>383</b>
	<i>Митоза и мејоза</i>	<b>384</b>
	<i>Врзани гени</i>	<b>387</b>
18.2	Клеточен циклус	<b>387</b>
18.3	Молекуларни аспекти на клеточниот циклус и неговата регулација	<b>389</b>
18.4	Генетика на развојот	<b>391</b>
	<i>Формирање на планот за градба на телото на организмот</i>	<b>392</b>
	<i>Молекуларни механизми за позиционирачките информации во текот на развојот</i>	<b>393</b>

18.5	Генетика на развојот на <i>Drosophila melanogaster</i>	<b>394</b>
	Сегментациски гени	<b>395</b>
	Хомеотски гени	<b>397</b>
18.6	Клеточна диференцијација	<b>399</b>
	Матични (стем) клетки	<b>400</b>
	Сенесценција	<b>402</b>
18.7	Апоптоза	<b>402</b>
	Молекуларни механизми на апоптозата кај цицачите	<b>404</b>

## **Глава 19: МОЛЕКУЛАРНА БИОЛОГИЈА И ГЕНЕТИКА НА МАЛИГНИТЕ ЗАБОЛУВАЊА   407**

19.1	Кус историјат на проучувањето на канцерот	<b>407</b>
19.2	Дефиниции за канцерот	<b>409</b>
	Основна терминологија	<b>409</b>
19.3	Епидемиологија на малигните заболувања	<b>411</b>
19.4	Канцерот како најчесто генетско заболување	<b>413</b>
	Концепт за онкогени и тумор-супресорски гени	<b>414</b>
	Клонална еволуција кај неоплазмите	<b>416</b>
	Мутациска стапка кај клетките на канцерот	<b>418</b>
	Функционална класификација на гените вклучени во канцерогенезата	<b>418</b>
19.5	Онкогени и патишта за пренесување на сигналот за делба	<b>419</b>
	Супституциски мутации на гените <b>RAS</b> кај малигните тумори	<b>422</b>
	Активација на протоонкогенот <b>c-ABL</b> со хромозомска транслокација	<b>423</b>
	Генска амплификација и вирусна интеграција	<b>423</b>
19.6	Тумор-супресорски гени	<b>424</b>
	Тумор-супресорски ген <b>RB</b>	<b>425</b>
	Тумор-супресорски ген <b>TP53</b>	<b>426</b>
19.7	Редуцирана апоптоза	<b>428</b>
19.8	Зголемена теломеразна активност	<b>429</b>
19.9	Инвазија на околните ткива и метастазирање	<b>430</b>
	Разложување на <b>ECM</b>	<b>431</b>
	Клеточна адхезија	<b>432</b>
	Клеточна мобилност	<b>432</b>
19.10	Ангиогенеза	<b>433</b>
19.11	Поврзаност на канцерот со вируси	<b>433</b>
19.12	Хередиитарна сконост кон канцер	<b>434</b>

## Глава 20: ОСНОВНИ МЕТОДИ ВО МОЛЕКУЛАРНАТА БИОЛОГИЈА И МОЛЕКУЛАРНАТА ГЕНЕТИКА 437

- 20.1 Изолација на нуклеинските киселини од биолошки материјал **437**
  - Изолација на DNA* **437**
  - Изолација на RNA* **438**
- 20.2 Рестрикциска дигестија на DNA **440**
  - DNA лигаза* **444**
- 20.3 Електрофореза на нуклеинските киселини **444**
- 20.4 Хибридизација на нуклеински киселини и Сатерн блотинг-анализа **448**
  - Пример за испитување на поврзаност на вродено заболување со определен ген* **450**
  - Пример за детекција на мутација во  $\beta$ -глобинскиот ген* **451**
  - Алелно-специфична олигонуклеотидна хибридизација и дот-блотинг* **453**
  - Флуоресцентна *in situ* хибридизација* **454**
- 20.5 Полимеразна верижна реакција (PCR) **456**
  - Принципи на PCR-амплификација* **457**
  - Натамошни анализи на PCR-амплифицираната DNA* **461**
  - Посебни PCR-техники* **462**
- 20.6 Секвенционирање на DNA **466**
- 20.7 Реверзна транскрипција - синтеза на DNA според mRNA-урнек **471**
  - Реверзно-транскриптазна PCR (RT-PCR)* **472**
- 20.8 DNA-матрици и микрочипови **473**
- 20.9 Скринирање со два хибрида **474**
- 20.10 Футпринтинг **475**
- 20.11 Протеински методи **477**
- 20.12 Принципи на хроматографско пречистување на протеини **477**
  - Гел-филтрација* **478**
  - Јоноизменувачка хроматографија* **479**
  - Афинитетна хроматографија* **480**
- 20.13 Електрофореза на протеини **480**
  - Двеминзионална електрофореза на протеини* **481**
- 20.14 Имуноблотинг (**Western**-блотинг) анализа **483**

## **Глава 21: ГЕНЕТСКИ ИНЖЕНЕРИНГ 485**

	<i>Основен концепт и терминологија</i>	<b>486</b>
21.1	Избор на вектор за клонирање	<b>487</b>
	<i>Плазмиди</i>	<b>487</b>
	<i>Вирусни вектори</i>	<b>488</b>
21.2	Избор на клетка-домаќин за клонирање	<b>490</b>
21.3	Инсерција на егзогена DNA во векторот	<b>491</b>
21.4	Внесување рекомбинирани вектори во клетките-домаќини	<b>494</b>
21.5	Селекција на клетките во кои успешно е внесен рекомбиниранiot вектор	<b>496</b>
21.6	Создавање геномски библиотеки	<b>498</b>
21.7	Плазмидни вектори кај растенијата	<b>499</b>
21.8	Потиснување на експресијата на специфични гени со <i>antisense</i> -RNA и со интерферирачка RNA	<b>501</b>
21.9	Хемиска синтеза на DNA во услови <i>in vitro</i>	<b>502</b>
21.10	Мутагенеза <i>in vitro</i>	<b>502</b>
21.11	Инактивација на гените со хомологни рекомбинации	<b>502</b>
21.12	Синтетичка биологија и геномски инженеринг	<b>504</b>
21.13	Молекуларна анализа на полиморфизмите на репетитивните DNA-секвенци	<b>507</b>
	<i>DNA-фингерпринтинг во форензиката</i>	<b>509</b>
21.14	Примена на DNA-технологијата во медицината	<b>509</b>
21.15	Генска терапија	<b>510</b>

## **Глава 22: ПРИМЕНА НА ГЕНЕТСКИОТ ИНЖЕНЕРИНГ ВО БИОТЕХНОЛОГИЈАТА 513**

22.1	Синтеза на еукариотски протеини со клонирање во експресиски вектори	<b>514</b>
22.2	Синтеза на протеини во фармацевтската индустрија	<b>515</b>
22.3	Рекомбинантна DNA-технологија во современото земјоделе	<b>516</b>
	<i>Експримирање на гени кај трансгенични животни</i>	<b>517</b>
	<i>Примена на трансгеничните растенија во земјоделието</i>	<b>517</b>
	<i>Растенија кои создаваат инсектициди</i>	<b>518</b>
	<i>Отпорност на растенијата кон вирусни инфекции</i>	<b>519</b>
	<i>Растенија резистентни кон хербициди</i>	<b>519</b>
	<i>Житни растенија со подобрени хранливи карактеристики</i>	<b>520</b>
22.4	Јавното мислење за биотехнологијата	<b>520</b>



## **Глава 23: ПРИМЕНА НА БИОИНФОРМАТИКАТА ВО МОЛЕКУЛАРНАТА БИОЛОГИЈА И ГЕНЕТИКА 523**

- 23.1 Обработка на DNA-базирани податоци **524**
  - Асемблирање на DNA-секвенци* **525**
  - Барање позиции за рестрикциски ендонуклеази во DNA-секвенци* **525**
  - Барање на протеин-кодирачки гени* **525**
- 23.2 Барање на сличности меѓу секвенци **526**
- 23.3 Пребарување на молекуларно-биолошки бази на податоци **528**
- 23.4 Филогенетски анализи **529**
- 23.5 Прикажување на структурни модели на макромолекулите **530**

## **Прилог А: Организми-модели во молекуларната биологија и генетика 533**

- Escherichia coli* (Грам-негативна бактерија) **534**
- Saccharomyces cerevisiae* (готварски квасец) **535**
- Neurospora crassa* (филаментозна квасна габа) **536**
- Arabidopsis thaliana* (цветно растение) **537**
- Caenorhabditis elegans* (валчесто црвче) **538**
- Drosophila melanogaster* (винска мушичка) **539**
- Fugu rubripes* (риба-балон, понекаде означена и како *Takifugu rubripes*) **540**
- Mus musculus* (глушец) **541**

## **Прилог Б: Решени задачи 543**

## **Прилог В: Речник на често користени изрази и кратенки 555**

## **Прилог Г: Табели со корисни информации 569**

## **Користена литература 575**

## **За авторот 578**



# ОСНОВНИ КОНЦЕПТИ И ИСТОРИСКИ ОСВРТ

## Глава 1

**Ж**ивотот е предмет на проучување на една од најкомплексните и најстари природни науки - биологијата. Сите живи суштества на Планетава, од најпримитивните микроорганизми, па, сè до најсложените цицачи и цветни растенија, се базираат на исти фундаментални биохемиски стратегии кои овозможуваат нивно преживување, размножување и натамошна еволуција. Слична супцелуларна и молекуларна структура и функција се наоѓа во зачудувачки различни организми независно од еколошката ниша во која живеат, од студените сибирски тундри, африканските пустини или врелите геотермни извори во големите океански длабочини. За да опстане, секоја клетка мора да ги поседува и да ги чува сите информации неопходни за развојот, растот, функционирањето, хомеостазата и репродукцијата на самата себе или на целиот организам. Информациите мора да бидат и ефектно преносливи врз следната генерација клетки за што служи молекулот на дeoксирибонуклеинската киселина (DNA), во чија долга верига составена од само четири типа субединици, елегантно е запишан генскиот код. Структурата на DNA обезбедува речиси неограничен број на комбинации од генетски информации кои се основа и за еволуцискиот процес кој создал милиони видови на организми на Земјата во текот на последните 3-4 милијарди години. Веројатно не е претерано да се каже дека нема поважен молекул во живиот свет.

Но, информациите енкodирани во молекулот на DNA не се функционални сами по себе, како што ниту нотите во музичката партитура не ги произведуваат звуците на симфонијата без инструментите и членовите на оркестарот, како што ниту пак готварскиот рецепт автоматски не обезбедува добар вкус и мирис на јадењето, доколку нема добар готвач и потребни намирници. За таквите функции е задолжен процесот на транскрипција со кој информациите запишани во DNA-веригите се преведуваат во молекулите на рибонуклеинската киселина (RNA). Понатаму, во клеточните фабрики за протеинска синтеза - рибозомите, според информациите од RNA-урнекот се градат полипептидните вериги користејќи 20 различни типа на аминокиселини.

Протеините се директните егзекутивни молекули кои извршуваат најразновидни сложени функции во клетката. Во зависност од типот на клетките и од организмот,

протеините можат да имаат улоги на структурни единици, катализатори, молекуларни пумпи, гласници, хормони, склопувачи на други молекули, како и разградувачи на клеточниот отпад. Протеинските молекули можат да се врзуваат со нуклеинските киселини и да ја регулираат нивната репликација и транскрипцијата. Тие се директните регулатори на клеточната делба, преживувањето, и се егзекутори на сложените имунолошки механизми на клеточен и хуморален одговор. Некои клетки лачат одбранбени токсични протеини насочени кон туѓи организми или нивни клетки. Во определени околности, како во текот на ембриогенезата и некои патолошки состојби, посебни протеини можат да ја одведат клетката во програмирана смрт - апоптоза.

## 1.1 Дефинирање на молекуларната биологија и молекуларната генетика

Како што произлегува од името, биологијата е наука која ги проучува живите организми. Самите биолошки истражувања можат да бидат насочени кон различни нивоа: од молекуларните компоненти на клетката, преку ткивата, органите, индивидите од разни таксономски категории, па, сè до нивните заедници и целиот познат екосистем.

Изразот молекуларна биологија прв го употребил математичарот Вивер (Weaver) од Универзитетот Рокфелер уште во 1933 година. Првичната дефиниција на молекуларна биологија се користела за научната дисциплина која ги изучува биолошките процеси на молекуларно ниво. Со текот на времето, значењето постепено се ограничувало кон проучување на биолошките макромолекули: нуклеинските киселини (DNA и RNA) и протеините. Современото дефинирање на молекуларна биологија е многу потесно и се однесува на истражувањата на интеракциите меѓу нуклеинските киселини и протеините, пред сè во контекст на структурата и функцијата на гените, а особено на регулацијата на генската експресија.

Повоопштено, предмет на проучување на молекуларната биологија се структурно-функционалните феномени на макромолекулите во клеточниот и ткивниот микросвет, меѓусебната интеракција на макромолекулите, како и нивната улога во развојот, диференцијацијата и животот на организмот. Во потесна смисла, молекуларната биологија ги проучува нуклеинските киселини, молекуларната градба и функција на гените, како и процесите на репликација, репарација, рекомбинација, транскрипција и транслација. Рекомбинантната DNA-технологија, т.е. генетскиот инженеринг, е методолошка гранка на молекуларната биологија и генетика. Пронаоѓањето начин да се разбере граматиката и синтаксата на навидум немиот „јазик“ на DNA-молекулите, е уште една од основните цели на модерната молекуларна биологија и генетика, при што се користат софистицирани биоинформатички методи.

Очигледно е дека суштината на молекуларната биологија се преплетува со тие на биохемијата и генетиката (**слика 1-1**). Сепак, биохемијата е повеќе ориентирана кон структурата и функцијата на протеините и другите биолошки молекули, како и на метаболичните и другите клеточни патишта, додека генетиката го проучува наследувањето кај единките и популациите, како и морфолошките генетски аспекти (структура и број на хромозомите).



**Слика 1-1:** Сликвит приказ на релативното разграничување и преклопување на предметите на проучување кај биохемијата, генетиката и молекуларната биологија.

фармацијата, ветерината, земјоделието, но, и врз правните легислативи и етичките и филозофските аспекти на човековото дејствување. Егзактните параметри кои го потврдуваат тоа се објавените научни трудови, публикации, откритија, патенти и награди, кои, според бројот и значењето, ги надминуваат тие од сите други биолошки дисциплини заедно. Интензивноста на развојот и применливоста на молекуларната биологија и генетика може единствено да се спореди со тој на информатичката технологија.

## 1.2 Кус осврт кон историскиот развој на молекуларната биологија и молекуларната генетика

Луѓето отсекогаш ја забележувале сличноста меѓу членовите на поедини семејства. Уште во најстарите сочувани записи од човековата историја забележано е дека конкретните особини се наследуваат директно од родителот врз потомците. Од друга страна, во некои култури постоеле вековни верувања за постоење на бизарни суштества родени со вкрстување меѓу сосем различни видови. Така, во Грчката митологија се спомнува суштеството наречено Минотаур, кое има тело на бик, а торзо и глава на човек. Постоело верување и дека жирафата е резултат на вкрстување на камила и леопард, па, дури и научното име *Giraffa cameleopardis* потекнува од таму. Почнувајќи од средниот век, луѓето станале свесни дека таквите спарувања се невозможни и дека наследувањето се одвива главно во рамките на секој растителен или животински вид. Било очигледно дека главните карактеристики на поединечните видови остануваат речиси непроменети во текот на генерациите.

Треба да се има предвид дека ваквото дефинирање е препоедноставено од дидактички причини и дека овие научни дисциплини не се меѓусебно толку јасно разграничени, а понекогаш е тешко да се дефинира и самата научна област. Имено, според некои автори, молекуларната генетика е потесна дисциплина на генетиката и ги проучува генетските информации на молекуларно ниво. Наспроти тоа, други автори сметаат дека тоа е молекуларно-биолошка гранка која ги проучува репликацијата, транскрипцијата, транслацијата, како и регулацијата на генската експресија, генетските рекомбинации, мутациите и нивните поправки, како клучни клеточни процеси.

Денес, молекуларната биологија и молекуларната генетика се едни од најпропулзивните природни научни дисциплини и имаат исклучителен развој и влијание врз повеќе применети области, какви што се медицината,

Размислувањата околу механизмот на наследување кај луѓето се менувал со текот на историјата. Античките Грци, на пример, сметале дека телесните делови од родителите директно се пренесуваат во нивните деца. Хипократ го нарекол ваквиот наследен материјал *gonos*, што значи „семе“.

Со текот на времето, станало јасно дека сексуалното оплодување кај луѓето и животните, односно опрашувањето кај растенијата, е начин преку кој наследниот материјал се „меша“ и директно пренесува на наследството. Во 18-тиот век, постоело мислење поткрепено со првите микроскопски набљудувања на човековите спермиуми, дека со оплодувањето, семената течност внесува во женскиот организам мало човече (лат. *homunculus*), кое потоа се развива и раѓа. Чарлс Дарвин (Charles Darwin) во 1868 година ја објавил својата теорија за т.н. пангенеза според која циркулирачки единици наречени гемули се акумулираат во гонадите (половите жлезди) и се пренесуваат врз потомството. Но, ваквиот начин на наследување би предизвикал сите единки на еден вид да имаат исти карактеристики и да ги пренесуваат непроменето понатаму на наследството. Очигледно било дека тоа не се случува, туку, парадоксално, постои некој фактор на различност кој доведува до јасните разлики во изгледот и другите карактеристики кои можат да се забележат кај единките на секој вид.

Германскиот ботаничар Келројтер (Josef Koehltreuter) во 1760 година извршил серија на успешни хибридизации (вкрстувања) меѓу разни сорти на тутун и добил фер-



**Слика 1-2:** Грегор Мендел (1822-1884)

тилни нови сорти. Хибридите имале мали, но, забележливи, разлики во однос на паренталните (родителски) растенија. Интересно, кога хибридите ги вкрстил меѓусебно, некои растенија наликувале на претходната генерација, а некои на оригиналните (нехибридни) сорти. Овие експерименти се нукулец на модерната генетика и за првпат покажале дека наследниот материјал од родителите не се меша едноставно, туку дека некои особини можат да бидат маскирани во првата генерација на потомството, а потоа да се појават кај подоцнежните потомци. Келројтер за првпат ги означил наследните особини како **карактери**. Англичанецот Најт (Т. А. Knight) во 1790-тите години започнал експерименти со вкрстување кај градинарскиот грашок (*Pisum sativum*). За жал, исто како и Келројтер, Најт не вршел квантитативни анализи на своите резултати. Нумеричките резултати од вкрстувањата и нивната остроумна математичка анализа се покажале како круцијални за

извлекување на позначајни заклучоци. Научниот пристап бил во самиот зародиш во тоа време, па, не било доволно јасно дека броевите се важни и во биологијата. Во средината на 19-тиот век, Мендел (Gregor Mendel) (**слика 1-2**), калуѓер во манастирот Св. Томас во денешно Брно (Чешка Република, тогашна Австрија) извршил серија на мошне внимателно спроведени експерименти врз грашок. Мендел, како и Најт претходно, вештачки ги вкрстувал сортите на грашок кои имале

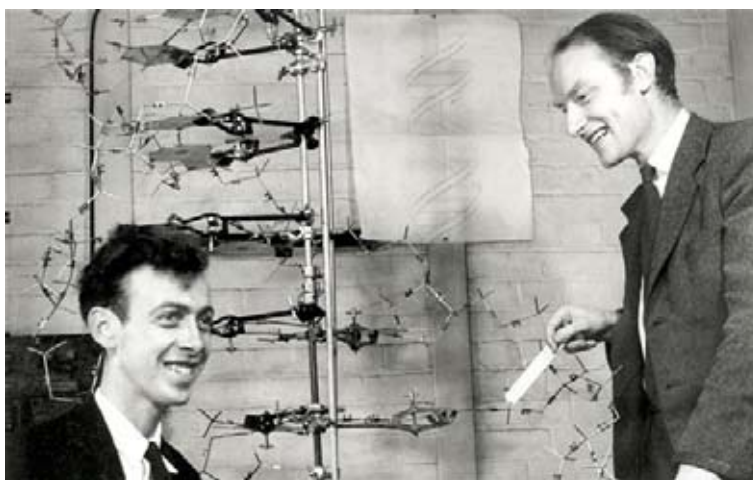


различни морфолошки карактеристики и забележувал кои и колку од единките во потомството ќе ги задржат особините од родителските единки. Но, Мендел извршил и детална математичка анализа на бројниот сооднос на единките во своите експерименти. Резултатите од истражувањата ги поднел во локалното природонаучно друштво и во 1866 година ги објавил во реномирано научно списание. Менделовите експерименти биле исклучително добро документирани, а неговата претходна едукација од областа на математиката и природните науки му помогнале да ги обработи и од тоа да изведе јасни заклучоци со што ги поставил правилата за наследување на некои својства од една генерација во следните. Но, неговите резултати биле игнорирани од тогашната научна заедница во текот на цели 34 години, по што нивното значење било конечно признаено.

Морган (Tomas Hunt Morgan) е заслужен за воведувањето на винската мушичка (*Drosophila melanogaster*) како организам-модел во генетиката. Од неговите експерименти произлегла теоријата дека гените се лоцирани на хромозомите, како и многу други важни откритија во врска со наследувањето, но, и една од првите контроверзии во однос на лимитот на тогашната генетика во расветлувањето на структурата на гените. Имено, Морган во еден есеј запишал: „Генетичарот, сам за себе, е беспомошен во натамошната анализа на тие [генетски] својства. Потребно е да се вклучи физичар, а можеби и хемичар“. Невверојатно е колку Морган навистина бил во право. По првичните експерименти на Грифит (Griffith) со бактеријата *Streptococcus pneumoniae* во 1928 година, како и подоцнежните студии на Авери (Avery) со соработниците, а потоа и на Хиршеј и Чејс (Hershey и Chase), непобитно се докажало дека DNA, а не протеините, се носители на генетските информации.

Во 1953 година, користејќи ги податоците од рендгено-кристалографските анализи извршени од страна на хемичарката Франклин (Rosalind Franklin) и нејзиниот претпоставен Вилкинс (Maurice Wilkins), младиот биолог Вотсон (Watson) и физичарот Крик (Crick) го постулирале моделот за двојната хеликална структура на DNA-молекулот, за што подоцна им е доделена Нобеловата награда (слика 1-3). Влијанието на ова откритие врз тогашната наука и јавност е толку големо, што се смета за пресвртница во биологијата, па, и филозофијата на природните науки.

Во годините што следуваат потоа, имало бурен развој во молекуларната биологија. Корнберг (Kornberg) во 1955 година ја открил и ја изолирал DNA-полимеразата, а во 1961 Мармур (Marmur) и Доти (Doty) го опишале феноменот на денатурација и ренатурација на DNA



**Слика 1-3:** Вотсон и Крик покрај својот историски модел на DNA-структурата.

веригите, по што набргу се воведени едноставните хибридизациски техники. Паралелно се развивале и електрофоретските методи, со воведувањето на полиакриламидниот гел и SDS-PAGE техниката. Со серија експерименти во 1966 година, Ниренберг (Nirenberg), Охоа (Ochoa) и Корана (Khorana), спектакуларно го разоткриле значењето на генетскиот код, за што подоцна им е доделена Нобеловата награда.

Во периодот од 1962 до 1973 година биле откриени рестрикциските ендонуклеази и DNA-лигазите, а набргу потоа и техники за нивно пречистување. Со тоа се остварени едни од најголемите достигнувања во науката воопшто - техниките на клонирање и на рекомбинантна DNA-технологија, воведени од две екипи од Универзитетот Стенфорд и од Калифорнискиот универзитет во Сан Франциско. Во 1975 година, зоологот Сатерн (Edwin Southern) го вовел методот на трансфер на DNA-фракциите од гел врз нитроцелуозна мембрана, со што хибридизациските техники добиле нова димензија. Во втората половина на седумдесеттите години од минатиот век, Сангер (Sanger), и независно од него Максам и Гилберт (Maxam и Gilbert), развиле брзи методи за DNA-секвенционирање и набргу, по експлозијата на голем број прочитани DNA-секвенци, е етаблирана првата база на генски податоци - GenBank. Во почетокот на осумдесеттите години, пошироката научна заедница била импресионирана од продуцирањето на првите трансгенични животни и растенија, во кои се експериментално вградени гени од други организми.

Во средината на осумдесеттите години, Мулис (Kary Mullis) и соработниците ја развиле полимеразната верижна реакција, која и денес останува меѓу најчесто користените техники во молекуларната биологија, благодарение на која се развиени многу други методи базирани на амплифицирана DNA. Неколку години подоцна биле конструирани бактериските вештачки хромозоми (*BAC*-ови) за клонирање на мошне долги DNA-молекули, а била пронајдена и автоматизирана флуоресцентна техника за секвенционирање на DNA.

Овие две откриија се клучни за брзото објавување на целокупните геномски секвенци од повеќе организми во наредните неколку години, со што започнува ерата на геномиката. Во 2001 година, меѓународен конзорциум и фирмата Целера (Celera) водена од Вентер (Craig Venter), истовремено ги објавија резултатите од два, речиси независни, проекта за секвенционирање на хуманиот геном. Со развивањето на реверзно-транскриптазната полимеразна верижна реакција, DNA-матриците и подоцна DNA-микрочиповите, се овозможува истовремено анализирање на експресијата на гените од илјадници примероци. Етаблирана е нова научна дисциплина која го споредува експресиониот профил на клетките и на ткивата - транскриптомика.

Развојот на протеинската хемија во последниве неколку години е насочен кон структурни анализи, какви што се: нуклеарна магнетна резонанца (NMR), масената спектрометрија, рендгенската кристалографија, аналитичките и препаративните хроматографски техники, како и капиларната електрофореза. Од молекуларно-биолошки аспект, проучувањето на протеините се одвива на два фронта: анализа и пречистување на експримираните протеини (што е особено важно во биотехнологијата), како и анализа на т.н. протеом, односно збирот на сите протеини присутни во определена популација на клетки или во целиот организам. За таа цел, во последно време, се користат флуоресцентни имуноблотинг методи кои се во формат на матрици, слично како кај сродната DNA-технологија, и компјутерска анализа на податоците, а новата дисциплина е наречена протеомика.



Главниот фокус на истражувањата во областа на молекуларната биологија и генетика во последниве години се неколку пошироки области. Една од нив е насочена кон расветлување на регулацијата на генската експресија кај еукариотските организми и сложената мрежа на меѓусебно поврзани гени и генски продукти кои учествуваат во регулацијата. Проучувањето на генетските аспекти и молекуларната биологија на онтогенезата (развојот на организмите) е исто така мошне актуелна област, која поради својата комплексност, се наоѓа во релативно раната фаза напредување. Меѓу најактуелните и најбројни истражувања се тие кои ги проучуваат молекуларните аспекти на канцерот, со акцент врз можностите за генска терапија. Практичната апликација на овие сознанија во применетите науки (пред сè во медицината), како и на тие во фармацијата и биотехнологијата, воопшто, се главна индустриска насока на развој на генетскиот инженеринг.



# ХЕМИСКИ СОСТАВ НА ЖИВИТЕ ОРГАНИЗМИ

## Глава 2

Покрај екстремната комплексност и разноликост на организмите, сите нивни клетки содржат определени молекули и јони кои се неопходни за извршување на животните функции. Постојат пресметки според кои во една клетка од вишите организми просечно има по околу 10 000 различни видови молекули кои се користат за трансформирање на материите и енергијата (метаболизмот), за специфичните функции (лачењето на хормоните или за мускулната контракција, на пример), за да можат да реагираат на надворешната средина (кон светлосните дразби, на пример), како и за размножување на самата клетка или на организмот. Животот на клетките зависи од реактивноста, стабилноста и интеракциите на сите нејзини хемиски конститuentи, почнувајќи од молекулите на водата, неорганските јони и малите органски молекули, па, сè до макромолекулите и големите молекуларни комплекси.

Водата е најзастапениот молекул во сите биолошки системи: најголем број од живите клетки содржат 70-80% вода, а животот, каков што го знаеме, не може да постои без овој молекул. Покрај водата, другите неоргански јони:  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  и многу други, како и малите органски молекули: аминокиселините, аденозин трифосфат (АТР), нуклеотидите, шеќерите и липидите, на пример, се застапени со просечно 7% од масата на живата материја. Преостанатиот дел се однесува на биолошките макромолекули: нуклеинските киселини, протеините и макромолекуларните агрегати и комплекси.

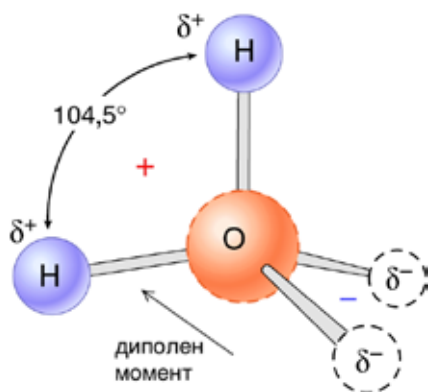
### 2.1 Вода

Водата е најважниот растворувач во кој се одвиваат хемиските реакции во живите организми. Покрај тоа, таа е реактант и продукт кај многуте метаболични процеси. Иако е едноставен молекул, некои негови физичко-хемиски својства имаат критична важност од аспект на биолошките процеси во живите клетки.

Едно од тие својства е што молекулите на водата имаат релативно слаба, но, важна, склоност кон јонизација во хидроксиден анион ( $\text{OH}^-$ ) и во водороден јон-про-

тон ( $H^+$ ). Иако просечно само по една од 500 милиони молекули на вода е дисоцирана во јони во единица време, ваквата особина овозможува висока реактивност на водата и е извонредно важна за нејзината интеракција со биолошки значајните молекули. Начинот на кој водата реагира со биомолекулите кои се растворени во неа има силно влијание врз нивната структура.

Ковалентните врски меѓу кислородниот атом и двата водородни атома во молекулот на водата содржат парови електрони кои не се распределени рамномерно, туку имаат тенденција да се поместени поблиску до кислородниот атом, кој е повеќе електронегативен. Оттаму произлегува дека водата е **поларен** молекул поради тоа што неговиот електростатски полнеж е распределен на два пола (т.н. **дипол**). Едниот пол е електростатски повеќе позитивен и се означува како  $\delta^+$  (се чита: делта позитивен), додека спротивниот пол е негативен, за што се користи симболот  $\delta^-$  (делта негативен). Диполниот момент ја определува распределбата на полнежот во молекулот (слика 2-1).



**Слика 2-1:** Дипол на молекулот на вода. Прикажана е асиметричната распределба на електроните што создава диполен момент. Двата електронски пара од кислородниот атом (исцртани со испрекинати кругови) се лесно реактивни.

Вакви локални нерамномерни распределби на полнежите кои се резултат на поларноста на ковалентните врски се јавуваат и кај големите макромолекули, создавајќи поларни региони кои значително влијаат врз вкупната способност за интеракција на макромолекулот со други молекули. Јаглехидратите, на пример, се **хидрофилни** соединенија кои лесно се раствораат во вода. Наспроти нив, некои липидни молекули каков што е триацилглицеролот, се **хидрофобни** соединенија кои не се раствораат во вода и ја одбегнуваат истата. Фосфолипидите, пак, се нарекуваат **амфипатични** поради тоа што содржат и хидрофилни (фосфатните групи) и хидрофобни региони (липидните региони од молекулот). Тоа има клучно значење за градбата и функцијата на мембранските системи (клеточната мембрана и сите други мембрански органели) во клетките.

## 2.2 Неоргански дел

Од околу 92 природни елементи на планетава, во живите организми најзастапени елементи се: водородот, јаглеродот, кислородот, азотот, фосфорот и сулфурот. Соединенијата градени од овие **шест елементи** сочинуваат околу 98% од масата на речиси сите прокариотски или еукариотски клетки. Покрај овие елементи, со ма-

сен удел повисок од 0,01% од клеточната маса се наоѓаат и калциумот, натриумот, магнезиумот, калиумот и хлорот. Покрај набројаните 11 елементи, во живите организми се наоѓаат и петнаесетина елементи застапени само во траги, но, и покрај ниската концентрација, некои од нив се екстремно важни за правилните ензимски активности, за транспортните функции или за метаболичните и другите процеси. Такви елементи се: железото, манганот, бакарот, молибденот, цинкот, јодот, селенот и др. Сите наброени елементи се застапени во форма на јони, на комплексни соединенија, како и на и нивните соли.

### 2.3 Органски соединенија

Органските молекули кај живите организми се состојат од соединенија градени од јаглеродни атоми кои се хемиски врзани со други атоми на јаглерод и со водород, кислород, азот, сулфур и други елементи. Јаглеродниот атом е по правило четиривалентен во органските соединенија кои учествуваат во клеточната градба или во метаболизмот. Способноста на јаглеродниот атом да формира ковалентни врски со други атоми веројатно била клучната особина поради која токму соединенијата на јаглеродот биле селектирани во текот на еволуцијата да ја градат практично целокупната молекуларна машинерија од која е составен живиот свет. Ниту еден друг хемиски елемент нема таква способност за создавање на соединенија со толку голема варијабилност во големината, формата, сложеноста и со толку различни функционални групи. Различните органски молекули од кои што се градени биолошките системи имаат фундаментално различен хемиски состав, големина, форма, реактивност, растворливост и други физичко-хемиски карактеристики кои влијаат врз нивната улога во живиот организам.

Покрај протеините и нуклеинските киселини, во цитосолот на секоја клетка се наоѓаат растворени стотици т.н. **мали органски молекули** (кои имаат молекулска маса помала од околу  $500 \text{ g mol}^{-1}$ ) какви што се метаболитите (АТР, уреа, и други соединенија кои учествуваат во метаболизмот во речиси сите клетки), едноставните јаглехидрати (шеќери), едноставните липиди (масти), нуклеотидите, аминокиселините, витамините и други соединенија. Овие мали органски молекули се наоѓаат кај широк опсег на различни организми, што упатува на силната еволуциска конзервираност на метаболичните и другите процеси во кои учествуваат и на нивното заедничко еволуциско потекло. Некои, пак, мали органски молекули се специфични само за определени клеточни типови или организми. Некои виши растенија, на пример, создаваат т.н. **секундарни метаболити** какви што се мирисните соединенија, пигментите, алкалоидите (морфиум), никотинот и други, и имаат специфично значење за соодветниот растителен организам. Збирот на сите мали органски соединенија во некоја клетка или во популација клетки се означува како **метаболом**, по аналогија на термините геном, протеом итн.

Спротивно на распространетото погрешно мислење, малите неоргански и органски молекули не се помалку важни за структурата и функцијата на клетката отколку макромолекуларните компоненти. Така, на пример, хемиската важност (во контекст на биолошката функција) на протонот ( $\text{H}^+$ ) со молекулска маса од само  $1 \text{ g mol}^{-1}$ , не е помала од таа на некој диновски DNA-молекул со молекулска маса од  $8,6 \times 10^{10} \text{ g mol}^{-1}$ , каква што е едноверижната DNA од хромозомот 1 кај луѓето.

## 2.4 Макромолекулите се клучни компоненти за молекуларната биологија и генетиката

И покрај енормната важност на сите хемиски конституенти, предмет на најголем интерес во молекуларната биологија се само две класи на биолошки макромолекули: нуклеинските киселини (DNA и RNA) и протеините. Од хемиски аспект, биолошките макромолекули се полимери на основните мономерни единици: полипептидите се полимери на аминокиселините, а нуклеинските киселини на нуклеотидите. Полисахаридите се полимери на едноставните јагленхидрати. Сите наведени мономерни имаат молекулска маса помала од  $500 \text{ g mol}^{-1}$ . Бројот на субединици во полимерите може значително да варира во опсег од само неколку, па, сè до повеќе милиони мономерни. Кога бројот на субединици во некој молекул е помал (обично од 20 или од 50, во зависност од литературата), често се користи префиксот **олиго-**, а кога е над тој број префиксот **поли-** (на пример: олигопептид, наместо полипептид).

**Табела 2-1: Номенклатура на мултимерните молекули според бројот на субединиците**

број на субединици	префикс	број на субединици	префикс
1	моно-	11	ендека-
2	ди-	12	додека-
3	три-	13	тридека-
4	тетра-	14	тетрадека-
5	пента-	15	пентадека-
6	хекса-	16	хексадека-
7	хепта-	17	хептадека-
8	окта-	18	октадека-
9	нона-	19	нонадека-
10	дека-	20	еикоси-

За попрецизно дефинирање на бројот на субединици (помал од 20) се користат старогрчките префикси кои се вообичаени во природните науки (**табела 2-1**). Кога се присутни повеќе од 20 субединици, како префикс се употребува соодветниот број и наставката: -мер, -пептид, -нуклеотид итн. На пример: 21-мер, 34-пептид или 61-нуклеотид.

Важно е што нековалентните врски и интеракции меѓу макромолекулите можат да учествуваат во градбата на следното, повисоко, ниво на структурна организација во живите клетки: создавањето на супрамолекуларните структури (мулти-макромолекуларни комплекси), какви што се рибозомите, хромозомите и цитоскелетните елементи.

## 2.5 Кус осврт кон хемиските врски

Од атомите се создаваат молекули преку нивно меѓусебно привлекување со хемиски врски и со други видови хемиски интеракции. Реактивноста на атомите е

главно определена со бројот и распределбата на електроните во орбиталите, а не со неговите протони или неутрони.

Постојат неколку вида на врски и интеракции кои се разликуваат по својата природа и силата на привлекувањето. Доколку не е поинаку наведено во натамошниот текст, се подразбира дека соединенијата и молекулите се градени од атоми поврзани со **ковалентни врски**, додека меѓусебното врзување на молекулите (протеин со друг протеин, или протеин со нуклеинска киселина, на пример) се остварува со **нековалентни**, односно со енергетски слаби хемиски врски какви што се: јонската врска, водородните, хидрофобните и ван дер Валсовите сили и интеракции.

## Ковалентни врски

Ковалентните врски со кои атомите градат молекули се образуваат со заеднички електронски парови меѓу атомите што се сврзуваат. Делењето на еден пар електрони се нарекува единечна врска, а на повеќе електронски парови: двојна, тројна врска итн. Ковалентните врски имаат највисока енергија и се 10 до 100 пати појаки отколку нековалентните врски и интеракции меѓу атомите. Од тие причини, потребна е релативно висока енергија за создавање, но, и за раскинување на ковалентните врски, што е од големо значење за разбирање на многу процеси во молекуларната биологија, особено тие кои се однесуваат на макромолекуларните соединенија. Поради својата висока стабилност, ковалентните хемиски врски во физиолошки услови, не можат спонтано да се раскинат. Пример за вакви врски се пептидните кои меѓусебно ги поврзуваат аминокиселините во полипептидните вериги, додека нуклеотидите се поврзани со ковалентни фосфодиестерски врски градејќи полинуклеотиди (DNA и RNA).

Во молекуларната биологија, од посебна важност е способноста на јаглеродниот атом да формира четири единечни ковалентни врски во тетраедарска конфигурација (форма на четворострана пирамида) со агли од  $109,5^\circ$  меѓу секоја соседна врска и со должина од по  $0,154 \text{ nm}$ . Единечните врски меѓу јаглеродните и други атоми дозволуваат слободна ротација, што не е случај кај двојните врски меѓу два јаглеродни атоми кои се поригидни, покуси ( $0,134 \text{ nm}$ ) и не дозволуваат речиси никаква ротација околу својата оска.

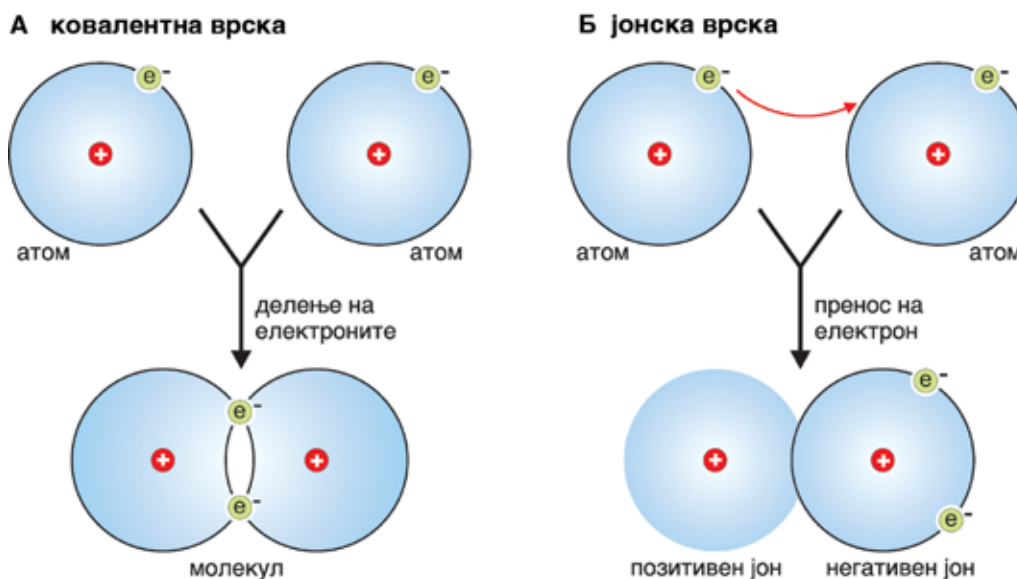
## Нековалентни врски и слаби интеракции

Иако ковалентните врски се хемиски најсилни привлечни врски кои ги поврзуваат атомите во еден единствен молекул, послабите нековалентни врски имаат енормно влијание врз формата, стабилноста, реактивноста и физичко-хемиските особини на биолошките молекули во живите клетки. Таквите сили, кои можат да бидат атрактивни (привлечни) или репулзивни (одбивни), се должат на интеракциите во самиот молекул, како и меѓу него и околните молекули на водата.

Покрај тоа, нековалентните врски се основа и за некои од најважните интеракции меѓу макромолекулите (меѓу две вериги на нуклеински киселини, меѓу протеинските молекули со нуклеински киселини, како и меѓу два или повеќе протеина).

**Јонската врска** е привлечна електростатска сила меѓу јоните со спротивен полнеж (електропозитивните катјони и електронегативните анијони) кај јонските соединенија или меѓу јонизираните функционални групи од макромолекулите.

Таквите врски не се строго специфични за јоните во молекулот, туку се создаваат меѓу кои било јони со спротивен полнеж, доколку растојанието меѓу нив е оптимално. Јонските врски се посилни од водородните затоа што се формираат меѓу целобројни полнежи (+1 и -1), наспроти делумните електростатски полнежи ( $\delta^+$  и  $\delta^-$ ) кај водородните врски. Разликите меѓу ковалентната и јонската врска се шематски прикажани на **сликата 2-2**.



**Слика 2-2:** Споредба на ковалентната и јонската врска. А: кај ковалентната врска (лево) се создаваат електронски двојки (парови). Б: кај јонската (електростатска) врска (десно) постои само пренос на електрон(и) од едниот во другиот атом, со што се создаваат два јона со спротивен електростатски полнеж.

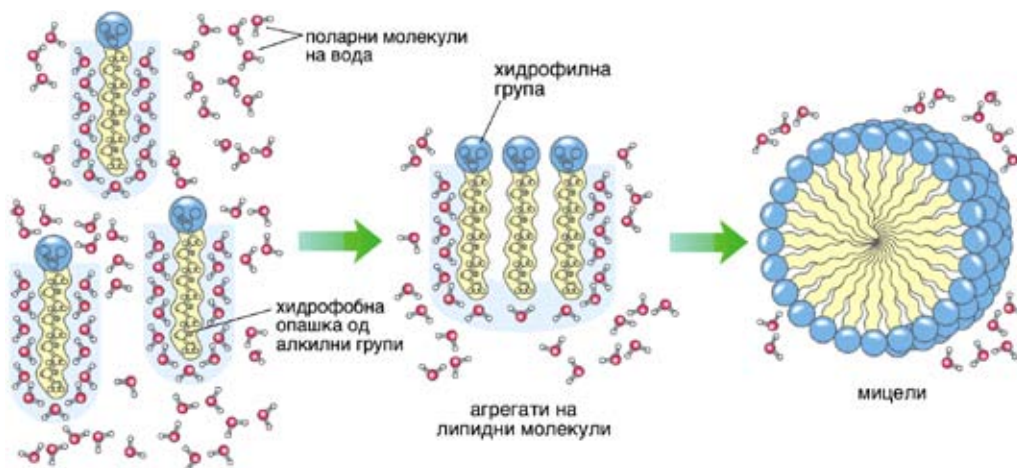
**Водородните врски** имаат исклучителна важност за структурата и функцијата на биолошките макромолекули. Кај овој тип на нековалентни врски, водородниот атом од -OH, -NH или -SH групите (наречени **донори** во водородната врска) реагираат со слободните електрони од атомите означени како **акцептори** (атоми на кислород, азот или сулфур, на пример).

Иако енергијата на водородната врска е далеку помала отколку кај ковалентната, бројот на водородни врски кои можат да се воспостават меѓу две макромолекули може да биде екстремно голем, па, вкупната енергија на врзување може да биде и пропорционално висока. Како што понатаму е објаснето, двете комплементарни вериги од DNA-хеликсот се поврзани со меѓусебни водородни врски.

**Хидрофобните интеракции** се должат на склоноста на молекулите на водата да вршат ексклузија (исклучување) на неполарните функционални групи или на це-



лите неполарни молекули, какви што се тие на липидите. Хидрофобните молекули, функционалните групи или регионите од поголемите молекули, се ориентираат едни кон други и се групираат меѓусебно со што го минимизираат контактот со водните или другите поларни молекули. Пример за тоа е дисперзијата на липидните молекули (фосфолипиди) во воден раствор, а шематски е прикажана на **сликата 2-3**.

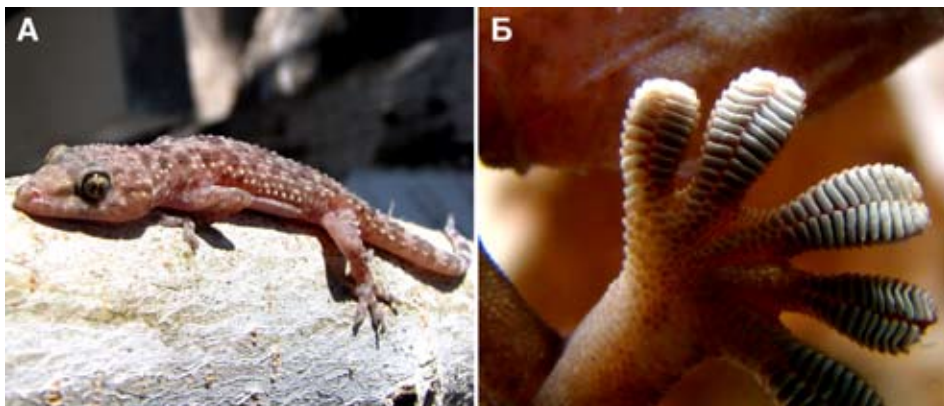


**Слика 2-3:** Здружување на амфипатичните липидни молекули во водна средина. Мицелите се формираат и одржуваат со дејство на хидрофобните интеракции меѓу хидрофобните региони од амфипатичните липидни молекули.

Ваквата дисперзија на липидите во воден раствор предизвикува секој липиден молекул да биде опкружен со голем број молекули на вода кои формираат молекуларен „кафез“ околу неа. На овој начин липидните молекули се групираат со што го намалуваат на минимум својот контакт со молекулите на водата. Хидрофобните опашки од фосфолипидите спонтано се организираат меѓусебно во **мицели**, стабилни структури составени од илјадници молекули во кои хидрофилните групи се ориентирани кон водната средина. Силите кои ги одржуваат неполарните, хидрофобни региони од молекулите заедно се всушност хидрофобните интеракции.

**ван дер Валсовите сили** (или интеракции) се најслаби нековалентни интеракции и се создаваат релативно неспецифично меѓу неполарните молекули кога истите се на доволно мали растојанија. Наречени се така според холандскиот научник ван дер Валс (Johannes Diderik van der Waals) и се должат на создавањето на привремените диполи поради брзите движења на електроните во електронските облаци кај сите неутрални атоми, односно атомите кои немаат електростатски полнеж. Утврдено е дека ван дер Валсовите сили делуваат на многу мали, но, оптимални растојанија меѓу функционалните групи или атомите (0,2 до 0,4 nm). Меѓутоа, преголемото доближување на двата атома или функционални групи доведува до брзо оддалечување поради одбивањето на нивните електронски облаци. Јачината на ван дер Валсовите интеракции е толку слаба, што е само малку повисока од термалната енергија при собна температура. Иако се слаби, овие сили можат значително да учествуваат во

структурата и функцијата на биолошките молекули доколку меѓу нив истовремено постојат поголем број вакви интеракции. Неодамна е утврдено дека создавањето на огромен број на поединечни ван дер Валсови интеракции може да биде толку силно што овозможува движење на гуштерчето гефон по совршено рамни површини, какво што е стаклото, на пример (слика 2-4).



**Слика 2-4:** ван дер Валсовите сили не се одвиваат само на молекуларно ниво, туку и можат да можат да предизвикаат ефекти кои се видливи и со голо око. А: фотографија на медитеранскиот гефон (*Hemidactylus turcicus*). Б: стапало на гефонот фотографирано додека се движи по стаклена површина. Се смета дека токму ван дер Валсовите интеракции меѓу фините сети (влакненца) од ножните перничича и стаклото овозможуваат движење на гефонот по мазни површини. Сликите се превземени и модифицирани од интернет-колекцијата Wikimedia Commons која подлежи на слободна лиценца.

Споредбата на структурите и на основните карактеристики на хемиските врски се прикажани во **табелата 2-2**.

Како резултат на тоа што структурата и функцијата на биолошките молекули е во голема мерка определена со слабите, нековалентни врски, макромолекулите се функционални само во тесен опсег на услови на локалната средина какви што се: температурата, јонската јачина, концентрацијата на водородните јони (pH) итн.

Вон оптималните услови, кои се специфични за секој макромолекул засебно, и при кои истиот е во **нативна** состојба, доаѓа до раскинување на слабите врски и појава на **денатурација** при што целосно или делумно се губат биолошките функции на молекулот. Од тие причини клетките не можат да ги толерираат реакциите при кои одеднаш се ослободува големо количество енергија.

Денатурацијата на биолошките макромолекули е придружена и со промена на некои физичко-хемиски својства, што има големо практично значење при нивното проучување во *in vitro* услови (во епрувета, вон жива клетка) со определени лабораториски инструменти.

Табела 2-2: Основни карактеристики на хемиските врски


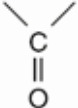

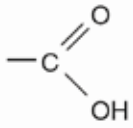
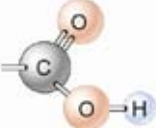
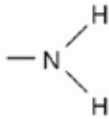
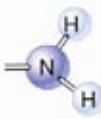

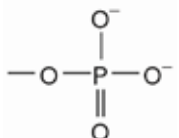

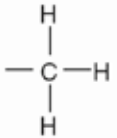
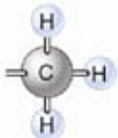
назив	принцип	пример на структура	енергија на врската* (kJ/mol)
ковалентна врска	размена на електронски парови		377 **
јонска (електростатска) врска	привлекување на спротивните електростатски полнежи		12,6
водородна врска	размена на водородни атоми		4,2
хидрофобна интеракција	интеракција на неполарните супстанции во присуство на вода и други поларни соединенија		4,2
ван дер Валсови интеракции (сили)	интеракција меѓу електроните на неполарните супстанции		0,42

\* енергијата на врската се дефинира како количество на енергија кое, под физиолошки услови, е неопходно за да се раздвојат два атоми кои се меѓусебно поврзани со соодветната сила или се во интеракција. Прикажани се просечните вредности кај биолошките системи.

\*\* прикажани се вредности за единечна ковалентна врска, додека двојната врска, каква што е C=O, на пример, поседува уште повисока енергија.

## 2.6 Функционални групи

Најголемиот број биолошки релевантни молекули се деривати на јагледородните, при што некои од водородните атоми се заменети со различни атомски групи изградени од други атоми и кои се нарекуваат **функционални групи**. Токму од типот, бројот и меѓусебниот сооднос на функционалните групи најмногу зависат физичко-хемиските карактеристики на целиот молекул. Секоја функционална група има специфични хемиски својства и склоности кон реакции со други функционални групи и соединенија. Некои од функционалните групи кои се врзани со јагледородниот „рбет“ на органските молекули се прикажани на **табелата 2-3**. Во биомолекулите, ковалентно врзаните атоми на јаглерод можат да создаваат линеарни вериги, разгранети синџири или циклични структури.

Табела 2-3: Примарни функционални хемиски групи кои се наоѓаат во органските соединенија			
функционална група	структурна формула	структурен модел	пример за присуство
хидроксилна	$\text{—OH}$		јаглехидрати
карбонилна			пептидни врски
карбоксилна			аминокиселини
амино-			нуклеотиди
сулфхидрилна	$\text{—S—H}$		протеини
фосфатна			нуклеински киселини, нуклеотиди, фосфолипиди
метилна			нуклеотиди

## 2.7 Тридимензионална структура: молекуларна конфигурација и конформација

Иако комбинациите на функционалните групи и на ковалентните врски се клучни за вкупните физичко-хемиски карактеристики на некој биолошки молекул, важен е и просторниот (тридимензионален) распоред на атомите, т.е. нивната стереохемиска конфигурација. Ваквиот тридимензионален распоред на комплексните биолошки макромолекули е определен со два феномена: конфигурација и конформација. Имено, **молекуларната конфигурација** е трајниот просторен распоред (тридимензионална структура) на атомите и функционалните групи во некој молекул. Таа е ограничена или со присуството на двојни ковалентни врски (кои не можат да ротираат околу својата оска) или на стереоизомерите (или хирални центри), какви

што се L- и D-изомерите на аминокиселините во некој протеин, на пример. Конфигурацијата на некој молекул може да се промени само со прекинување на една или повеќе е ковалентни врски меѓу нејзините атоми. Од друга страна, **молекуларната конформација** се однесува на просторниот распоред на атомите и на функционалните групи во еден молекул кој може да се менува без раскинување на ковалентните врски, туку само со ротација на единечните ковалентни врски. Еден ист молекул може да има повеќе конформациски варијанти наречени **стереоизомери**. Оттаму, произлегува дека еден молекул има само една конфигурација, но, доколку е возможна ротација на еден или повеќе оски на единечните ковалентни врски, може да поседува две или повеќе конформациски изомери.

Нековалентните врски кои постојат меѓу функционалните групи и други атоми во самиот макромолекул се нарекуваат **интрамолекуларни врски** или **интеракции** и обично имаат важна улога во стабилизацијата на конформацијата на молекулот. Наспроти тоа, нековалентните врски и интеракции меѓу атомите и функционалните групи меѓу две молекули се означуваат како **интермолекуларни врски** или **молекуларни интеракции**.

## 2.8 Макромолекуларни интеракции

Молекулите и јоните кои се наоѓаат во клетките и ткивните течности, постојано се движат хаотично (Брауново движење) и притоа меѓусебно постојано се судираат. Колку е поголема концентрацијата на определен молекул или јон, толку е поголема и веројатноста дека истите ќе стапат во интеракција со некој друг јон или молекул. При физиолошки услови, нивните меѓусебни интеракции се преслаби и краткотрајни, па, не учествуваат во стабилното формирање на комплекси меѓу макромолекулите. Сепак, релативно стабилни комплекси можат да се формираат кога постои позначителна **молекуларна комплементарност** (понекогаш означена и како структурна или стереоспецифична комплементарност) меѓу две протеински молекули, или меѓу протеин и дел од молекулот на нуклеинска киселина. Тоа се случува кога нивните површински атомски групи и остатоци (резидуи), полнежи или други физички својства, меѓусебно се просторно комплементарни слично на клучот и бравата.

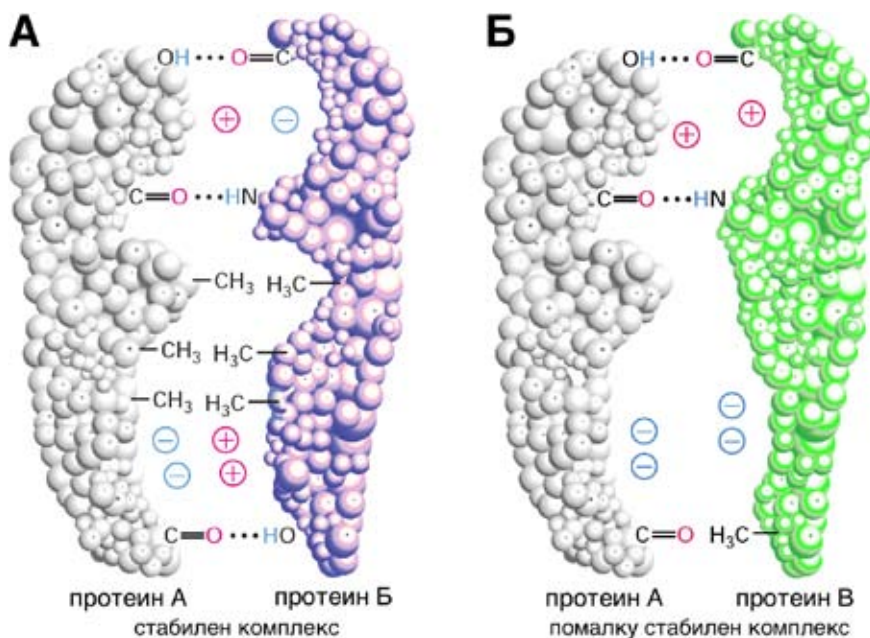
Молекуларната комплементарност во однос на формата, полнежите, поларноста и хидрофобноста, а која постои меѓу тридимензионалната површина од два протеина, овозможува создавање на поголем број слаби хемиски врски и интеракции, кои збирно предизвикуваат релативно силно поврзување (**слика 2-5, А**). Намалувањето на комплементарноста доведува до значително помал број на хемиски интеракции и далеку послабо поврзување (**слика 2-5, Б**).

Слични хемиски интеракции можат да резултираат и со формирање на т.н. **мултимолекуларни комплекси** со повеќе од две молекули, како што е случај кај мускулните влакна, екстрацелуларниот матрикс на сврзното ткиво и кај многу други клеточни и ткивни структури.

Во зависност од бројот и од вкупната јачина на нековалентните врски и интеракции меѓу две молекули, како и од нивната околина, меѓусебното врзување може да биде посилено или послабо, и оттаму стабилноста на комплексот да биде подолго-



трајна или пократкотрајна. Колку е поголема нивната меѓусебна молекуларна комплементарност, толку е поголем и **афинитетот** на двете молекули една кон друга.



**Слика 2-5:** Молекуларна комплементарност меѓу две протеински молекули. А: комплекс меѓу две протеински молекули посредуван со вкупно 9 врски и интеракции. Б: комплекс меѓу две протеински молекули посредуван со само 3 врски и интеракции.

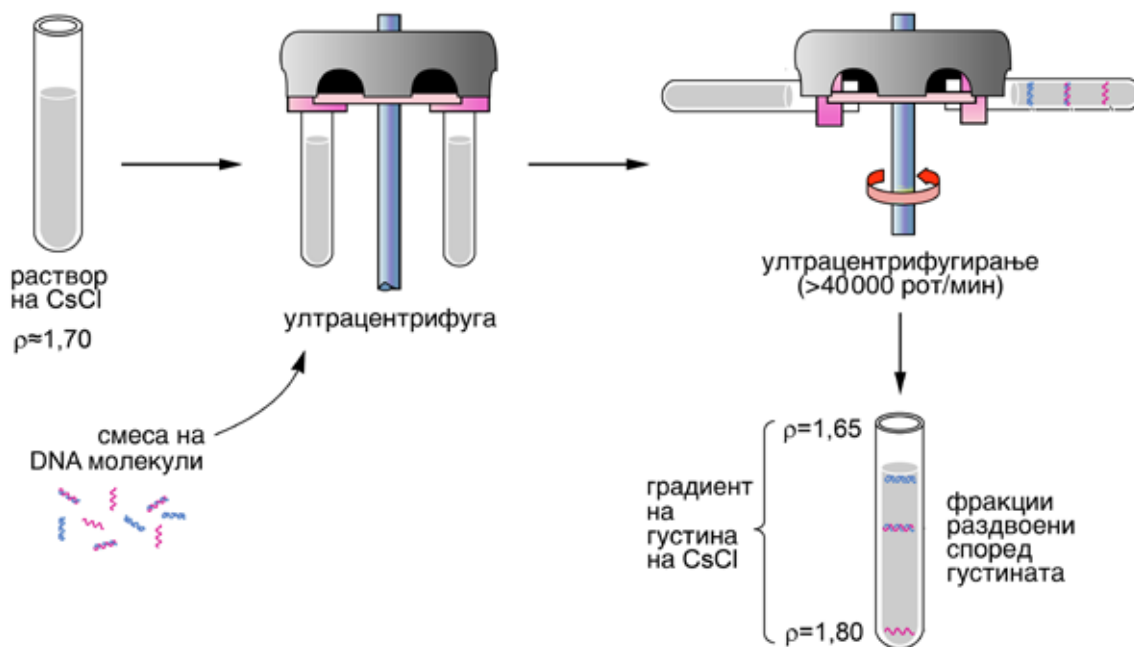
Со сличен принцип се одвиваат и молекуларните интеракции меѓу регулаторните протеини и специфичните секвенци во DNA-молекулите. Имено, редоследот на нуклеотидните бази по должината на регионот со кој протеинскиот молекул стапува во интеракција, директно ја определува молекуларната комплементарност, а со тоа и специфичноста на меѓусебната интеракција. Обично таквите интеракции се исклучително специфични за точно определената DNA-секвенца, при врзувањето на некој транскрипциски фактор, на пример, со што се создаваат услови за транскрипција, а со тоа и експресија на некој ген.

Бројот на комбинации на нуклеотидни секвенци може да биде енормен и во некој кус сегмент од DNA-веригите, а со тоа и да биде доволен за определување на комплементарноста со специфичниот протеин кој треба да се врзе со тој сегмент. Транскрипциските фактори и многу регулаторни протеини кои се врзуваат со специфични секвенци во DNA-молекулите, најчесто препознаваат сегменти со должина од по само 6-12 базни пара. Едноставните пресметки можат да го илустрираат тоа на следниов начин: во сегментот од DNA-молекулот кој е долг само 10 базни пара има вкупно  $4^{10}$  (1048576) можни комбинации, поради тоа што на секоја од десетте позиции може да биде еден од четирите нуклеотиди (A, G, T или C). Имајќи ја во предвид големината на човековиот геном, кој е со должина од  $3,2 \times 10^9$  базни парови,

постои статистичка веројатност кој било специфичен сегмент долг 10 базни пара да се повтори само неколку пати во целиот геном, а теоретски само еднаш во близина на некој функционален ген. Со тоа се обезбедува строго специфична интеракција на таквите протеини кои се врзуваат со специфичните DNA-региони.

## 2.9 Ултрацентрифугирање на биолошките макромолекули

Во молекуларната биологија, вообичаено е големината на макромолекулите и структури (какви што се рибозомите, на пример) да се изразуваат во **Сведбергови единици**, означени со кратенката: *S*. Овие единици се мерка за брзината на таложење при ултрацентрифугирање во градиент на густина (најчесто на цезиум хлорид или на сахароза). Името е дадено во чест на физичкиот хемичар Сведберг (Theodor Svedberg), кој прв ја вовел техниката на ултрацентрифугирање во 1920-тите години. Раздвојувањето во градиент на густина се заснова на достигнување на екстремно голем број вртежи во ултрацентрифуга, при што молекулите на цезиум хлорид формираат т.н. градиент на густина, каде растворот има најголема густина на дното од епруветата, а густината постепено (градиентно) опаѓа кон површината на течноста. При ултрацентрифугирање во таков градиент, испитуваните макромолекули или супклеточни структури се потиснуваат под дејство на центрифугалната сила кон дното на епруветата, сè додека не достигнат до нивото каде нивната густина е еднаква на таа на цезиум хлоридот (слика 2-6).



**Слика 2-6:** Раздвојување на макромолекулите со ултрацентрифугирање според густината во градиент на цезиум хлорид (CsCl).

Врз брзината на таложење не влијае само тежината на честичките, туку и нивната форма и димензии. Воопштено, покрупните и потешки макромолекули или структури имаат повисоки  $S$ -вредности во однос на поситните честички со помала тежина. Но, големо влијае има и површината на честичките, па, структурите составени од поголем број субединици имаат пониска  $S$ -вредност отколку збирот на поединечните вредности на секој молекул. Тоа може да се спореди со паѓањето на падобранецот кое е забавено поради триењето на платното од воздухот кое го забавува падот, иако масата на предметот е непроменета и при затворен и при отворен падобран.



# КУС ОСВРТ КОН КЛЕТОЧНАТА БИОЛОГИЈА

## Глава 3

**И**ако тешко е да се даде прецизна и универзална дефиниција за животот на Земјата, а една од постојните е дека животот претставува организирана генетска единица способна за метаболизам, размножување и еволуција. Општо прифатено е дека животот се однесува на ентитетите кои растат и се репродуцираат во барем еден дел од својот животен век. Сепак, постојат отстапувања од ваквото дефинирање: на пример, кај индивидуите кои не се размножуваат во текот на целиот свој живот поради тоа што се стерилни (мулата е такво животно) или свесно немаат потомство (кај луѓето). Важно е да се има предвид дека потомците (мутации) на организмите не се нивни идентични копии, туку постепено акумулираат промени во генетските информации, со што и еволуираат организмите.

Концепциски, животот каков што го познаваме се темели на сите или на повеќето од следниве основни компоненти:

- **генетски информации** - чувани и посредувани од страна на нуклеинските киселини. Тие ги содржат **гените** кои се единици на наследувањето и според кои се развива, се размножува и се одржува клетката или клетките на организмот. Збирот на гени во еден организам се нарекува **геном**;
- **организација** - кај едноклеточните организми се однесува само на клеточната градба и состав, додека кај повеќеклеточните организми организацијата е мошне сложена и е изградена од клетки и меѓуклеточни супстанции организирани во ткива и органи. Најсложена градба има кај т.н. виши животни и растенија. Очигледно е дека основната клеточна организација е слична, но, надворешниот изглед, форма, големина и другите фенотипски карактеристики, силно варираат меѓу видовите;
- **производство на енергија и биосинтеза** - кое е неопходно за операционализирање на генетските информации, како и за одржување, раст и репродукција на организмот. **Метаболизмот**, т.е. збирот на меѓусебно поврзани биохемиски и физиолошки процеси низ кои се одвива разградувањето на хранливите материји кои организмот ги прима од надворешната средина и од кои произведува

енергија. **Биосинтезата** опфаќа низа на комплексни процеси на производство на соединенија кои се неопходни за организмот. Макромолекулите, какви што се протеините, на пример, се синтетизираат во клеточните органели рибозоми;

- **хомеостаза** - одржување на внатрешната организација и состав на клетката или на целиот организам динамички варираат, но, се константни во определен опсег;
- **раст** - во поширока смисла подразбира не само растење на новата клетка или на повеќеклеточниот организам, туку и поголема стапка на синтеза отколку на разградување на животни важните соединенија и на нивните продукти;
- **репродукција** - одржувањето на видот е обезбедено преку размножувањето. Кај едноклеточните организми тоа подразбира проста, а кај некои и вистинска, митотска делба на клетката, додека кај повеќеклеточните за таа цел се задолжени специјализирани полови клетки. Кај повеќето виши организми, размножувањето е сексуално, односно се одвива со оплодување на женската полова клетка со машка. Кај прокариотите и кај некои еукариотски организми, особено кај растенијата а поретко и кај некои животни, размножувањето е бесполово (асексуално);
- **адаптација** - способност на организмот да се прилагоди на измените во надворешната средина. Оваа особина е фундаментална за еволуцијата на биолошките видови и е директно определена со генетските информации.

### 3.1 Клеточна градба на организмите

Основна и заедничка особина на сите живи организми е дека, без исклучок, сите се градени од клетки. Оттаму, уште во 1830-тите години, Шлајден и Шван (Matthias Jakob Schleiden и Theodor Schwann) заклучиле дека клетките се основни структурни и функционални единици на животот. Некои од организмите се микроскопски мали и се едноклеточни, а други се изградени од голем број клетки кои се здружени во функционална целина со различен изглед, димензии, форма и структура.

Во биологијата постои тесна поврзаност меѓу структурата и функцијата, при што компонентите на живите системи се организирани во хиерархиска смисла: секое ниво на организација е покомплексно од претходното. Спојувањето на одделните составни делови во клетката или во целиот организам создава многу посложени и далеку пофункционални структури отколку што се тие самите. Со секое повисоко хиерархиско ниво на структурна и функционална организација се создаваат и нови особини и можности за клетката или за целиот организам. Ваквиот концепт може да се илустрира и со примерот на едноставните хемиски соединенија, каков што е натриум хлоридот. Имено, молекулот на готварската сол е составена од еден атом на отровниот гас хлор и од еден атом на мошне реактивниот метал натриум. Сепак, споени во молекулот на натриум хлорид, тие не се ниту отровни, ниту, пак, ги поседуваат препознатливите својства на одделните елементи од кои што е граден молекулот. Оттаму произлегува и концептот кој се однесува и на живиот свет: особините на комплексните системи е тешко да се предвидат само според познатите особини на составните делови. Токму затоа и редукционистичкиот пристап има големи ограничувања во експерименталните науки, каква што е биологијата.

### 3.2 Класификација на биолошките организми

Организмите можат да се класифицираат на повеќе начини. Од биохемиски аспект, според користење на изворот на енергија, организмите можат да се поделат на фототрофи (кои ја користат светлината) или хемотрофи (хемиските соединенија).

Вирусите не се класифицирани како живи организми поради фактот што вон клетките во кои можат да паразитираат, тие се, поедноставено кажано, само нуклеински киселини спакувани во протеинска обвивка. Нивниот репродуктивен циклус се довива само внатре во анималните или растителни клетки кои ги инфицираат и чија клеточна машинерија и ресурси ги користат за репликација на сопствениот генетски материјал (DNA или RNA) и за синтеза на протеинските молекули потребни за формирање на нови вирусни честички (**вириони**).

Во систематиката, организмите се класифицирани во повеќе таксономски категории според морфолошките и покрупните функционални разлики кои се резултат на еволуциската дивергенција. Целокупниот жив свет се состои од два основни типа клетки: прокариотски и еукариотски (**слика 3-1**).

таксономски категории		едноклеточни		повеќеклеточни
<i>Monera</i> (прокариоти)		<i>Eubacteria</i> (вистински бактерии)		
		<i>Archaea</i> (архебактерии)		
<i>Eukarya</i> (еукариоти)	<i>Fungi</i> (габи)	протисти	едноклеточни протисти слични на габите	повеќеклеточни габи
	<i>Plantae</i> (растенија)		<i>Protophyta</i> (едноклеточни протисти слични на растенијата)	<i>Metaphyta</i> (повеќеклеточни растенија)
	<i>Animalia</i> (животни)		<i>Protozoa</i> (едноклеточни протисти слични на животните)	<i>Metazoa</i> (повеќеклеточни животни)
	едноклеточни еукариотски организми		некласифицирани протисти	/

**Слика 3-1:** Една од класификациските шеми на живите организми.

### 3.3 Прокариоти

Таксономската група прокариоти е составена од: бактериите (*Eubacteria*) и археите (*Archaea*), порано означени како архебактерии (*Archebacteria*). Прокариотите се еволуциски многу постари и поедноставни од еукариотите, но, не треба да се заборава дека современите бактерии еволуирале прилагодувајќи се на изменетите услови на животната средина. Тие имаат способност за користење на различни и многу поразновидни извори на енергија отколку еукариотите, како и за населување на екстремни услови на надворешната средина (врели хидротермни извори, екстремно солени или кисели акумулации). Сите прокариотски клетки имаат клеточна мембрана (плазмалема) што ја обвива цитоплазмата во која се наоѓаат голем број рибозоми. Покрај тоа, кај некои прокариотски клетки се развил клеточниот сид кој ја обвива клетката околу клеточната мембрана, а кај некои еволуирале и сложени биохемиски процеси каква што е фотосинтезата.

### 3.4 Еукариоти

Едноклеточните еукариоти се нарекуваат протисти. Во научната заедница сè уште не постои консензус во однос на класификацијата на еукариотските организми. Имено, некои едноклеточни еукариоти имаат способност за самостојно движење и за фагоцитоза, па, се систематизирани како протисти слични на животните (*Protozoa*), додека друга група еукариоти како некои едноклеточни алги поседуваат хлоропласти, па, некои автори ги класифицираат како протисти слични на растенијата (*Protophyta*). Посебна трета група се означени како протисти слични на габите по тоа што создаваат спорангиуми. Поради несогласувањата меѓу таксономите, постои и група на т.н. неклассифицирани протисти.

Едноклеточните организми мораат да поседуваат способност за самостојно извршување на сите функции кои се неопходни за одржување на нивниот живот и размножување. Воопштено, таквите едноклеточни организми имаат многу кус животен век, многу се чувствителни на енвайронменталните влијанија, но, истовремено имаат и способност за брзо и релативно ефектно прилагодување кон промените. Таквите својства се една од причините за екстремната разновидност на едноклеточните организми кои еволуирале во сосема различни видови. И покрај тоа, комплексноста на овие организми е ограничена и далеку помала во однос на повеќеклеточните организми.

Споредбата на некои базични карактеристики на прокариотите и на еукариотите е прикажани во **табелата 3-1**.

**Табела 3-1: Споредба на основните карактеристики на прокариотските и еукариотските организми**

карактеристики	прокариоти	еукариоти
<b>главни таксономски групи</b>	<i>Eubacteria</i> (бактерии) <i>Archaea</i> (архебактерии)	<i>Protista</i> (протисти) <i>Fungi</i> (габи) <i>Plantae</i> (растенија) <i>Animalia</i> (животни)
<b>форми на организација</b>	едноклеточни	едно- и повеќеклеточни
<b>оргanelи, цитоскелет, клеточни структури за делба</b>	отсутни, освен рибозомите	присутни, комплексни и високо специјализирани
<b>геном</b>	составен од релативно куса, циркуларна DNA, присутни се плаزمиди	составен од долга DNA лоцирана во јадрото
<b>синтеза на протеини</b>	релативно едноставна, се одвива континуирано со транскрипцијата	релативно комплексна, се врши во цитоплазмата и во ГЕР
<b>метаболизам</b>	анаеробен и аеробен, се одвива дифузно во клетката	главно аеробен, одвоен во клеточни компартмани
<b>ендоцитоза и егзоцитоза</b>	отсутни	присутни
<b>големина на типична клетка</b>	1-10 $\mu\text{m}$	10-100 $\mu\text{m}$

### 3.5 Повеќеклеточни организми

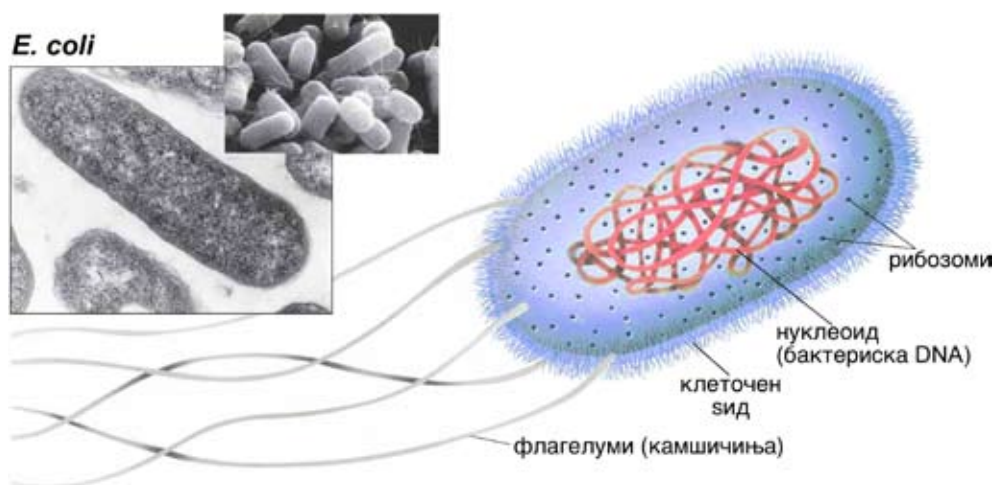
Повеќеклеточните еукариоти се најсофистицирани, најочигледни, најмногу дивергирани и најмногубројни организми на Планетава и се класифицирани во таксономските категории (царства): *Animalia* (животни), *Plantae* (растенија) и *Fungi* (габи). Во литературата, повеќеклеточните животински организми се означуваат и како *Metazoa* (метазои), додека повеќеклеточните растенија како *Metaphyta* (метафитни организми). Очигледниот еволуциски успех на повеќеклеточните видови се должи на фактот што кај нив постои поделба на функциите во различни клеточни типови и органи, со што се воспоставуваат бројни форми на меѓуклеточни интеракции, а со тоа се создава и потенцијалот за потребната функционална комплексност. Тие живеат релативно подолго, но, побавно се прилагодуваат кон промените на нивната околина.

Некои повеќеклеточни организми, каква што е мувлата *Dictyostelium discoideum*, го започнуваат својот животен циклус со повеќеклеточен стадиум, а потоа егзистираат како возрасни единки главно во едноклеточни форми. Сепак, најголемиот број анимални и растителни видови се повеќеклеточни во вистинска смисла и во текот на целиот вегетативен циклус од животот, додека за нивното размножување се задолжени половите (**герминативни**) клетки.

Процесот на развој на оплодената полова клетка до возрасен, зрел организам, вклучува голем број клеточни делби во текот на кои доаѓа до сè поголема специјализација на телесните (**соматски**) клетки и нивна структурна и функционална диференцијација, раст и организација во посебни ткива и органи, со што се обликува морфологијата и се развива возрасниот организам.

### 3.6 Основни карактеристики на прокариотските клетки

Прокариотите се едноклеточни организми со мали димензии (најчесто под 10  $\mu\text{m}$ ), со наједноставна внатрешна организација, немаат јадро, и освен рибозомите, не поседуваат сложени органели ниту внатрешен мембрански систем каков што имаат еукариотите (**слика 3-2**).



**Слика 3-2:** Структура на бактериска клетка. Во горниот лев агол е прикажан микрографија снимена на трансмисиони електронски микроскоп на пресек низ цревната бактерија *Escherichia coli*, додека кон десно од е микрографија од скенинг електронски микроскоп при што се гледа тридимензионалниот надворешен изглед на бактериските клетки.

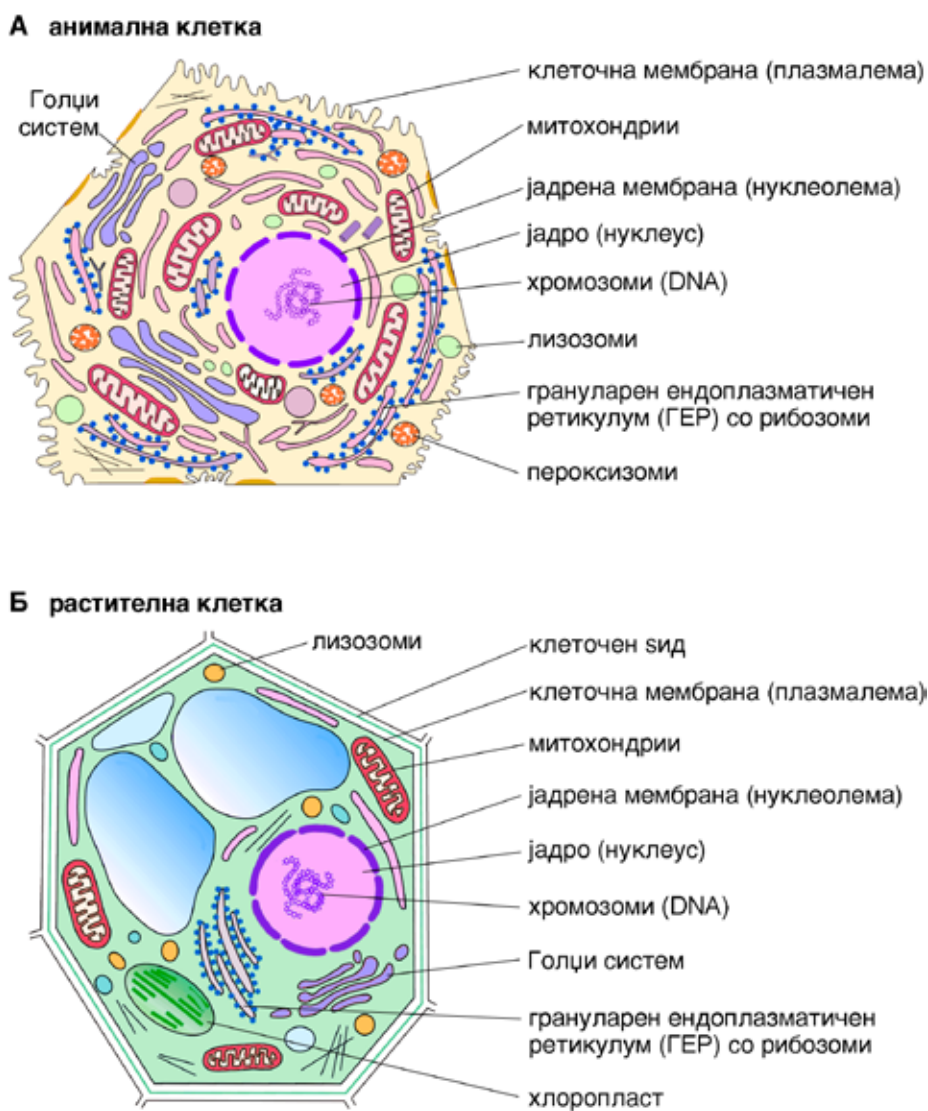
Геномот (бактериски хромозом) е составен од молекул на циркуларна DNA кој е слободен во цитоплазмата, но, е често локализиран во средишниот регион од клетката, па, при микроскопското набљудување може да потсетува на јадро (оттаму и изразот **нуклеоид**). Цитоплазмата е обвиеана со клеточна мембрана околу која се наоѓа клеточен сид изграден од пептидогликан (комплекс на јаглехидрати со полипептидни единици). Клеточниот сид кај растенијата, габите и кај протистите е со сосем различна хемиска структура од тој на бактериските клетки. Некои бактерии поседуваат флагелум (камшиче) кое им овозможува брзо движење низ течните живеалишта.

Иако поедноставни, прокариотските клетки ниту од далеку не се примитивни, а имаат далеку подолга еволуција отколку вишите организми.



### 3.7 Основни карактеристики на еукариотските клетки

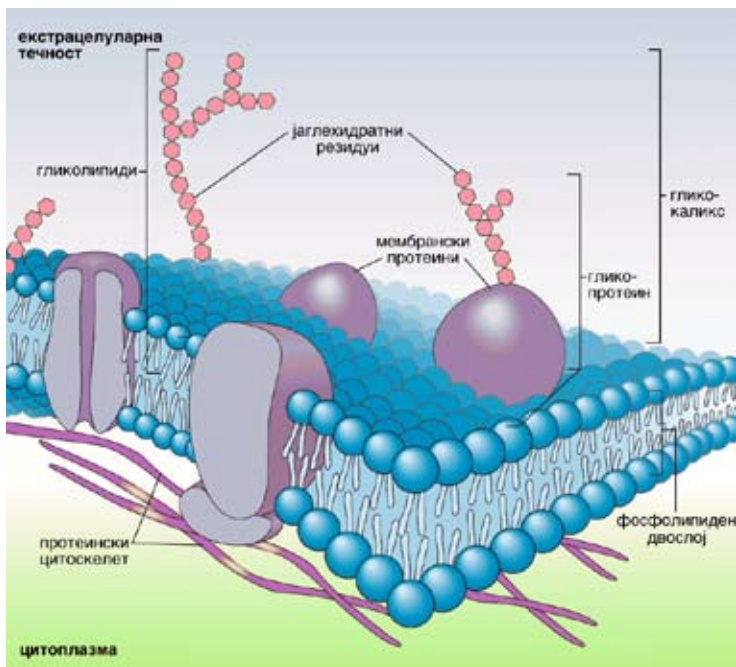
Еукариотите се структурно и функционално многу посложени од прокариотските клетки и нивната главна карактеристика е здружување на клеточните компоненти во посебни компартмани наречени органели какви што се: ендоплазматскиот ретикулум, митохондриите, Голџиевиот систем, лизозомите, пероксизомите, центриолите, цитоскелетните елементи, вакуолите и други. Некои анимални клетки поседуваат и специјализирани органели за механичко движење какви што се камшичињата (флагелумите) и трепките (цилиите). Кај растителните клетки се наоѓаат и посебни органели во кои се одвива фотосинтезата и кои се наречени како хлоропласти (слика 3-3).



**Слика 3-3:** Шематски приказ на некои структурни елементи и органели кај типичната анимална (А) и растителна клетка (Б).

## Плазмалема (клеточна мембрана)

Клеточната мембрана е присутна кај сите живи клетки и претставува функционална бариера меѓу цитоплазмата и екстрацелуларниот простор. Составена е од фосфолипиден двослој во кој хидрофобните липидни групи од двата слоја се допрени еден до друг, додека хидрофилните фосфатни групи се ориентирани кон екстрацелуларниот простор (од надворешниот полуслој) и кон цитоплазмата (од внатрешниот полуслој). Поголема механичка цврстина на клеточната мембрана е обезбедена со молекулите на холестерол кои се вклопени во внатрешниот хидрофобен дел од фосфолипидниот слој. Од клучно функционално значење се разните мембрански протеини кои се наоѓаат „укопчени“ на надворешната или внатрешната површина од плазмалемата (т.н. периферни мембрански протеини) или се вклопени во фосфолипидниот двослој (интегрални протеини). Мембранските протеини можат да вршат транспорт на јони и други молекули низ клеточната мембрана, да претставуваат рецептори за хормони, како и да вршат други важни функции. Некои од овие мембрански протеини се обемно гликозилирани, т.е. ковалентно се поврзани со разни јаглехидратни групи и формираат посебен слој вон површината кај некои клетки, означен како гликокаликс (слика 3-4).



**Слика 3-4:** Структура на плазмалемата и нејзините карактеристични елементи.

Покрај заштитната функција, клучна особина на клеточната мембрана е нејзината селективна permeабилност ограничена само за определени молекули кои можат да дифундираат слободно низ неа. За внесување на најголем број молекули и честички во клетката, на плазмалемата постојат посебни мембрански протеини и рецептори (јонски канали, молекуларни пумпи итн.), кои ќе бидат подетално објаснети во главата 6: Протеини. Во функциите на плазмалемата се и комплексните механизми на ендоцитоза: пиноцитоза (неспецифично внесување мали количества екстрацелуларна течност), фагоцитоза (внесување на цврсти, покрупни честички) и ендоцитоза посредувана со рецептори (преку посебни протеини кои специфично ги препознаваат молекулите и потоа ги внесуваат низ мембраната во клетката). За изнесување на определени материи во форма на секреторни везикули вон клетката е задолжен процесот на егзоцитоза.

Покрај заштитната функција, клучна особина на клеточната мембрана е нејзината селективна permeабилност ограничена само за определени молекули кои можат да дифундираат слободно низ неа. За внесување на најголем број молекули и честички во клетката, на плазмалемата постојат посебни мембрански протеини и рецептори (јонски канали, молекуларни пумпи итн.), кои ќе бидат подетално објаснети во главата 6: Протеини. Во функциите на плазмалемата се и комплексните механизми на ендоцитоза: пиноцитоза (неспецифично внесување мали количества екстрацелуларна течност), фагоци-

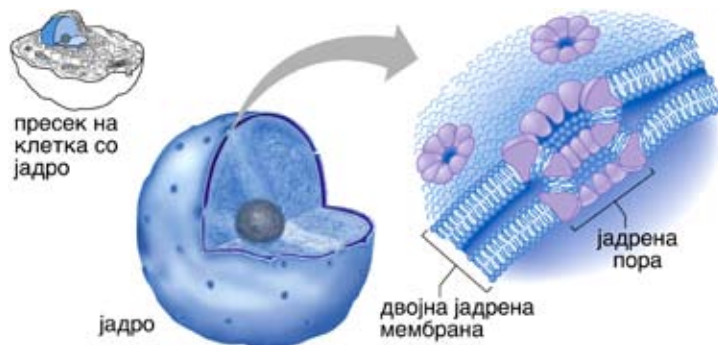


## Јадро (нуклеус)

Геномот на еукариотските клетки е посложен, поголем и разделен во структурни единици наречени хромозоми, сместени во посебна органела - јадро. Јадрената мембрана (нуклеолема) има извонредно важна функција во физичкото одвојување на процесите на транскрипција и транслација, кои за споредба, не се одвоени кај прокариотите. На двослојната јадрена мембрана се наоѓаат голем број јадрени пори преку кои поседуваат посебни протеини што формираат молекуларни канали (т.н. комплекс на јадрени пори). Тие овозможуваат специфичен и селективен транспорт на макромолекулите во и надвор од јадрото. Низ јадрените пори во јадрото влегуваат протеините кои го градат и моделираат хроматинот, како и ензимите и други протеини кои учествуваат во репликацијата, рекомбинацијата, репарацијата и транскрипцијата на геномската DNA. Спротивно, од јадрото во цитоплазмата излегуваат повеќе типови RNA-молекули, како и комплекси меѓу RNA и протеини (слика 3-5).

Јадренцето (нуклеолус) претставува посебна структура во јадрото која нема сопствена мембрана. Се претпоставува дека во оваа органела се врши интензивна синтеза и процесирање на рибозомските RNA-молекули.

Како и кај прокариотите, геномот на еукариотските клетки се составен од DNA-молекули. За разлика од циркуларната DNA кај бактериите, геномската DNA кај еукариотите поврзана со протеини и е разделена на повеќе линеарни хромозоми. Кога клетките не се во активна делба, нивните хромозоми се максимално релаксирани и формираат **хроматин**, со што е максимално зголемена можноста за директен контакт на соодветните ензими, регулаторни и други протеини со DNA-молекулите. Во текот на митозата и мејозата, хромозомите се силно кондензирани и видливи со микроскоп.



**Слика 3-5:** Структура на јадрените пори во двојната нуклеолема.

## Ендоплазматски ретикулум (ЕР)

Тој претставува сплет на комплексни мембрански лавиринти (цистерни) кои можат да имаат форма на сплескани мембрански кесички и разгранети тубули кои се распространети низ цитоплазмата. Мембраните на ЕР се во континуитет со надворешната јадрена и со клеточната мембрана. Ваквиот внатрешен клеточен мембрански систем овозможува и циркулирање на разни молекули низ клетката. Мембраните на грануларниот ЕР (ГЕР) содржат голем број рибозоми со што добива зрнест изглед и неговата основна функција е поврзана со синтезата на протеини

и гликозилација на некои од нив. Наспроти тоа, мазниот ЕР не содржи рибозоми и неговата улога е во синтезата на липидите, детоксификацијата на некои токсични соединенија (во хепатоцитите)

## Голџиев апарат (систем, комплекс)

Се состои од сплескани мембрански везикули кои се напластени една врз друга во форма на стог. Основната функција на Голџиевиот систем е регулација на внатрешниот клеточен транспорт и учество во секрецијата, колектирањето и пакувањето на некои продукти во секреторни везикули кои потоа се изнесуваат во екстрацелуларниот простор. Во Голџиевиот систем се синтетизираат мембраните од кои се гради и обновува плазмалемата и лизозомите. Гликопротеините кои се синтетизирани во ГЕР можат да се подложат на дополнителни хемиски модификации во мембраните на Голџиевиот систем.

## Митохондрии

Тоа се релативно крупни клеточни органели со сферична или издолжена форма, а градени се од двојна мембрана: надворешна и внатрешна. Внатрешната мембрана формира набори кон внатре (т.н. кристи) со што значително ја зголемува својата површина на која се наоѓаат клучните митохондриски ензими. Просторот во внатрешната мембрана меѓу кристите се нарекува матрикс и содржи екстремно висока концентрација на протеини (речиси 50%). Матриксот содржи рибозоми и сопствена митохондриска циркуларна DNA поради што митохондриите имаат и минимална автономија во клетката. Но, најголем број од митохондриските протеини се кодирани од страна на јадрената DNA и се синтетизираат во рибозомите во цитоплазмата, по што се транспортираат во митохондриите. Основната функција на митохондриите е клеточна респирација преку процесот на оксидативна фосфорилација со која во клетката се генерира високоенергетскиот АТР, се троши кислород, а клеточните горива (јаглените хидрати, мастите и аминокиселините) се оксидираат при што се формираат јаглороден диоксид и вода.

Митохондриите се делат со процес кој наликува на простата делба на бактериите, но, се зависни од протеините кодирани од јадрениот геном, па, не можат да се делат вон клетките (во *in vitro* услови). Од генетички аспект е важно што делбата на митохондриите не е синхронизирана со клеточната делба. Сево ова е причина за т.н. ендосимбиотска теорија за потекло на митохондриите, според која тие се остатоци од прокариоти кои оригинално паразитирале во еукариотските клетки, и кои со текот на еоните на еволуцијата ја поедноставиле својата градба и стапиле во симбиоза со домаќинската клетка.

## Рибозоми

Рибозомите се ситни органели без мембрани градени од рибонуклеопротеини (комплекси на повеќе рибозомски RNA-молекули и протеини). Покрај рибозомите

кои се слободни во цитоплазмата, било поединечно или во групации означени како полирибозоми, голем дел се врзани со ЕР (формирајќи го ГЕР). Во рибозомите се врши синтеза на полипептидите, по урнек на информациите од кодоните на информациските (mRNA) молекули.

### Пероксисоми (микротелца)

Овие ситни везикули обложени со единечна мембрана содржат разни ензими инволвирани во оксидативни хемиски реакции и во создавање на водороден пероксид. Каталазата е најважниот ензим присутен во пероксисомите, го користи водородниот пероксид за оксидација на повеќе компоненти кои се непотребни или штетни за клетката. Во текот на овие процеси се создаваат реактивни кислородни радикали какви што се пероксидите и супероксидните радикали кои се исклучително токсични за клетката, па, мораат да бидат соодветно неутрализираани или безбедно одвоени од цитоплазмата.

### Лизозоми

Тоа се мали везикули кои ги создава Голџиевиот систем и кои се исполнети со хидролитички ензими какви што се рибонуклеазите и фосфатазите. Основната функција на лизозомите е дигестија и уништување на разни штетни или страни материјали кои се претходно внесени во клетката со фагоцитоза или пиноцитоза, како и разградување на делови од сопствената или од околните клетки при апоптозата.

### Хлоропласти

За разлика од анималните клетки, растителните поседуваат **хлоропласти**, посебни клеточни органели кои го содржат пигментот хлорофил и во кои се врши фотосинтезата. Покрај хлоропластите, растителните клетки имаат и клеточен сид составен од целулоза и од други полимерни молекули. Како и митохондриите, хлоропластите содржат своја сопствена DNA, по што се слични, иако многу покомплексни, од митохондриите. Сепак, голем дел од хлоропластните протеини се кодираани од страна на јадрениот геном и се синтетизираат во цитоплазмата, а оттаму се транспортираат во хлоропластот. Покрај надворешната и внатрешната мембрана, хлоропластите содржат мембрански дискоидни структури наречени тилакоиди кои се напластуваат формирајќи т.н. грани. Фотосинтезата се одвива на тилакоидните мембрани.

### Центриоли (микротубуларен организатор)

Овие органели без мембрани имаат форма на микроскопски цилиндари и се сретнуваат во пар кај анималните клетки и кај некои протисти. Секоја центриола е градена од девет триплета на микротубули во радијална формација. Барем некои

центриоли содржат и DNA-молекули чија улога е непозната, иако се шпекулира дека можеби кодира протеини важни за функциите на овие органели. Главната улога на центриолите е склопување на микротубулите при формирањето на цитоскелетот, како и формирање на делбеното вретено и движење на хромозомите во текот на клеточната делба.

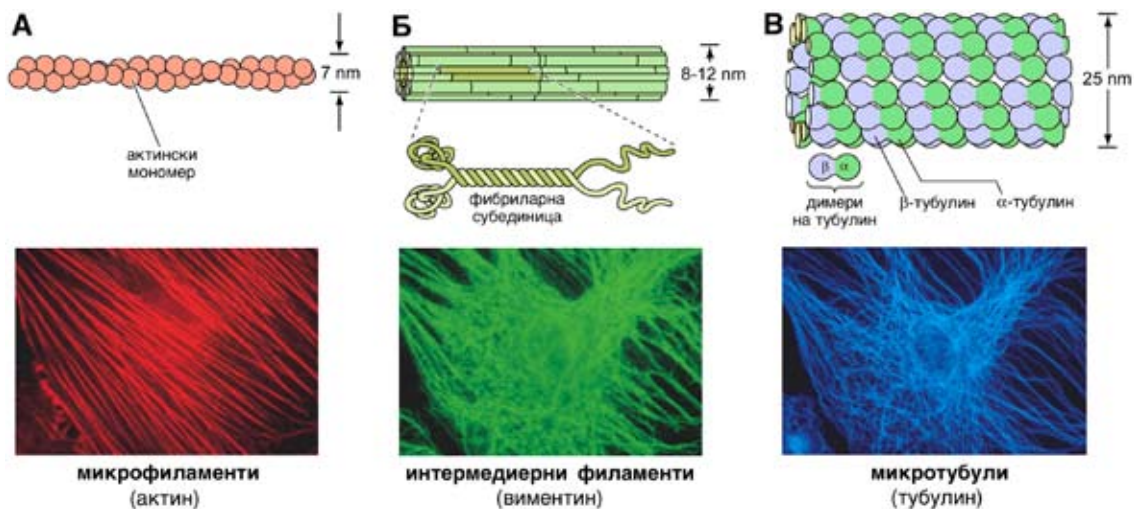
## Цилии (трепки) и флагелуми (камшичиња)

Овие структури се присутни кај некои анимални клетки и стрчат од површината на клеточната мембрана со што им овозможуваат движење и други функции. Цилиите се наоѓаат по целата површина кај некои едноклеточни еукариоти (протисти) каков што е парамециумот и овозможуваат негово движење низ течниот медиум во кој живее. Кај вишите организми се наоѓаат само во специјализирани ткива, каков што е респираторниот епител, во чии клетки цилиите се наоѓаат само во луменот на респираторните патишта каде ги собираат учествуваат во отстранувањето на инхалираните страни честички и бактерии. Цилиите прават карактеристични движења напред и назад, слични на тревата нишана со ветар, и со тоа ја вршат својата механичка функција. Флагелите се покрупни структури кои се карактеристични за некои едноклеточни организми со кои можат брзо да се движат низ течностите. За разлика од цилиите кои секогаш се присутни во голем број, флагелумите се наоѓаат само по еден или два во клетката. Кај вишите организми, како кај човекот, на пример, нивното присуство е ограничено само во машките полови клетки-спермиуми, со кои истите се движат низ женскиот генитален тракт сè до ооцитата.

## Цитоскелет

Во цитоплазмата на еукариотските клетки се наоѓа комплексна мрежа на различни структурни протеински филаменти кои го сочинуваат т.н. **цитоскелет** кој обезбедува механичка стабилност на клетката, но, дозволува и промена на клеточната форма при делбата или движењето на клетката. Покрај тоа, учествува и во интрацелуларниот транспорт на органелите. Цитоскелетот е составен од три тип филаменти: актински микрофиламенти, микротубули и интермедиерни филаменти. Актините и тубулините се меѓу највисоко еволуциски конзервираните протеини, односно нивната аминокиселинска секвенца е многу слична и меѓу еволуциски оддалечени организми.

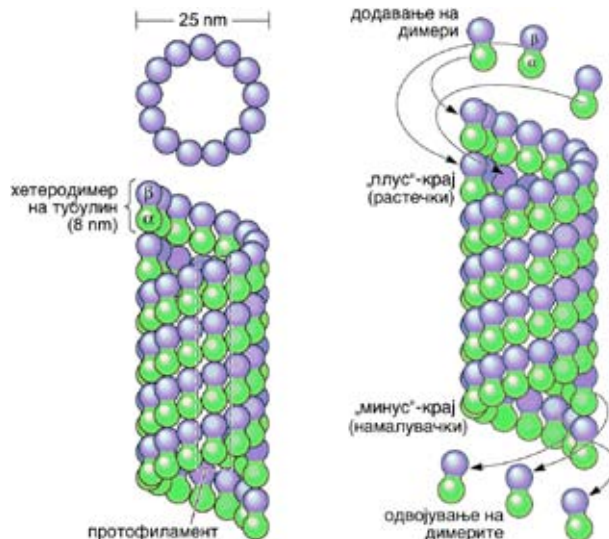
**Микротубулите** се структури во форма на долги и шупливи цилиндри со дијаметар од околу 25 nm, кои се механички многу поцврсти отколку актинските микрофиламенти (**слика 3-6, В**). Микротубулите се комплексни полимери градени од хетеродимери на протеинот тубулин, и тоа од  $\alpha$ - и од  $\beta$ -тубулин, кои се спирално наизменично распоредени во форма на цилиндер. Микротубулите се динамички структури кои постојано се полимеризираат и деполимеризираат со додавање и одвојување на тубулинските димери, соодветно. Иако нивната должина може да биде константна, процесите на додавање и на одвојување на димерите на тубулинот постојано се одвиваат и на двата краја на микротубулата, но, со различна брзина (**слика 3-7**).



**Слика 3-6:** Елементи на клеточниот цитоскелет. Прикажана е структура на микрофиламентите (А), интермедиерните филаменти (Б) и микротубулите (В). Во долните три панели од сликата прикажани се микрографии од флуоресцентна микроскопија на соодветниот цитоскелетен елемент со техниката на имунофлуоресценција (детекција со специфични антитела обележани со флуоресцентна боја).

Имено, крајот кој побрзо „расте“ се означува со: „+“ (плус) или крај кој расте, додека спротивниот крај од микротубулата, кај кој брзината на деполимеризација е поголема, а со тоа и се скурувањето на целата микротубула, се означува со: „-“ (минус) или крај кој се намалува. Ваквата асиметрија на краевите се нарекува и поларизираност.

**Актинските микрофиламенти** имаат дијаметар од околу 7 nm и градени се од мономерни протеини на актин (слика 3-6, А). Групирани се во паралелни снопови или во форма на мрежести решетки обезбедувајќи механичка стабилност и ја одржуваат клеточната форма овозможувајќи реверзибилни деформации на клетките. Овие филаменти создаваат и комплексни структури во форма на продолжетоци какви што се ламелиподиите и филоподиите со кои клетките можат активно да се движат по површините. Покрај тоа, актинските филаменти учествуваат во градбата на микровилите и на други сложени клеточни структури. Актинските филаменти се дел од т.н. **моторни протеини**, каде заедно со миозините



**Слика 3-7:** Структура и динамика на микротубулите.

и други протеински молекули, имаат клучна улога во контрактилната функција на мускулните клетки. Актините овозможуваат формирање на инвагинации на клеточната мембрана при процесот на **ендоцитоза**.

**Интермедиерните филаменти** се хемиски хетерогена група протеински влакна со дијаметар од 8-12 nm, се наоѓаат само кај повеќеклеточните организми и имаат главно структурна улога во одржувањето на формата на клетката како и на просторната организација на органелите во цитоплазмата (**слика 3-6, Б**). Типичен пример се филаментите градени од субединици на протеинот виментин, кои се делови на цитоскелетот кај речиси секоја клетка, неврофиламентите во нервното ткиво и кератинските филаменти во епителните клетки.

## Екстрацелуларен матрикс

Екстрацелуларниот матрикс кој се наоѓа меѓу клетките кај анималните организми се состои од тридимензионална мрежа на протеински влакна вклопена во комплексен гел од јаглехидрати означени како **гликозаминогликани**. Прецизниот состав на екстрацелуларниот матрикс варира според типот на клетките, односно ткивото. Генерално, составен е од неколку групи: структурни протеини (какви што се колагенот и еластините), адхезиски протеини (ламинини и фибронектин, на пример), протеогликан (основен протеин на матриксот асоциран со разни гликозаминогликани), и слободен гликозаминогликан (хијалуронска киселина). Клетките не се само едноставно вклопени во екстрацелуларниот матрикс, туку поседуваат и трансмембрански рецептори наречени **интегрини**. Со овие рецептори клетките специфично се врзуваат со протеините од екстрацелуларниот матрикс.

Кај растителните клетки, таква улога има клеточниот ѕид и специјализираните целулозни структури кои ги градат растителните ткива и органи. Главните функции на екстрацелуларниот матрикс се обезбедување на механичка потпора на клетките и формирање на ткивата и органите, како и учество во меѓуклеточните интеракции и комуникации.

## Клеточен ѕид

Растителните клетки, како и габите и некои бактерии и протисти содржат клеточен ѕид кој ја обиткува клеточната мембрана, а неговиот хемиски состав се разликува од клеточниот ѕид кај бактериските. Кај растенијата, клеточниот ѕид е изграден од влакна на полисахаридот целулоза и има механичка улога во растителните ткива и органи.

### **Вакуоли во растителните клетки**

Крупните вакуоли во кои се чува вода во која се растворени разни соединенија (шеќери, јони и пигменти) се карактеристични за растителните клетки. Покрај чувањето на овие резервни материи, вакуолите го одржуваат и тургорот (механичката цврстина) на растителните клетки.





# НУКЛЕИНСКИТЕ КИСЕЛИНИ КАКО НОСИТЕЛИ НА ГЕНЕТСКИТЕ ИНФОРМАЦИИ

## Глава 4

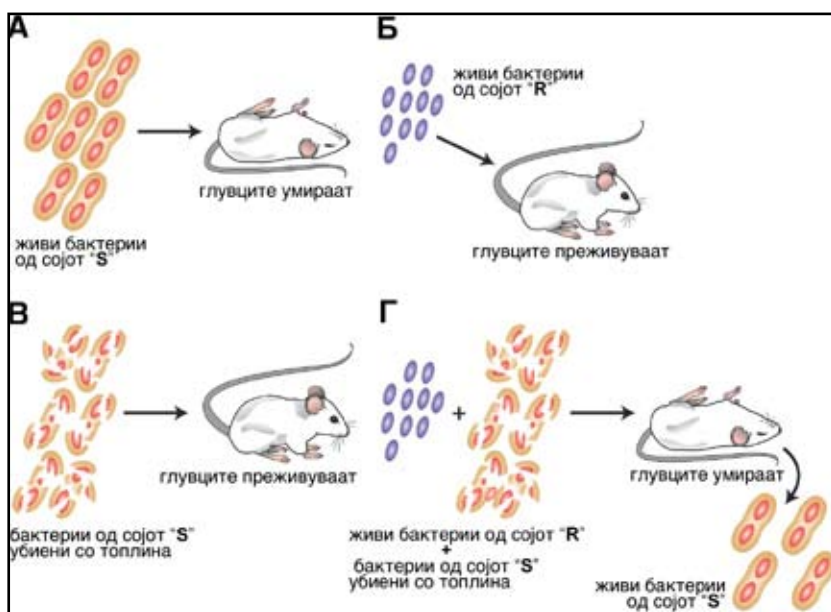
Кај сите организми, генетските информации се вметнати во структурата на нуклеинските киселини на речиси идентичен начин и покрај екстремната разноликост на живиот свет. Сепак, прифаќањето на концептот за DNA-молекулот како универзален генетски материјал била неприфатена сè до средината на минатиот век. Парадоксално, истражувањата на DNA-молекулите датираат пред повеќе од 100 години. Имено, како што е веќе изложено во историскиот преглед, Швајцарецот Мајшер (Johann Friedrich Meischer) прв извршил изолација на соединението, за кое денес знаеме дека е DNA, во 1868 година, за која утврдил дека има кисели својства и дека содржи фосфор. Мајшер го нарекол **нуклеин**, а подоцна, неговите студенти го преименувале во **нуклеинска киселина**. Во доцните 1880-ти години, Косел (Albrecht Kossel) го открил хемискиот состав на DNA-молекулот, односно дека содржи четири типа азотни бази: аденин, тимин, гуанин и цитозин. Во почетокот на 20. век, Левен (Aaron Levene) утврдил дека во составот на DNA-молекулите се повторуваат четири типа на нуклеотиди, а секој од нив е составен од шеќер, фосфат и една од четирите, претходно утврдени, азотни бази. За жал, тој предложил, т.н. **тетрануклеотидна теорија**, според која DNA-молекулите се градени од само од по четири ковалентно поврзани нуклеотиди. Од оваа погрешна хипотеза и се провлекувал долгогодишниот отпор на повеќе истакнати научници кон концептот дека DNA-молекулите се носители на генетските информации. Имено, токму Левеновата теорија имплицира дека толку едноставна молекуларна структура не може да биде доволна за чување на енормниот број генетски информации неопходни за наследувањето и животот на организмите.

### 4.1 Бактериска трансформација - експериментот на Грифит

За расветлување на хемиската природа на наследниот материјал, во текот на 1920-тите години, биле вршени серии на експерименти, од кои особено е значаен

експериментот спроведуван од Фредерик Грифит (Frederick Griffith) при што ја користел бактеријата *Streptococcus pneumoniae*. Оваа бактерија предизвикува пневмонија кај луѓето и обично е смртоносна за лабораториските глувци, па, понекогаш се нарекува и **пневмокок**. Во тоа време, биле изолирани **високо вирулентни** (инфективни или смртоносни) соеви на *S. pneumoniae* кои предизвикувале смрт кај сите заразени глувци. Таков е сојот **S** за кој карактеристично е тоа што бактериските клетки се инкапсулирани во полисахаридна капсула и на бактериолошката подлога формираат мазни колонии.

Покрај тоа, изолиран бил и **нелетален сој** на *S. pneumoniae* кој немал капсула, формирал рапави колонии и бил означен како сој **R**. Грифит ги користел овие два бактериски соја во своите експерименти, при што глувците ги инфицирал со живи или со бактерии претходно убиени со вриење. Се разбира, инфицирањето на експерименталните животни со живите бактерии од сојот **S** било смртоносно за нив, додека инфекцијата со бактериите од сојот **R** или со претходно убиените бактерии од сојот **S** не



**Слика 4-1:** Трансформирање на бактерискиот сој R во сој S со помош на бактериски клетки од сојот S убиени со топлина.

следноста е одговорна за ваквата трансформирачка способност. Со оглед на тоа што во текот на трансформацијата се менува генотипот на бактериите и од умрените животни може да се изолираат бактерии од другиот сој, Грифит заклучил дека токму таа хемиската компонента од бактериите е носител на наследниот материјал.

предизвикало смртоносна пневмонија (слика 4-1).

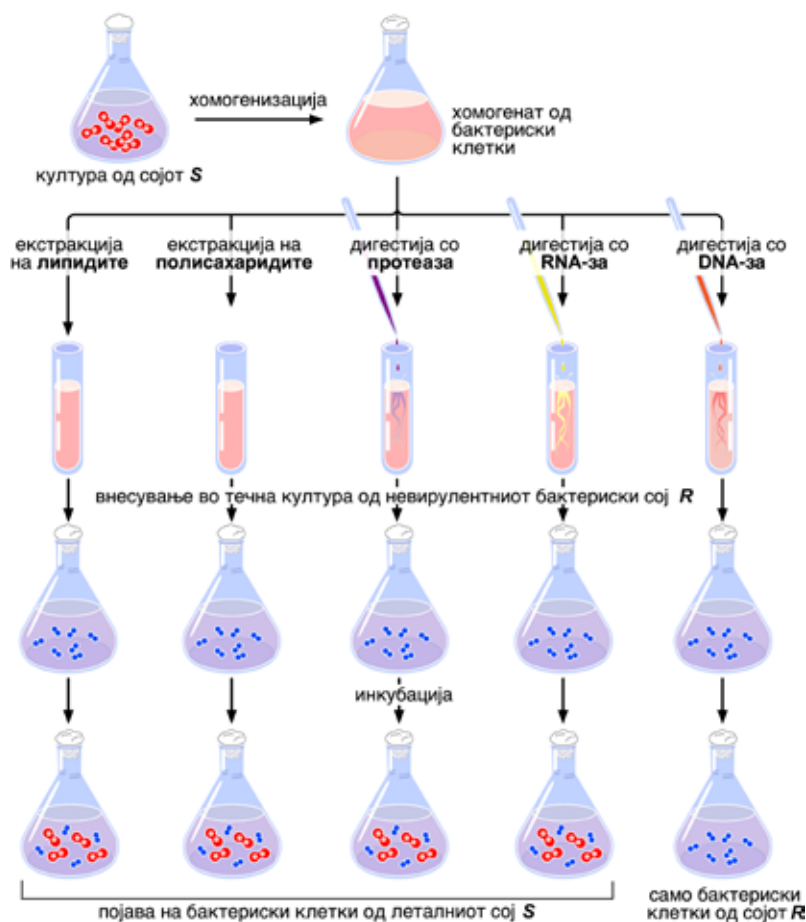
Експериментот јасно покажал дека топлотното убивање на бактериите ја спречува инфекцијата. Но, најинтересен бил наодот дека мешањето на убиени бактерии од сојот **R** резултирало со смрт кај лабораториските глувци. Од овие умрени глувци било можно да се изолираат живи бактериски клетки од сојот **S**, кои имале кап-

## 4.2 Првичен доказ дека DNA е носител на наследноста - експериментот на Авери, МекЛоуд и МекКарти

Оваа дилема била разрешена во 1940-тите години, со експериментите спроведени од Авери (Oswald Avery) и неговите соработници МекЛоуд и МекКарти (Colin MacLeod и Maclyn McCarty). Тие користеле методи за селективно уништување на поединечните хемиски компоненти во екстрактот на мртви бактерии од сојот *S*, за да откријат која од нив е носител на трансформирачката способност. Присуството на полисахаридна капсула кај вирулентниот сој *S*, а не и кај сојот *R*, сугерирала дека токму полисахаридите се можната компонента која е присутна во екстрактот на мртвите бактерии од сојот *S* и ги трансформира бактериските клетки од сојот *R* во сој *S*. Но, селективното уништување на полисахаридите во екстрактот сè уште резултирало со трансформација и кај умрените глумци можело да се изолираат бактерии од сојот *S*. Со тоа станало

јасно дека полисахаридната компонента не е одговорна за трансформацијата. Слични резултати се добивале и при селективно хемиско уништување на протеините, липидите и RNA-молекулите во бактерискиот екстракт, што докажало дека ниту една од овие соединенија не е носител на наследниот материјал и со тоа нејзиното уништување не ја спречува трансформацијата на невирулентниот сој на *S. pneumoniae* во вирулентен.

Трансформирачката способност исчезнувала дури откако бактерискиот екстракт се третирал со ензимот деоксирибонуклеаза (DNA-за) кој селективно ги разградува DNA-молекулите (слика 4-2).



**Слика 4-2:** Шематски приказ на експериментот на Авери и соработниците, со кој се докажува дека токму DNA-молекулите, а не протеините, полисахаридите, липидите или RNA-молекулите, се одговорни за бактериската трансформација на бактерискиот сој *S* во сој *R*.

Со тоа, Авери со соработниците неоспорно докажале дека DNA-молекулите, а не другите бактериски компоненти, се хемиски носители на генетските информации.

Денес е познато дека при трансформацијата, фрагментите од DNA-молекулите од вирулентниот сој *S* на *S. pneumoniae* се пренесуваат во бактериите од невирулентниот сој *R* и стануваат дел од наследниот материјал, што резултира со трансформирање на истиот во бактериски сој *S*.

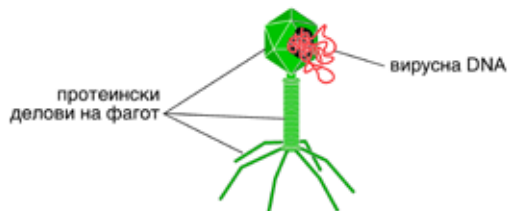
### 4.3 Конечен доказ дека DNA-молекулите ги пренесуваат генетските информации - експериментот на Хиршеј и Чејс

Иако резултатите од експериментите спроведени од Авери и соработниците јасно покажале дека DNA-молекулите се носители на генетскиот материјал, многу научници во тоа време биле скептични и се сомневале дека премногу едноставниот состав на DNA не може да биде доволен за чување на толку комплексни информации во гените. Поради покомплексниот состав и градба, многу тогашни авторитети сепак ја преферирале теоријата дека протеините се најверојатните носители на генетските информации.

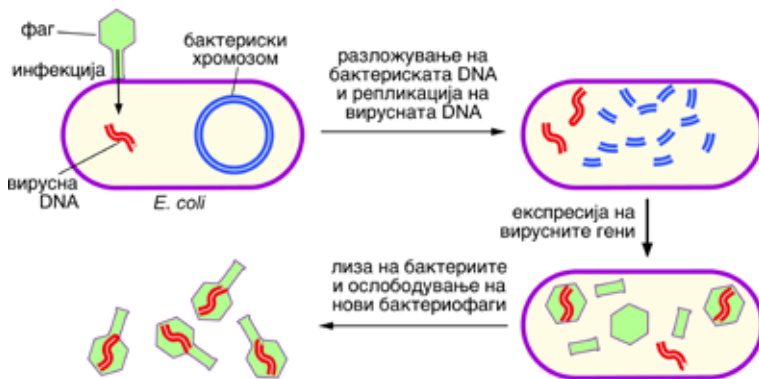
Експериментите спроведени од Хиршеј (Alfred Hershey) и Чејс (Martha Chase) во 1952 довеле до уште еден непобитен доказ дека генетските информации се содржат во DNA-молекулите. За среќа, нивните резултати имале многу поголемо влијание во

научната заедница. Тие вршеле експерименти со еден **бактериофаг (бактериски вирус)** наречен **T2-фаг**. Повеќе детали за вирусите се дадени понатаму, додека во контекст на овој пример, наједноставниот опис на овој T2-фагот е дека се состои од вирусна DNA спакувана во протеинска обвивка. Токму тие два конституенти биле главни кандидати за носители на генетски информации. Кога T2-фагот ја инфицира бактеријата, дел од вирусот навлегува во клетката. По околу 20 минути, бактеријата се распрскува, ослободувајќи поголем број на вируси (слика 4-3).

**А** шематска структура на бактериофагот T2

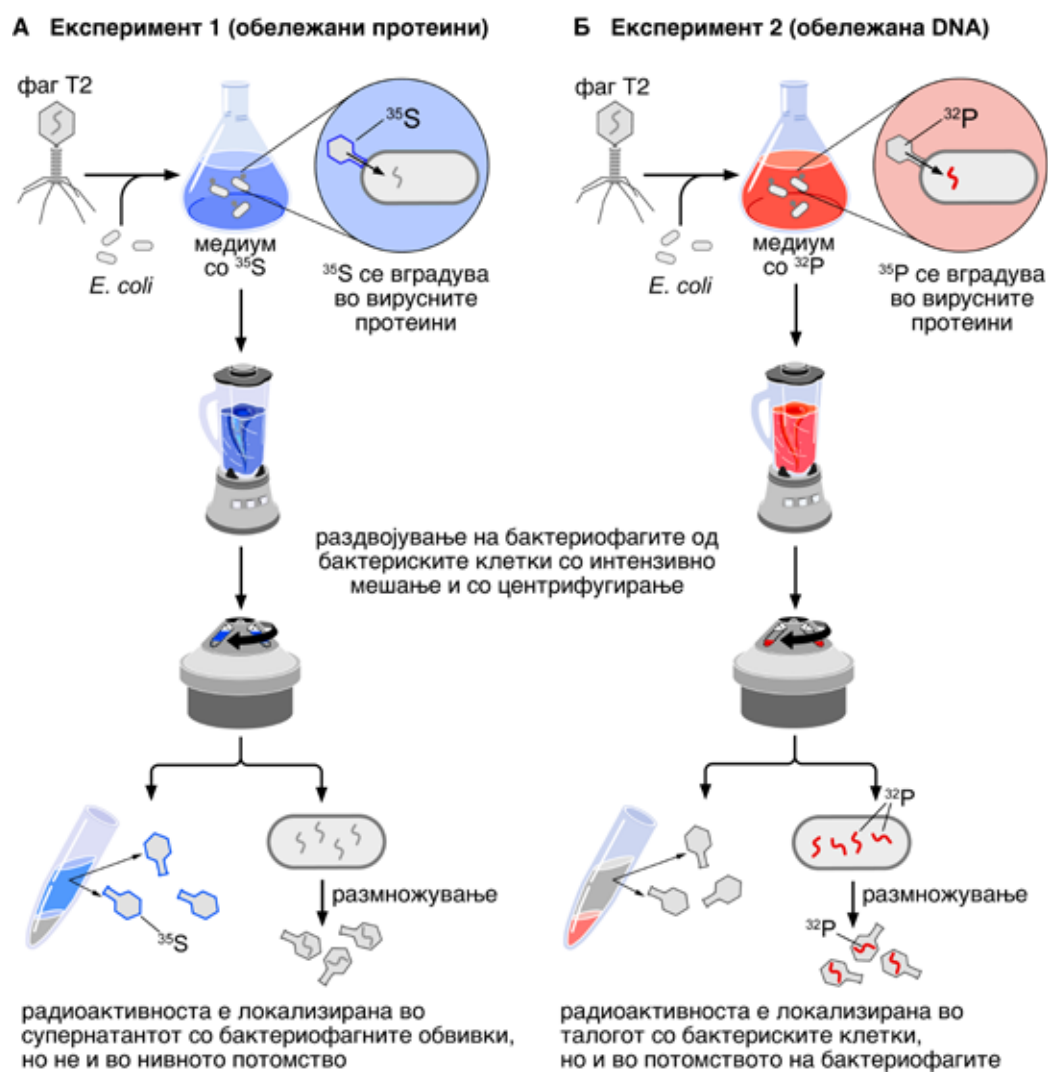


**Б** животен циклус на бактериофагот T2



**Слика 4-3:** Поедноставен приказ на бактериофагот T2. **А:** шематската структура на бактериофагот. **Б:** животниот циклус на бактериофагот во бактеријата.

Сликовито кажано, навлегувањето на бактериофагот го менува генетскиот програм на бактеријата и ја претвора во „фабрика“ за продукција на бактериски вируси. Хиршеј и Чејс испитувале дали во текот на овој процес во бактерииската клетка навлегува вирусната DNA или вирусните протеини. За таа цел, истражувачите користеле радиоизотопи со кои селективно ги обележувале овие две компоненти од бактериофагот. Според претходните сознанија за хемискиот состав на протеините и на DNA во тоа време, фосфорот влегува во составот DNA, но, не и на протеините. Обратно, сулфурот е присутен во протеините (во аминокиселините цистеин и метионин), но, никогаш во DNA-молекулите. Хиршеј и Чејс ги инкорпорирале радиоактивните изотопи на фосфор ( $^{32}\text{P}$ ) во бактериофагната DNA и изотопот на сулфур ( $^{35}\text{S}$ ) во протеините на фагот, на тој начин што ги умножувале во бактериски култури во кој бил додаден еден од двата изотопа, и тоа во два посебни експерименти (слика 4-4).



Слика 4-4: Принцип на експериментот на Хиршеј и Чејс.



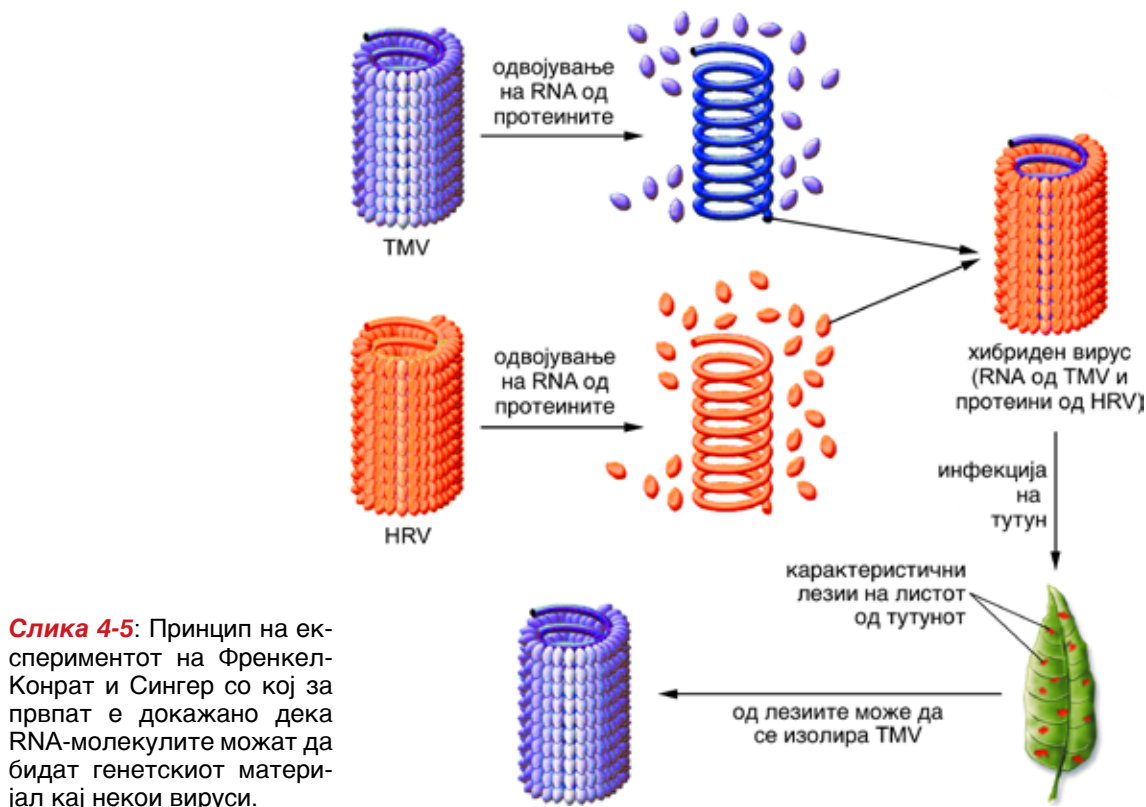
Во едниот експеримент, истражувачите ги инфицирале бактериите со вируси обележани со изотопот  $^{32}\text{P}$ , во другиот експеримент, независно, ги инфицирале бактериските клетки со вируси обележани со изотопот  $^{35}\text{S}$ . По неколку минути, бактериските култури биле интензивно агитирани во кујнска мешалка (миксер) со што вирусните честички биле одвоени од бактериските клетки. Понатаму, Хиршеј и Чејс ги издвоиле бактериите од преостанатиот хранлив медиум (во кој се наоѓале и издвоените вируси) со помош на центрифугирање. Мерењата на радиоактивноста покажале дека кога фосфорот  $^{32}\text{P}$  е користен за обележување на вирусите (т.е. на нивната DNA), најголемиот дел од радиоактивноста преципитирала со бактериите. Наспроти тоа, кај бактериските култури инфицирани со вирусите обележани со сулфур  $^{35}\text{S}$ , радиоактивноста била највисока во супернатантот. Тоа значи дека вирусните протеини (во кои бил инкорпориран изотопот  $^{35}\text{S}$ ) останале во бактериолошкиот медиум, за разлика од изотопот  $^{32}\text{P}$  кој се преципитирал заедно со бактериите на дното од епруветите. По натамошно размножување на фагите при култивација на бактериите во нормален медиум (без радиоактивни изотопи), новите генерации на фаги речиси немале сулфур  $^{35}\text{S}$ , но, содржеле фосфор  $^{32}\text{P}$ .

Ваквите резултати укажале дека DNA-молекулите (обележани со фосфор  $^{32}\text{P}$ ) се пренеле во бактериските клетки, додека вирусните протеини (обележани со сулфур  $^{35}\text{S}$ ) останале надвор од бактериите. Очигледно, протеините се важни за инфекцијата, но, не навлегуваат во бактериската клетка и не се пренесуваат на новите генерации вируси. При инфекцијата, вирусните протеини се само структурно пакување кое се отфрла по инјектирањето на вирусната DNA во бактериската клетка. За разлика од нив, DNA-молекулите обележани со навлегле во бактериите и се пренеле во потомството на новите фаги.

Заклучокот од овој експеримент бил недвосмислен: DNA-молекулите се носители на наследниот материјал кај фагите.

#### 4.4 RNA-молекулите се генетскиот материјал кај некои вируси - експериментот на Френкел-Конрат и Сингер

Иако DNA-молекулите се носители на генетските информации во сите досега проучени клетки, RNA-молекулите ја извршуваат таа функција кај некои вируси (кои не се живи организми вон клетките). Оваа хипотеза е докажана со експериментите на Френкел-Конрат и Сингер (Heinz Fraenkel-Conrat и Bea Singer) во 1956 година. Овие истражувачи го користеле **вирусот на тутуновиот мозаик** (TMV, од англ. tobacco mosaic virus), кој предизвикува заболување при што настануваат видливи промени на листовите на растението. Секоја вирусна честичка (вирион) содржи по еден едноверижен RNA-молекул опкружен со илјадници спирално распоредени вирусни протеини кои создаваат структура во форма на цилиндар. Во своите претходни експерименти, Френкел-Конрат утврдил дека со лабораториските процедури е возможно релативно едноставно раздвојување на RNA од протеинските молекули, и обратно, нивно поврзување во функционална вирусна честичка која е способна да изврши инфекција на тутунот. Работејќи заедно со Сингер, тие произвеле хибридни вируси мешајќи ги RNA-молекулите од TMV со протеините од посебен сој на овој вирус наречен HRV (од англ. Holmes Ribgrass Virus, Холмсов вирус на тегавецот) (слика 4-5).



**Слика 4-5:** Принцип на експериментот на Френкел-Конрат и Сингер со кој за првпат е докажано дека RNA-молекулите можат да бидат генетскиот материјал кај некои вируси.

При експерименталната инфекција на тутунот со ваквите хибридни вируси се покажале карактеристичните симптоми на листовите како при природната болест предизвикана од TMV. Покрај тоа, од инфицираните растенија можел да се изолира TMV иако биле користени хибридни вируси.

Таквите резултати индицирале дека кај TMV, компонентата на генетските информации се содржи во RNA-молекулите. За волја на вистината, истата година други истражувачи покажале дека за инфекција на тутунот е доволна само вирусната RNA (изолирана од TMV), по што во растителните клетки се синтетизираат и вирусните протеини, а подоцна, се ослободуваат и целосни вирусни честички.

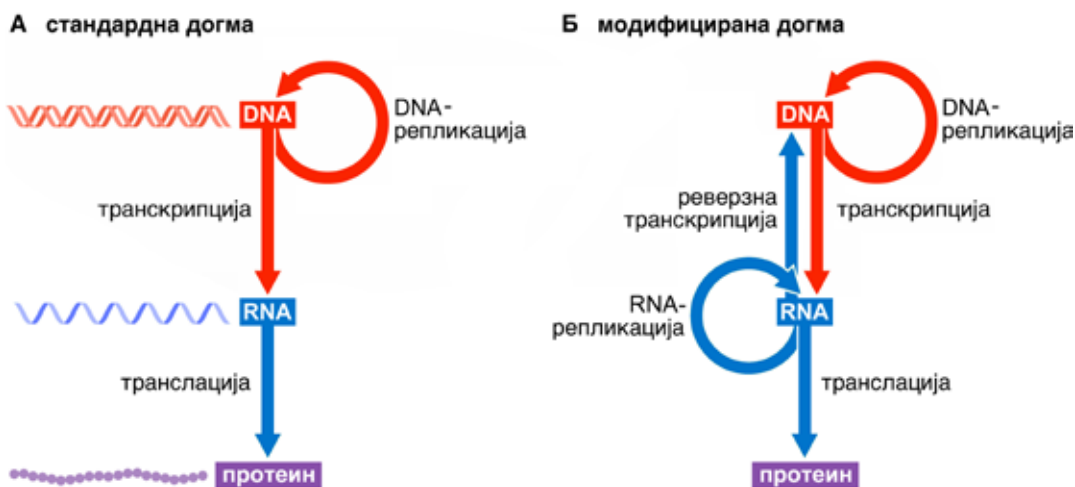
Подоцнежните експерименти потврдиле дека кај клеточните организми генетскиот материјал е составен од DNA-молекули, додека наследните особини кај некои вируси се определуваат од RNA-молекулите.

## 4.5 Централна догма на молекуларната биологија

Наследниот материјал мора да поседува три главни карактеристики:

- да се **реплицира** при секоја делба на клетката, поради тоа што мора да биде присутен во сите клетки на организмот и да се пренесува во следните генерации;
- да ги содржи **информациите за кодирање на сите протеини** во организмот, како и **други генетски информации**; и
- да биде стабилен, но, и повремено менлив, т.е. **мутациите** на генетскиот материјал мора да обезбедат **материјал за еволуција** на организмите.

Молекулите на DNA ја вршат улогата на генетски, наследен материјал во сите клеточни организми во природата. Информациите кои се чуваат во DNA-молекулите се пренесуваат како наследен материјал од една врз друга генерација и служат за кодирање на протеините кај сите досега познати клетки и организми. Овие информации понатаму се користат за синтеза на соодветни RNA-молекули преку процесот на **транскрипција**, односно препишување на информациите од DNA во информацииски RNA-молекули кои ги пренесуваат информациите за градбата на самите протеини кои ги кодираат, како и за разни транспортни и рибозомски RNA-молекули. Со тоа, информациите од RNA-молекулите се преведуваат (**транслација**) во крајните протеински продукти (слика 4-6).



**Слика 4-6:** Централна догма на молекуларната биологија. А: стандарден модел според кој информациите се обновуваат и одржуваат со репликација на DNA-молекулите, а сторнираните информации од протеин-кодирачките гени се пренесуваат во привремени информацииски RNA-молекули, според кои се врши синтеза на протеините. Б: модифициран модел на стандардната Вотсон-Крикова догма поради постоењето на механизми за самообновување на RNA-молекулите, како и за реверзна транскрипција на информациите од RNA во DNA-молекули.

Овој концепт има круцијална улога во молекуларната биологија, па, понекогаш сликовито се означува како централна догма со која се толкуваат виталните процеси неопходни за раст, метаболизам, диференцијација и размножување на сите организми. Еволуциската конзервираност на овој концепт е неверојатна и се однесува како на најпримитивните и најстари бактерии, преку „живите фосилни“ растенија и животни, па, сè до еволутивно најмладите и најсофистицирани виши организми.

Исклучок од оваа централна догма на молекуларната биологија постои кај некои вируси (ретровирусите каков што е HIV), кај кои информациите од вирусниот RNA-геном се препишуваат во DNA-молекули (во клетката во која паразитираат), но, вирусите не се клетки ниту се дефинирани како живи организми.



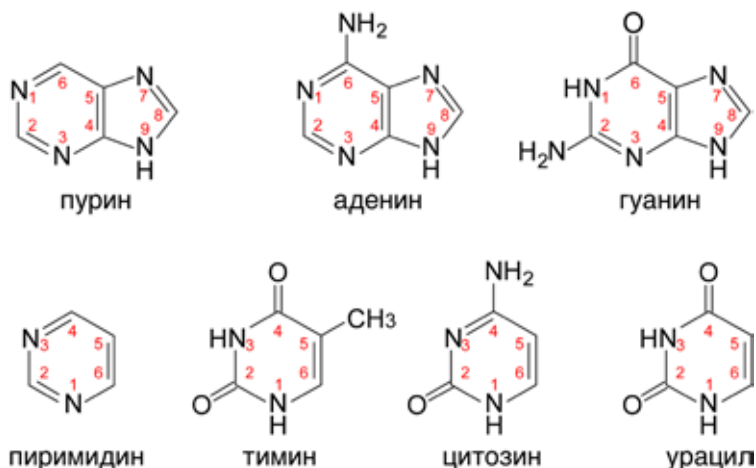
# СТРУКТУРА НА НУКЛЕИНСКИТЕ КИСЕЛИНИ

## Глава 5

Од биохемиски аспект, нуклеинските киселини (DNA и RNA) се полимери: долги молекули градени од основните единици наречени **нуклеотиди**. Кај DNA-молекулите, секој нуклеотид е составен од по три компоненти: **фосфатна група**, **пентозниот шеќер деоксирибоза**, и една од четирите **азотни бази** (**аденин**, **гуанин**, **цитозин** и **тимин**). Кај RNA-молекулите, наместо тимин се наоѓа базата **урацил**.

### 5.1 Состав на нуклеинските киселини

Хемиските формули на петте азотни бази кои се наоѓаат во DNA и во RNA-молекулите се прикажани на **слика 5-1**.

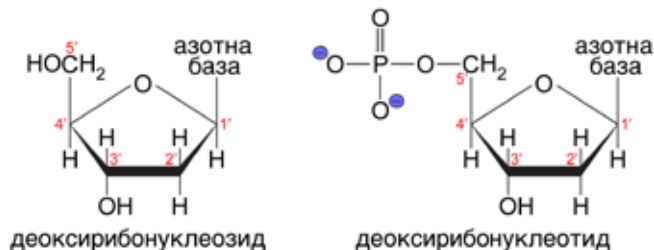


**Слика 5-1:** Хемиска структура на пуринос, пиримидинот, како и на основните пуринос и пиримидински бази кои влегуваат во структурата на DNA и на RNA-молекулите. Урацилот се наоѓа само во структурата на RNA. Со црвени бројки се нумерирани атомите во хетероцикличните прстени на пуриноските и на пиримидинските бази.

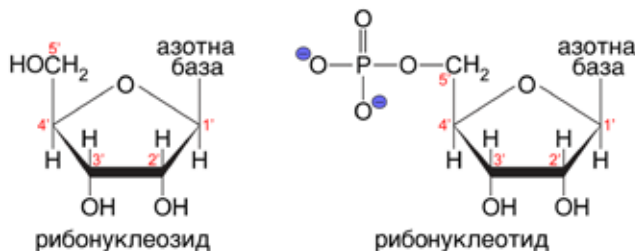
По својата хемиска структура, базите аденин (A) и гуанин (G) се означуваат како **пуринос**, додека базите цитозин (C), тимин (T) и урацил (U) како **пиримидински**. Во литературата, азотните бази се нарекуваат и **нуклеобазии**.

Секоја поединечна азотна база во DNA-молекулот е ковалентно врзана со по еден молекул на **2'-деоксирибоза** (алдопентозен шеќер со водороден атом на вториот C-атом, т.е. на 2'-позицијата). Ваквото соединение се нарекува **нуклеозид**. Кога на соодветниот нуклеозид, ковалентно е врзана и **фосфатна група**, се означува како **нуклеотид** (слика 5-2).

#### А нуклеозиди и нуклеотиди во DNA-молекулите



#### Б нуклеозиди и нуклеотиди во RNA-молекулите



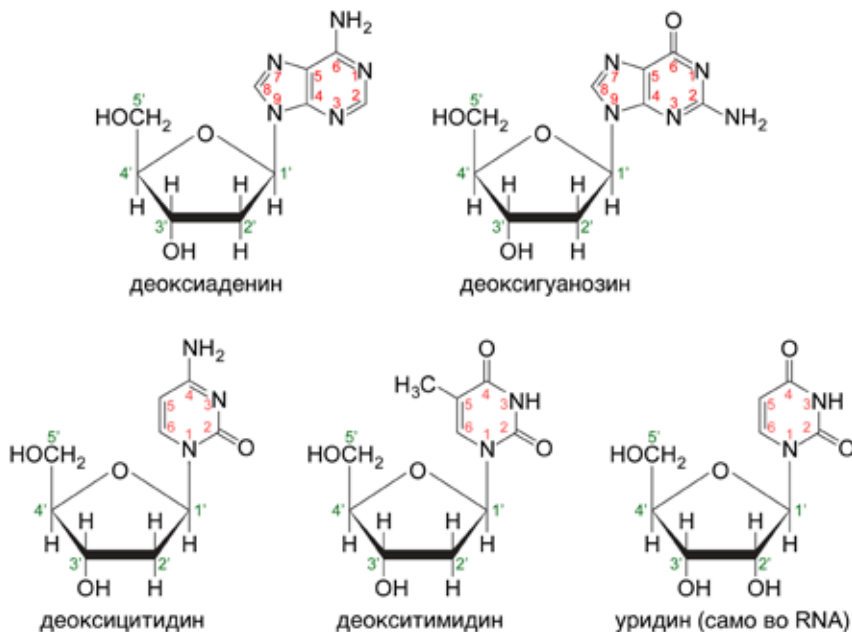
**Слика 5-2:** Структура на нуклеозидите и нуклеотидите во DNA и во RNA-молекулите. Заради разликување, атомите кои ги градат хетероцикличните прстени на азотните бази се нумерираат само со бројки, додека C-атомите во пентозните шеќери се нумерираат со бројки по кои се додава и знакот: ' (прим). Со сини симболи се означени негативните полнежи на фосфатната група на нуклеотидот.

Заради поголема прецизност, нуклеозидите и нуклеотидите во составот на DNA-молекулите можат да се означат како деоксирибонуклеозиди и деоксирибонуклеотиди, соодветно. Оттаму произлегува дека нуклеотидот е составен од нуклеозид и од фосфатна група. Како што се гледа од шемата, DNA и RNA-молекулите се разликуваат по шеќерната група која е 2'-деоксирибоза кај DNA, а рибоза (која има хидроксилна група на вториот C-атом) кај RNA-молекулите.

Секој рибонуклеотид кој влегува во структурата на RNA-молекулите, е составен од по три компоненти: **фосфатна група**, **пентозниот шеќер рибоза**, и една од четирите **азотни бази** (аденин, гуанин, цитозин и **урацил**), поврзани со ковалентни врски.

Деоксирибонуклеозидните форми на аденинот, гуанозинот, цитозинот и тиминот се наоѓаат само во составот на DNA, додека рибонуклеозидните форми на аденинот, гуанозинот, цитозинот и урацилот само во структурата на RNA-молекулите (слика 5-3).

Во нормални околности, во DNA-молекулите не се наоѓаат други азотни бази. Во некои RNA-молекули се наоѓаат и посебни азотни бази, за кои ќе стане збор понатаму во текстот. Според номенклатурата на нуклеотидите и соодветните азотни бази кои што влегуваат во составот на DNA, нуклеотидот граден од базата аденин се означува како 2'-деоксиаденозин 5'-монофосфат или, скратено, аденилат. Ознаките на преостанатите бази и нуклеотиди се прикажани на **табелата 5-1**.



**Слика 5-3:** Структура на нуклеозидите во составот нуклеинските киселини. Нумерирањето на атомите во азотните бази и на С-атомите во шеќерните молекули е исто како и на претходните слики.

Во научната литература, обично се користат само буквите **A**, **G**, **C** и **T** или **U** наместо целосните имиња на соодветните азотни бази и нуклеотиди.

Покрај тоа, често се користат кратенките за трифосфатните форми на деоксирибонуклеотидите (**dATP**, **dGTP**, **dCTP** и **dTTP**, како и за смесата од сите претходните четири: **dNTP**) и за трифосфатните форми на рибонуклеотидите (**ATP**, **GTP**, **CTP** и **UTP**, како и за смесата од сите претходните четири: **NTP**).

**Табела 5-1: Номенклатура на азотните бази и нивните соединенија во DNA и во RNA-молекулите**

тип:	база (кратенка):	нуклеозид:	нуклеотид:
<b>пурин</b>	аденин (A)	аденозин	аденилат
	гуанин (G)	гуанозин	гуанилат
<b>пиримидин</b>	цитозин (C)	цитидин	цитидилат
	тимин (T)	тимидин	тимидилат
	урацил (U)	уридин	уридилат

## 5.2 Првични истражувања на структурата на DNA

Уште пред постулирањето на моделот на структурата на DNA, резултатите од повеќе истражувања откриле податоци кои биле пресудни за расветлување на структурата на DNA-молекулите. Меѓу најважните се хемиските анализи во кои биле определени соодносите меѓу поединечните нуклеотиди во двоверижните DNA-молекули. Експериментите предводени од Едвин Чаргаф (Erwin Chargaff) и соработниците во доцните 1940-ти години ги испитувале емпириските соодноси на **моларните концентрации** на нуклеотидите. Со користење на методот на хартиена хроматографија, Чаргаф утврдил дека, независно од типот на DNA-молекулот (бактериски, растителен, анимален или човечки), постојат речиси идентични, математички прецизни, соодноси меѓу моларните концентрации на нуклеотидите (**табела 5-2**).

**Табела 5-2: Резултати од Чаргафовите експерименти**

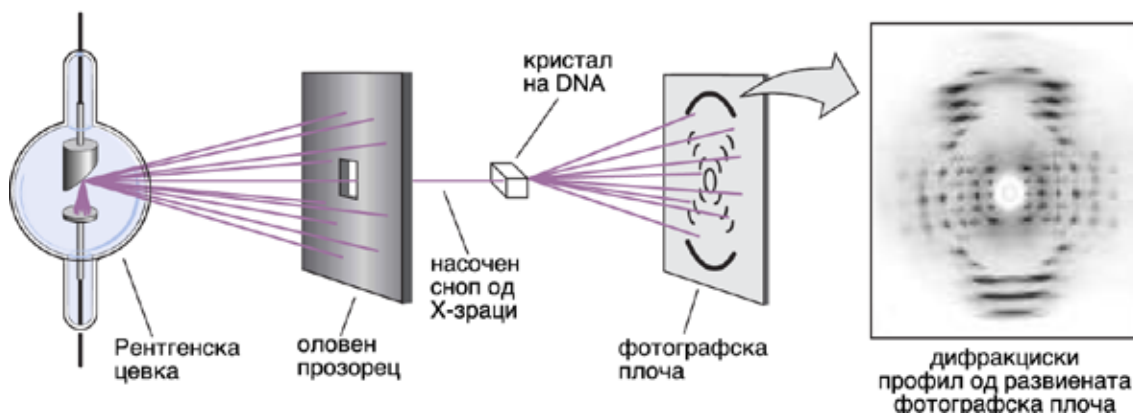
DNA-изолат од:	моларни концентрации				соодноси на моларните концентрации		
	A	T	G	C	A/T	G/C	A+G/T+C
<i>E. coli</i>	26,0	23,9	24,9	25,2	1,09	0,99	1,04
квасец	31,3	32,9	18,7	17,1	0,95	1,09	1,00
морски еж	32,8	32,9	18,7	17,1	0,95	1,09	1,00
стаорец	28,6	28,4	21,4	25,1	1,01	1,00	1,00
човек	30,3	30,3	19,5	19,9	1,00	0,98	0,99

Во чест на истражувачот, ваквите соодноси се нарекуваат и **Чаргафови правила** и, поедноставено, можат да се прикажат на следниов начин:

1. моларните количества на аденин и на тимин се еднакви:  $[A] = [T]$ ;
2. гуанин и на цитозин се еднакви:  $[G] = [C]$ ;
3. моларните количества на пуринските и на пиримидински бази се еднакви:  $[A] + [G] = [T] + [C]$ .

Во следнава експериментална студија која била клучна во расветлувањето на DNA-структурата, била користена техниката на дифракција на Рендген-зраци (т.н. Рендгенска дифракција). При оваа анализа, кристализираната DNA се бомбардира со сноп од Рендген (X)-зраци и расеаните зраци паѓаат на фотографски филм, при што се формираат карактеристични фигури (**слика 5-4**).

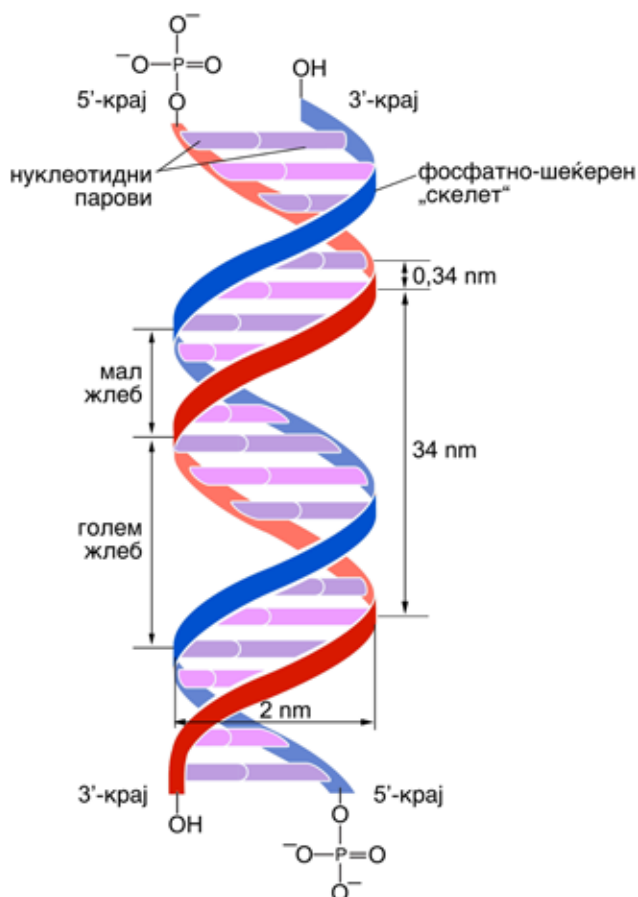
Обликот, големината и распоредот на дамките кои се формираат на фотографските плочи при дифракцијата зависат од просторниот распоред на атомите и атомските групи во кристалите на анализираните молекули. Во раните 1950-ти години, Франклин (Rosalind Franklin) и Вилкинс (Maurice Wilkins), вршејќи комплицирани математички пресметки од аглиите меѓу дамките на дифракциските слики, претпоставиле дека DNA-молекулот е долг, тенок и е составен од две паралелни нишки.



**Слика 5-4:** Принцип на Рендгенската дифракција на DNA-кристали.

Резултатите од натамошните анализи и пресметки дополнително сугерирале дека овој молекул има спирална (хеликална) структура.

### 5.3 Вотсон-Криков модел за структурата на DNA-молекулот



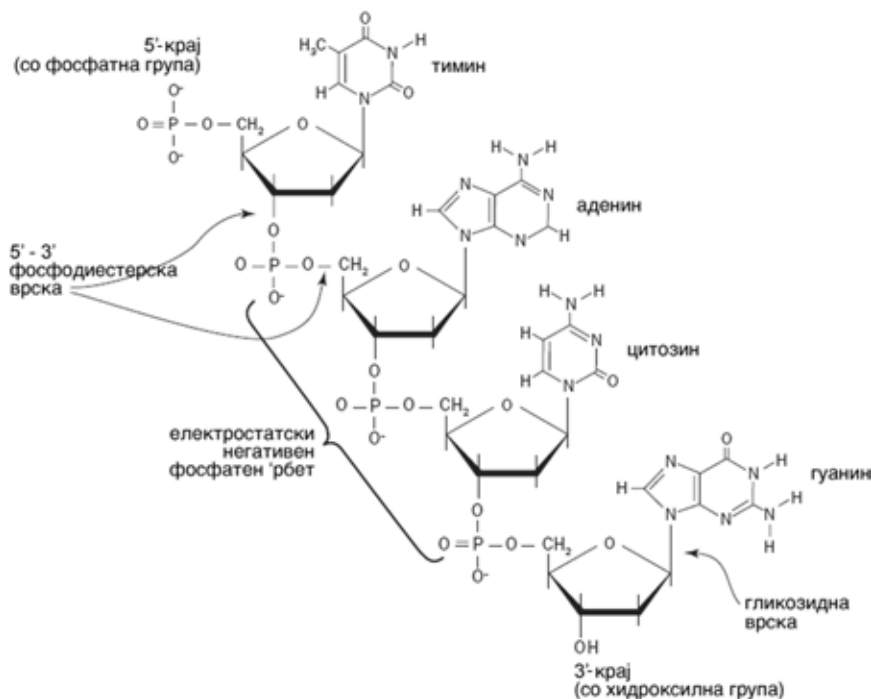
Според дотогашните хемиски податоци за составот на DNA-молекулите, особено според кристалографските резултати, како и Чаргафовите правила за спарување на базите, младите истражувачи Вотсон и Крик создале модел за структурата на DNA-молекулите, кој означил нова ера во биологијата и во природните науки, воопшто. Според нивниот модел, секој DNA-молекул е составен од **две полинуклеотидни вериги** кои се **меѓусебно двојно спирализирани (формираат**

**Слика 5-5:** Структурен модел на двојниот DNA-хеликс со поважните димензии. Прикажани се и двата краја од секоја полинуклеотидна верига, како и малиот и голем жлеб. Комплементарните парови нуклеотиди, поврзани со водородни врски, се прикажани само шематски, заради прегледност.

двоен хеликс) и се поврзани со водородни врски воспоставени меѓу комплементарните бази од двете вериги.

Денес е познато дека оваа стандардна (канонска) DNA-структура, која се означува и како „B“ форма на DNA, е составена од двоен хеликс во кој секоја верига целосно завртува во однос на оската (целосен завој) за 360 аголни степени и тоа со должина од 3,4 nm (34 Å) (слика 5-5). Растојанието меѓу базите по должината на секоја од веригите е 0,34 nm (3,4 Å), односно има просечно по 10,5 бази во секое целосно завртување од 360° (во однос на оска по должината на двојниот хеликс). Гледано од горниот кон долниот пол на моделот на двојниот хеликс, веригите „свртуваат“ кон десно, по аналогија на скалила кои при симнување надолу, свртуваат надесно. Дијаметарот на двојниот хеликс е 2 nm (20 Å).

Меѓу последователните бази од секоја полинуклеотидна верига постојат ковалентни фосфодиестерски врски (слика 5-6). Со нив се поврзани деоксирибозите и го создаваат фосфатно-шеќерниот „скелет“ на секоја верига од DNA-молекулот. Фосфатните групи предизвикуваат вкупниот електростатски полнеж на DNA-молекулите, при неутрална или алкална pH, да биде негативен. Секоја азотна база е поврзана со првиот C-атом (1') од деоксирибозата преку ковалентна N-гликозидна врска.

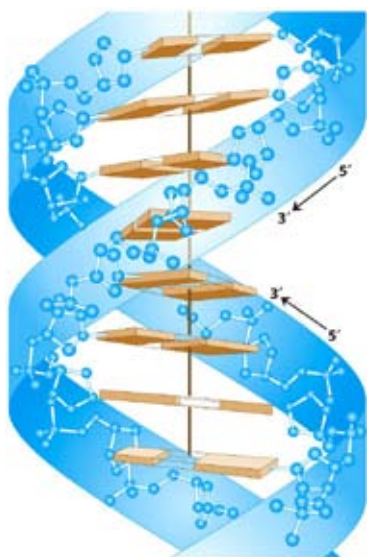


**Слика 5-6:** Ковалентни врски меѓу главните компонентивоедноверижниот DNA-молекул.

Поради тоа што спарените бази кај „B“ формата на DNA се планарни, поставени паралелно една на друга, и перпендикуларно (напречно) на оската по должината на двојниот хеликс, базите се „напластуваат“ една врз друга, создавајќи **хидрофобен простор** во „внатрешноста“ на двојниот хеликс (слика 5-7).

Гликозидните врски меѓу спарените бази не се поставени дијаметрално една спроти друга, па, кај B-формата на двоверижниот DNA-хеликс, спиралните простори





**Слика 5-7:** Напластување на планарните молекули на базите во централниот регион на двојниот DNA-хеликс

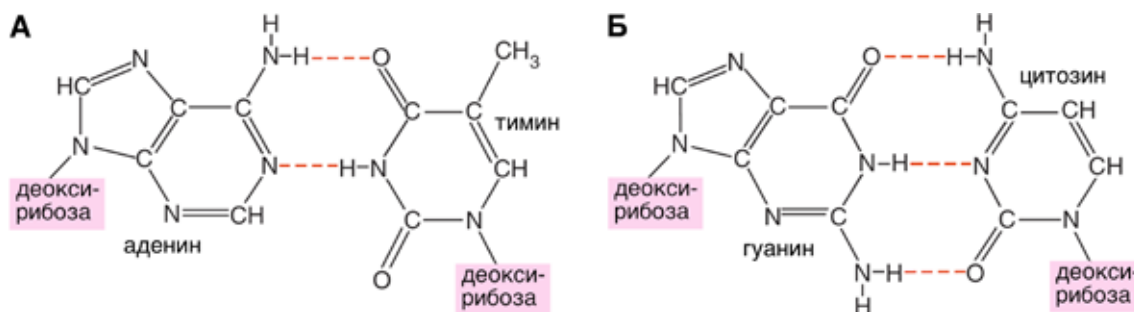
по должината на фосфосеќерниот скелет се разликуваат по својата дебелина и се означуваат како **голем** и **мал жлеб** (слика 5-5). Тие се важни при интеракцијата на протеините со DNA-молекулите.

Секоја од двете вериги во DNA-хеликсот има поларност (насоченост). Имено, на едниот крај од секоја верига се наоѓа фосфатна група на 5' C-атомот од деоксирибозата и се означува како **5'-крај**. На другиот крај од веригата е хидроксилната група на 3' C-атомот од деоксирибозата, па, е означен како **3'-крај**. Ваквата поларност е извонредно важна за активноста и ориентацијата на повеќето ензими кои делуваат врз DNA-молекулите.

Двете комплементарни вериги во двојниот DNA-хеликс се поставени **антипаралелно**, односно 5'-крајот од едната верига е спарен со 3'-крајот од комплементарната верига на двојниот DNA-хеликс. Едната од двете комплементарни вериги во двоверижниот DNA-молекул е со ориентација 5'→3', а другата верига е со спротивна насока: 3'→5'. Двете вериги се поврзани со водородни врски меѓу комплементарните нуклеотиди.

При спарувањето на комплементарните бази од двете вериги на DNA-хеликсот, водородните атоми од amino-групите служат како **донори** во водородната врска, додека карбонилните кислородни атоми (поврзани со C-атомите од прстените на базите) или азотните атоми (кои се во состав на прстените од базите) служат како **акцептори** на протоните во водородните врски.

Меѓу базата аденин од едната верига постои водородна врска со базата тимин од другата, комплементарна, верига. Ваквите врски постојат меѓу гуанин, од едната, и цитозин, од другата верига и обратно (слика 5-8).



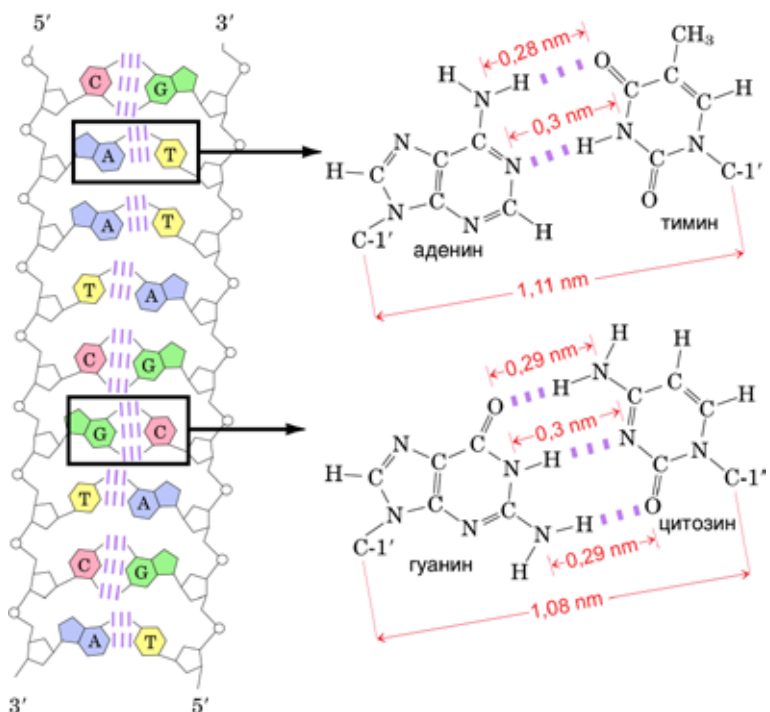
**Слика 5-8:** Вотсон-Криково спарување на комплементарните бази во DNA-хеликсот. А: парот аденин-тимин во кој постојат две водородни врски, и Б: парот гуанин-цитозин меѓу кои има три водородни врски (обележани со црвени испрекинати линии).

Ваквото воспоставување на водородни врски меѓу комплементарни бази се означува како **Вотсон-Криковото спарување**. Меѓу аденинот и тиминот (и обратно)



постојат **две** водородни врски, додека меѓу гуанинот и цитозинот (и обратно) има **три** водородни врски. Оттаму произлегува дека водородните врски се посилни кај G-C паровите, отколку кај A-T паровите, па, различна е и енергијата потребна за раздвојување на овие парови, што има значење за стабилноста и физичко-хемиските особини меѓу разни DNA-молекули. Вотсон-Криковиот модел ги објаснува и ги потврдува Чаргафовите правила за соодносот на моларните количества на базите во секој двоверижен DNA-молекул.

Важно е тоа што само при спарувањето на пурина и пиримидинска база



**Слика 5-9:** Рамномерни растојанија меѓу комплементарните бази во двојниот DNA-хеликс како резултат на рамномерните димензии на водородните врски.

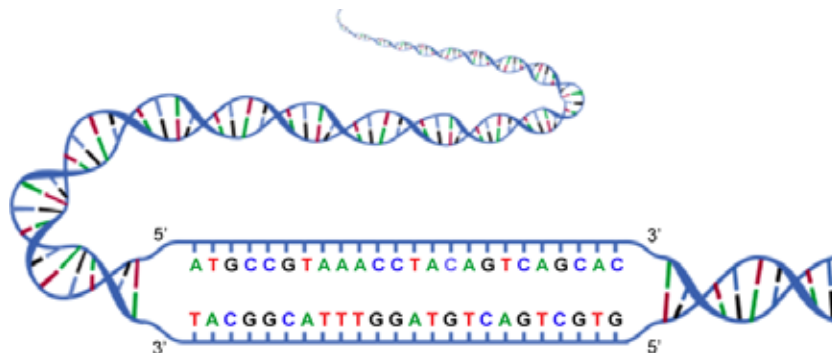
од двете комплементарни вериги на DNA-хеликсот се постигнува рамномерно растојание на водородните атоми од едната база и кислородните или азотните атоми од спротивно поставената база, што и овозможува создавање водородни врски (**слика 5-9**). Само комбинацијата од пурина и пиримидинска база дозволува запазување на вкупното растојание меѓу спарените бази, што е клучно за константниот дијаметар на двојниот DNA-хеликс.

**Примарната структура на нуклеинските киселини** е редоследот на базите по должината на една DNA или RNA-верига (од 5'→3' крајот) и се означува како **нуклеотидна секвенца** (**слика 5-10**).

Секвенцата може да се

спореди со читањето на буквите од некој мошне долг збор (текст без празни места). Теоретски постои можност од постоење на која било нуклеотидна секвенца во DNA-молекулот, како што и од буквите може да се напише неограничен број комбинации на зборови во текстот.

Изразот **секундарна структура на нуклеинските киселини** се однесува на воспоставувањето интермолекуларни и интрамолекуларни водородни врски. Кај DNA-молекулите, тоа се базните спарувања меѓу двете комплементарни вериги од двојниот хеликс. Кај RNA-молекулите кои се најчесто едноверижни, секундарните структури се создаваат со водородни врски меѓу комплементарните рибонуклеотиди од истата верига. **Терциерната структура на нуклеинските киселини** е тридимензионалната конформација на целиот молекул какви што се двојниот хеликс кај DNA и



Слика 5-10: Примарната структура на DNA-молекулот е линеарниот редослед на базите.

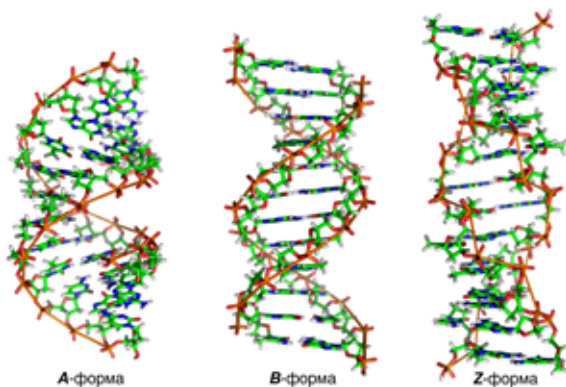
сложените тридимензионални форми на едноверижната RNA кои можат да се создаваат не само со водородни врски туку и со други слаби сили и интеракции.

DNA-молекулот е извонредно стабилна хемиска структура. Во дехидрирана форма, и во поволни услови, молекулите на DNA можат да опстанат непроменети во текот на илјадници години. Меѓу бројните примери, успешно се изолирани и анализирани DNA-фрагменти од мумија стара повеќе од 3000 години.

## 5.4 Главни форми на DNA

Потребно е да се има предвид дека опишаниот Вотсон-Криков модел на т.н. канонска (стандардна) B-форма на DNA, преставува просечна, идеализирана состојба. DNA-молекулите се **динамични структури** и, во зависност од условите и базниот состав, можат да создаваат и други, алтернативни, форми, при кои бројот на бази во едно полно завртување во DNA-хеликсот може да се менува.

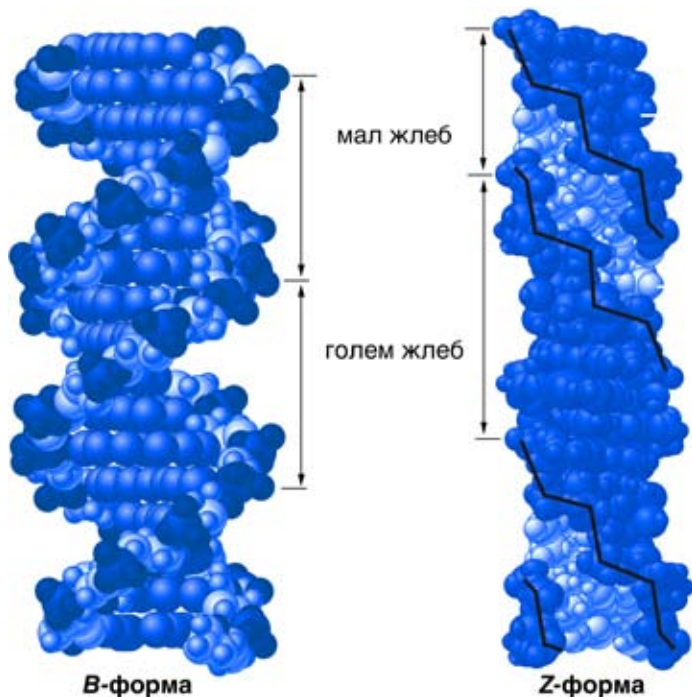
Меѓу поголемиот број на форми, особено проучена е **Z-формата на DNA**, кај која завртувањето е кон лево, наместо кон десно, има помал дијаметар и 12 бази во еден потполн свијок, со „цик-цак“ изглед. Опишана е и **A-формата на DNA** која, како и B-формата, завртува кон десно, но, има поголем дијаметар и незначително повеќе базни парови на секое целосно завртување (слика 5-11 и табела 5-3).



Слика 5-11: Споредба на A, B и Z формите на двојниот DNA-хеликс. Секој молекуларен модел е прикажан со по едно целосно завртување околу својата оска. Сликата е во јавен домен на интернет и е достапна на [www.wikimedia.org](http://www.wikimedia.org).

Табела 5-3: Структурни особини на трите главни форми на DNA			
карактеристика	A-DNA	B-DNA	Z-DNA
дијаметар на двојниот хеликс (nm)	2,3	2,0	1,8
број на базни парови во едно целосно завртување	11,0	10,5	12
должина на едно целосно завртување (nm)	2,5	3,4	4,5
свртување на хеликсот од горе кон надолу	десно	десно	лево
лабораториски услови под кои се создава	ниска влажност ( $\approx 75\%$ ), висока конц. на соли	висока влажност ( $\approx 95\%$ ), ниска конц. на соли	$MgCl_2 > 3 M$ , NaCl, етанол, метилирани цитозини, висока влажност, ниска конц. на соли

Во литературата најчесто се споредуваат *B*- и *A*-формите на DNA-хеликсот при што најочигледна е разликата во насоката на завртувањето, но, и на должините на големиот и на малиот жлеб (**слика 5-12**).



**Слика 5-12:** Споредба на должините на големиот и на малиот жлеб, како и ориентацијата на двојниот хеликс меѓу *B*- и *A*-формите на DNA.

## 5.5 Алтернативни форми на DNA

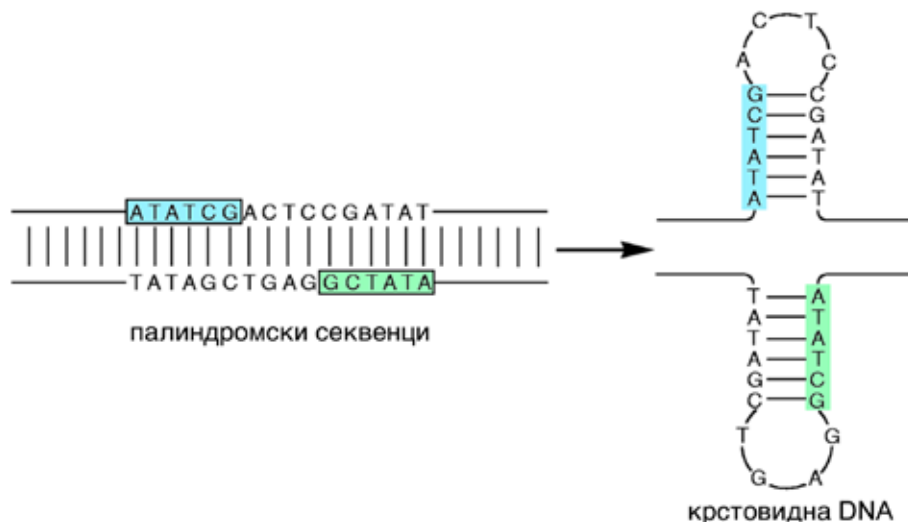
Освен трите наведени форми на DNA, во определени региони каде постои специфичен редослед на нуклеотидите можат да се создадат карактеристични структури каква што е крстовидната DNA, како и триплекс и квадриплекс DNA.

Причината за нивната појава е постоењето на т.н. **палиндром** во DNA-молекулот. Тоа се инвертирани секвенци кои идентично се „читаат“ од 5'- кон 3'-насока на едната и на комплементарната верига.

На пример: 5'-**ATATCG**ACTCCGATAT-3'  
 |||||  
 3'-ATATCGTGAG**GCTATA**-5'

Од дидактички причини, DNA-палиндромите можат сликовито да се споредат со соодветните филолошки примери на зборови во јазикот кои еднакво се читаат и од левата и (наопаку), од десната страна на зборот. Такви се, на пример, зборовите: калабалак, ротор и мадам. Прецизното значење на палиндромите во геномите не е доволно јасно. Сепак, од голема практична важност е што овие секвенци ги препознаваат посебна класа бактериски ензими означени како рестрикциски ендонуклеази кои екстензивно се користат при лабораториските анализи и постапки, што е објаснето во главата 21: Генетски инженеринг.

Интересно е што токму меѓу палиндромските секвенци со водородни врски можат да се создадат интрамолекуларни јамки во форма на крст (**слика 5-13**). Улогата на **крстовидните DNA-структури** не е јасна, но, се претпоставува дека може да е поврзана со функцијата на протеините кои се врзуваат со DNA.



**Слика 5-13:** Создавање на крстовидна DNA во регионите каде што се наоѓаат палиндромни секвенци. Самокомплементарноста на спротивните палиндроми може да предизвика прераспределба на двоверижниот хеликс и создавање на две јамки во форма на крст.

Во определени DNA-региони постојат поголем број пурински бази едно по друго во едната верига, а поголем број пиримидински бази во комплементарната верига. Оттаму, во овие региони, веригите се нарекуваат: полипуринска и полипиримидинска, соодветно. Во такви региони, при определени услови (каква што е ниската pH, на пример), можат да се создаде **триверижна DNA-структура** која во литературата се означува и како **триплекс-DNA** или **H-DNA** (слика 5-14).

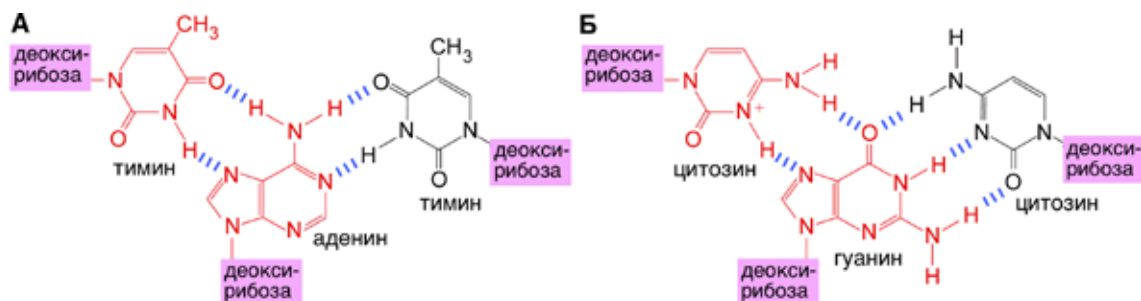
Тоа се должи на нестандартното спарување на комплементарните бази. Имено, покрај вообичаеното Вотсон-Криково спарување на аденин-тимин и гуанин-цитозин



паровите на нуклеотиди меѓу комплементарните вериги во DNA-хеликсот, многу поретко се јавува и нестандартно поврзување на нуклеотидите. Според истражувачот Карст Хогстен (Karst Hoogsteen) кој првпат го претпоставил, се нарекува и **Хогстеново спарување**. Се одвива преку водородни врски кои се воспоставуваат меѓу протонираниот азотен атом ( $N^3$ ) од пиримидинската база и  $N^7$  или amino-групата од  $N^6$  атомот од пуринската база (слика 5-15).

**Слика 5-14:** Невообичаена структура на триплекс-DNA настаната со Хогстеновото спарување.

Во DNA-регионите каде едно по друго се повторува многу голем број на гуанозински остатоци може да се појават и невообичаени, но, доста стабилни четриверижни структури (по аналогија означени како **квадриплекс** или **G-тетраплекс DNA**). Се претпоставува дека три- и четриверижните DNA-структури можат да имаат важна улога во регулацијата на генската експресија.



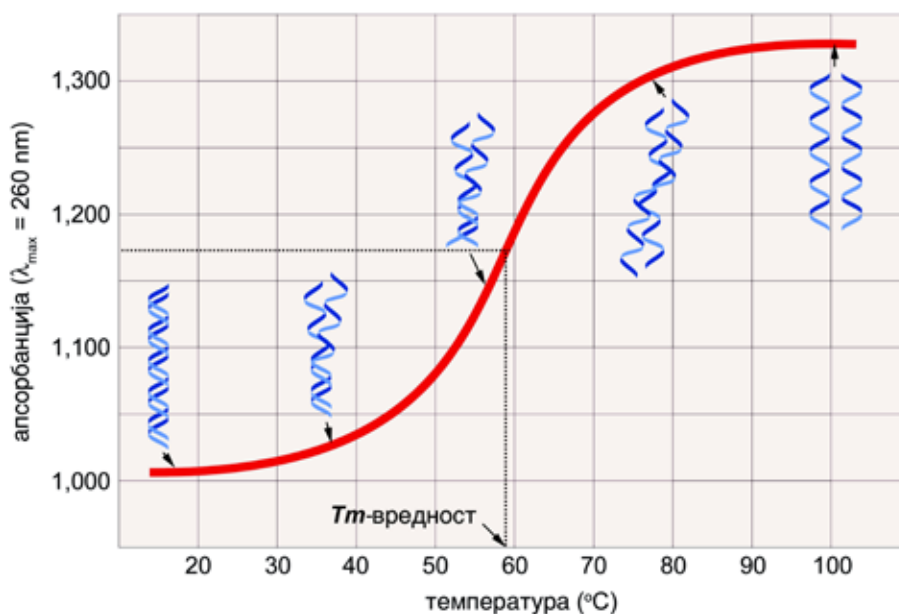
**Слика 5-15:** Шематски приказ на нестандартното (Хогстеново) спарување меѓу три нуклеотиди. **А:** Хогстеново поврзување на протониран тимин со стандардниот пар аденин-тимин, и **Б:** на цитозин со парот гуанин-цитозин.

## 5.6 Денатурација и ренатурација на DNA-молекулите

Како што е веќе појаснето, двете комплементарни полинуклеотидни DNA-вериги се поврзани меѓусебно со нековалентни водородни врски. Овие хемиски врски се доволни за одржување на интегритетот на двоверижниот DNA-хеликс, но, можат и релативно лесно да се раскинат. Покрај ензимските и други процеси со кои тоа се постигнува во *in vivo* услови (во живите клетки), раздвојувањето на двете вериги од двојниот хеликс може лесно и реверзибилно да се направи и во лабораториски услови (*in vitro*).

Процесот со кој двете комплементарни вериги се раздвојуваат преку раскинување на водородните врски се означува како **денатурација** и може едноставно да се постигне со загревање на растворот со DNA. Термичката енергија која се доведува при загревањето едноставно ги прекинува водородните врски, но, не ги оштетува ковалентните фосфодиестерски, гликозидни и преостанатите врски меѓу хемиските конституенти на DNA-молекулот.

Процесот на денатурација е придружен со промена во физичко-хемиските особини на DNA, каква што е апсорпцијата на ултравиолетова (UV) светлина. Имено, апсорбанцата на денатурираната, едноверижна DNA е повисока од таа на нативната, двоверижна DNA при бранова должина од 260 nm. По аналогија на порастот

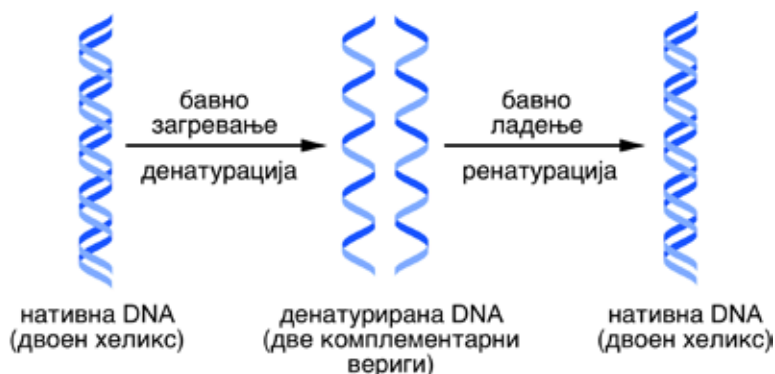


**Слика 5-16:** Зголемување на апсорбанцијата на UV-светлината при 260 nm (т.н. хиперхромен ефект) при загревање на раствор со двоверижна DNA. Покрај кривата, шематски е прикажано и постепено раздвојување на двоверижниот DNA хеликс. Видливо е дека, по целосната денатурација, нема натамошен раст на апсорбанцијата. Прикажаната крива е идеализирана, а реалните вредности варираат во зависност од должината и од секвенцата на DNA-молекулот, како и од други фактори (pH-вредноста и составот на растворот итн.).



на апсорпцијата кај обоените раствори, овој феномен се нарекува **хиперхромизам**. Температурната вредност при која половина од DNA-молекулите се во форма на двоен хеликс, а половина во едноверижна форма се означува како **точка на денатурација**, која по аналогија на кратенката која се користи во хемијата, се означува со ***T<sub>m</sub>*** (слика 5-16).

Доколку по топлотната денатурација, растворот се остави бавно да се излади до собна температура, водородните врски меѓу комплементарните бази од двете DNA-вериги повторно ќе се воспостават, што се означува како **ренатурација** (слика 5-17).



**Слика 5-17:** Топлотна денатурација на двоверижен DNA-молекул и негова ренатурација.

Процесот на ренатурација се одвива низ две фази. Првата е побавна и во текот на неа двете едноверижни DNA-молекули се „опипуваат“, при што на моменти се воспоставуваат куси сегменти на водородни врски меѓу комплементарните бази. Следи втората фаза која е многу побрза при која брзо се формираат водородните врски и меѓу преостанатите бази од спротивните вериги. Спојувањето на две независни, едноверижни, но, комплементарни DNA-молекули, преку воспоставување на водородни врски меѓу базите, во согласност со Вотсон-Криковите правила за спарување, се нарекува **анилирање** или **хибридизација**.

Во натамошниот текст, со изразот DNA-молекул ќе се опфаќа и двоверижната DNA (составена од две комплементарни, антипаралелни и двојноспирализирани вериги), како и едноверижната DNA. Во литературата, изразот анилирање, обично се користи за спарувањето на перфектно комплементарните DNA-вериги, додека со хибридизација се означува воспоставувањето на водородни врски меѓу две нецелосно комплементарни DNA-вериги. Сепак, треба да се има предвид дека ваквото разграничување на значењето на двата изрази не е општо прифатено, па, понекаде се користат како синоними.

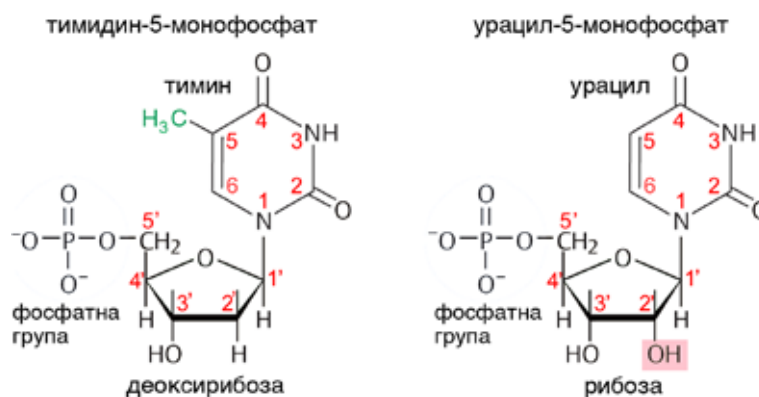
Принципите на денатурација, ренатурација и т.н. хибридизација на комплементарните DNA-молекули е основа на исклучително важни техники кои се користат во молекуларната биологија и кои се опишани во методолошкиот дел.



## 5.7 Структура на RNA-молекулите

Молекулите на RNA се полинуклеотидни вериги градени од четири основни типа рибонуклеотиди кои се линеарно поврзани со фосфодиестерски врски. Меѓу RNA и DNA-молекулите постојат повеќе структурни и функционални сличности, но, има и важни разлики. За разлика од DNA, кај RNA-молекулите се наоѓа шеќерот **рибоза** (алдопентоза која има хидроксилна група на вториот C-атом). Токму присуството на оваа хидроксилна група, предизвикува RNA-молекулите да се далеку понестабилни и почувствителни кон хемиски и физички агенси во споредба со DNA. Покрај тоа, наместо базата тимин се наоѓа **урацил (U)**, кој како и тиминот, се спарува со базата аденин (слика 5-18).

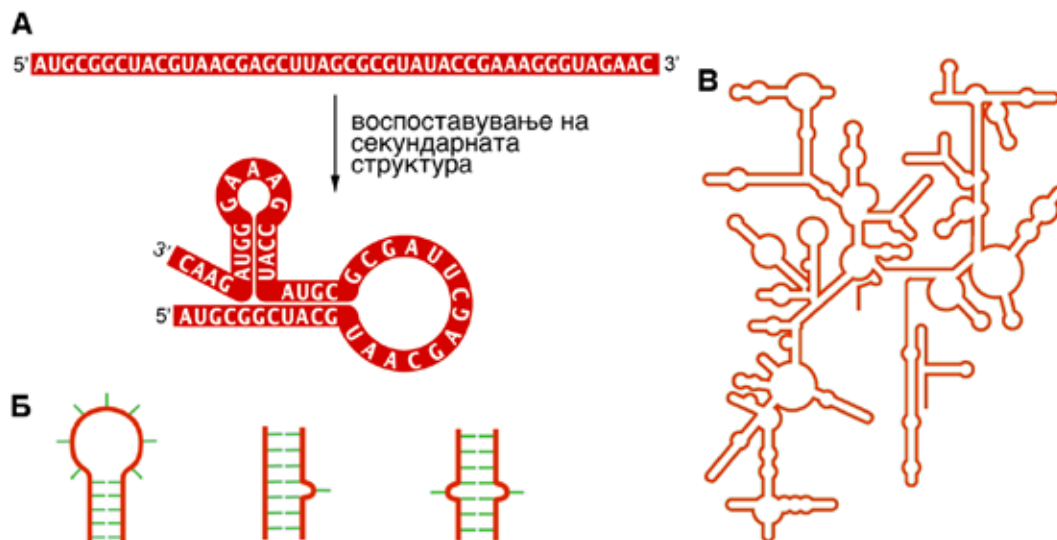
**Слика 5-18:** Разлики во нуклеотидите меѓу DNA и RNA-молекулите. Рибозата има хидроксилна група на вториот C-атом од цикличниот прстен. Базата урацил се разликува од тиминот само по отсуство на метил-групата на позицијата C-5.



Слично како што при DNA-репликацијата се врши синтеза на нови комплементарни DNA вериги, така при процесот на транскрипција се синтетизира RNA од DNA-урнек. Редоследот (секвенцата) на RNA-веригата која ензимски се синтетизира се определува по принципот на комплементарноста на базите со тие на според урнек DNA-веригата. Некои протеини можат да препознаат точно определени секвенци во DNA и во RNA-молекулите и нековалентно да се врзат за нив, што има влијание врз експресијата на гените и врз други процеси.

Но, RNA-молекулите имаат и неколку други важни разлики во однос на DNA-молекулите. Наспроти двоверижниот DNA-хеликс, молекулите на RNA се вообичаено **едноверижни**. Поради тоа се и пофлексибилни и многу често спонтано создаваат интрамолекуларни водородни врски меѓу комплементарните бази во истата верига (слика 5-19, А). Поради тоа можат да заземат далеку поголем број секундарни и терциерни структури (слика 5-19, Б). Имено, со комбинирање на повеќе секундарни структури се создаваат комплексни тридимензионални молекуларни форми кои се мошне карактеристични и важни за функцијата на некои RNA-молекули, какви што се рибозомските, на пример (слика 5-19, В).

Некои RNA-молекули можат да имаат и каталитична активност. Од тие причини, RNA-молекулите се функционално повеќе слични на протеините, отколку на DNA, а сложените структури кои можат да ги создадат се клучни за нивните клеточни функции.



**Слика 5-19:** Секундарни структури во RNA-молекулите. **A:** воспоставување на секундарна структура од линеарниот RNA-молекул (здиплување на RNA). **Б:** неколку примери за едноставни секундарни структури со водородните врски меѓу комплементарните бази. Прикажани се структурата во вид на шнола, како и двоверижен регион со едноверижно и со двоверижно спарување. **В:** пример за комплексни комбинации на повеќе секундарни структури кај 16S рибозомската RNA. На оваа шема не се прикажани водородните врски.

Споредбата на поважните карактеристики на DNA и на RNA-молекулите е прикажана во **табелата 5-4**.

Табела 5-4: Основни карактеристики на DNA и на RNA-молекулите		
полинуклеотидна верига	DNA	RNA
тип на субединици	нуклеотиди	рибонуклеотиди
шеќерна група во нуклеотидот	деоксирибоза	рибоза
присуство на 2'-ОН група на шеќерот	нема	има
азотни бази во нуклеотидите	A, T, G и C	A, U, G и C
број на вериги во молекулот	речиси секогаш е <b>двоверижна</b>	речиси секогаш е <b>едноверижна</b>
интрамолекуларни водородни врски	ретки исклучоци	речиси секогаш
секундарни структури	двоен хеликс	голем број можни тридимензионални структури
стабилност	релативно многу стабилна	исклучително нестабилна
каталитична активност	нема	кај некои ( <b>рибозими</b> )

## 5.8 Класификација на RNA-молекулите според функцијата

Транскрипцијата е процес на синтеза на RNA според урнек на една од веригите од двојниот DNA-хеликс, па, и синтетизираните RNA-молекули воопштено се нарекуваат **RNA-транскрипти**. RNA-молекули кои можат да се групираат во две основни класи: **информациски** и **функционални RNA-молекули**, кои понатаму се класифицирани на следниот начин:

- **Информациските RNA-молекули-гласници (mRNA)** од англ. *messenger RNA*), ги пренесуваат информациите од гените во DNA-молекулите, до протеините кои се кодирани од соодветните гени. Во литературата, оваа класа молекули се нарекува и кодирачка RNA. За секој протеински ген во еукариотските клетки, доколку се експримира, постои специфичен тип на mRNA-молекули. Од тоа произлегува дека теоретски, кај цицачите има повеќе десетици илјади различни типови на mRNA-молекули.
- **Функционалните RNA-молекули** не се преведуваат во протеини, па, се нарекуваат и **некодирачки (ncRNA)**. Тие и самите имаат крајна улога во определени процеси или пак имаат каталитична активност. Тие ги опфаќаат следниве подкласи:
  - **рибозомските RNA-молекули (rRNA)**, се главни компоненти на рибозомите, органели во кои се врши синтезата на протеините по урнек на mRNA и со аминокиселините транспортирани со tRNA-молекулите;
  - **транспортните (трансфер) RNA-молекули (tRNA)**, се задолжени за доведувањето на соодветната аминокиселина до рибозомите, каде по урнек на mRNA-молекулите, се врши транслацијата;
  - **рибозимите** се функционални RNA-молекули кои, како и ензимите, имаат каталитична активност врз строго специфични супстрати. До пред 20-тина години се мислеше дека сите ензими се протеини по својата природа, но, откривањето на рибозомите ја прекршува таа „догма“. Иако истражувањата во врска со рибозимите се во рана фаза, нивното откривање го револуционизира современиот поглед врз ензимологијата и, воопшто, врз еволуциските корени на животот. Се шпекулира дека рибозимите се реликти од праисторискиот, пребиотички „RNA свет“ кој постоел уште пред појавата на протеините и DNA-молекулите.

Рибозомските и транспортните RNA-молекули како и рибозимите се наоѓаат и кај прокариотите и кај еукариотите. Следниве посебни подкласи на функционални RNA-молекули се наоѓаат само кај еукариотите:

- **малите јадрени RNA-молекули (snRNA)**, од англ. *small nuclear RNAs*), се дел од системот за процесирање на RNA-транскриптите кај еукариотските клетки. Некои snRNA-молекули го насочуваат процесот на модифицирање на rRNA-молекули, а други се здружуваат заедно со протеински субединици со што создаваат рибонуклеопротеински комплекси кои вршат преспојување на незрелите mRNA-молекули, што ќе биде поопширно објаснето понатаму;
- **регулаторните RNA-молекули**, исто така, не се кодирачки, туку се вклучени во регулацијата на активноста (експресијата) на протеин-кодирачките гени. Оваа улога на RNA-молекулите е неодамна откриена и, по сè изгледа, ќе доведе до поинакво гледање на функционалноста на целокупниот геном кај вишите еукариотски клетки, воопшто. Имено, последниве десетина години се откриени

повеќе типови регулаторни RNA-молекули, какви што се: **микро-RNA (miRNA)**, **малите нуклеоларни RNA (snoRNA**, од англ. *small nucleolar RNAs*) и други. При определени услови и промени во клетката, овие регулаторни RNA-молекули можат значително да влијаат врз интензитетот на транскрипцијата на некои гени, а со тоа ја менуваат и нивната експресија.

Заради прегледност, основните карактеристики на RNA-молекулите и нивната функција се прикажани во **табелата 5-5**.

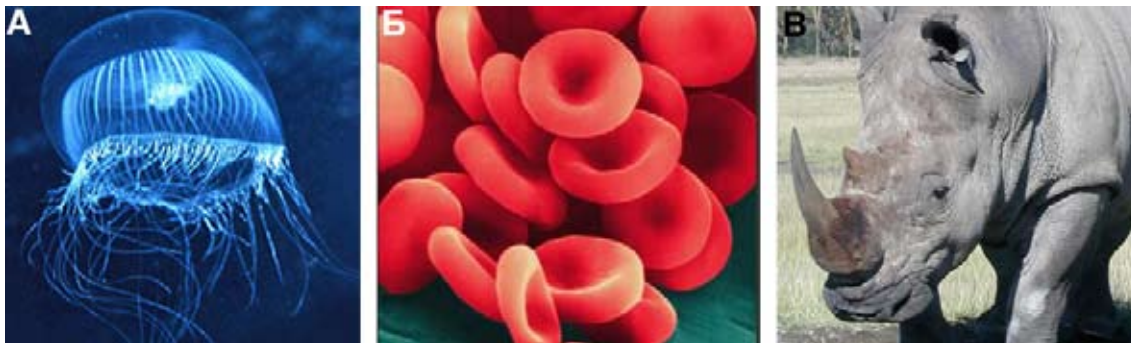
<b>Табела 5-5: Класификација на RNA-молекулите според нивната функција</b>			
<b>RNA-молекули</b>	<b>присуство</b>	<b>супклеточна локализација*</b>	<b>функција</b>
<b>информациска (mRNA)</b>	прокариоти и еукариоти	јадро и цитоплазма	пренесување на информациите за синтеза на протеините од гените во DNA-молекулите, до рибозомите
<b>рибозомска (rRNA)</b>	прокариоти и еукариоти	цитоплазма	структурна и функционална компонента на рибозомите
<b>транспортна (tRNA)</b>	прокариоти и еукариоти	цитоплазма	пренесување на аминокиселините до рибозомите при синтеза на протеините
<b>рибозими</b>	прокариоти и еукариоти	јадро и цитоплазма	каталитични RNA-молекули
<b>мали јадрени (snRNA)</b>	еукариоти	јадро	процесирање на еукариотските незрели mRNA-транскрипти
<b>мали нуклеоларни (snoRNA)</b>	еукариоти	јадро	процесирање на еукариотските rRNA-молекули
<b>микро-RNA (miRNA)</b>	еукариоти	јадро и цитоплазма	улога во регулација на генската експресија кај вишите еукариоти

\* ова појаснување се однесува само на еукариотите. Кај нив, транскрипцијата на сите RNA-молекули, освен од митохондрискиот и од хлоропластниот геном, се одвива во јадрото

# ПРОТЕИНИ

## Глава 6

**П**ротеините (од старогрчки: *πρότος*, што означува прв) се впечатливи по тоа што се молекули со највисока функционална разновидност и се присутни во најголемо изобилство кај сите живи организми (**слика 6-1**). Речиси целиот живот на Планетава зависи од протеините: ензимите и полипептидните хормони се извршители и регулатори на метаболичните процеси, додека контрактилните протеини во мускулните клетки го овозможуваат движењето. Колагенот во коските формира структурна мрежа во која се депонираат кристали на калциум фосфат, што делува слично на челичните шипки во армираниот бетон. Хемоглобинот и плазмините албумини во крвта имаат транспортна функција, додека имуноглобулините се едни од основните компоненти на имуниот одговор.



**Слика 6-1:** Екстремна разноликост на функциите на протеинските молекули во живиот свет. **А:** Светлината која ја емитува медузата *Aequorea victoria* со помош на биолуминисцентниот протеин екворин и зелениот флуоресцентен протеин (GFP). **Б:** Еритроцитите кај цицачите содржат големи количества на протеинот хемоглобин кој го транспортира кислородот од белите дробови до ткивата. **В:** Кај сите вертебрати е присутен протеинот кератин кој е главна компонента на косата, роговите, волната, ноктите, крлушките и пердувите. Структурата на кератинот е најцврста во рогот на носорогот.

Иако се екстремно разнообразни во функциите, протеините имаат една зачудувачки слична особина: сите се неразгранети линеарни полимери составени од 20 типа аминокиселини кои нанижани во низа и поврзани една со друга со пептидни врски.

## 6.1 Аминокиселини

Со помош на ензими, протеините можат и да се разградат (хидролизираат), при што се ослободуваат аминокиселините од кои се градени. Во составот на најголем број протеини учествуваат дваесет аминокиселини. Често пати аминокиселините се означуваат во скусена форма: со три или со една латинска буква. На пример, за метионин се користи кратенката М или Met. Интересно е дека уште во 1806 година била откриена првата аминокиселина: аспарагин, и тоа при анализа на аспарагус, по што и го добила името.

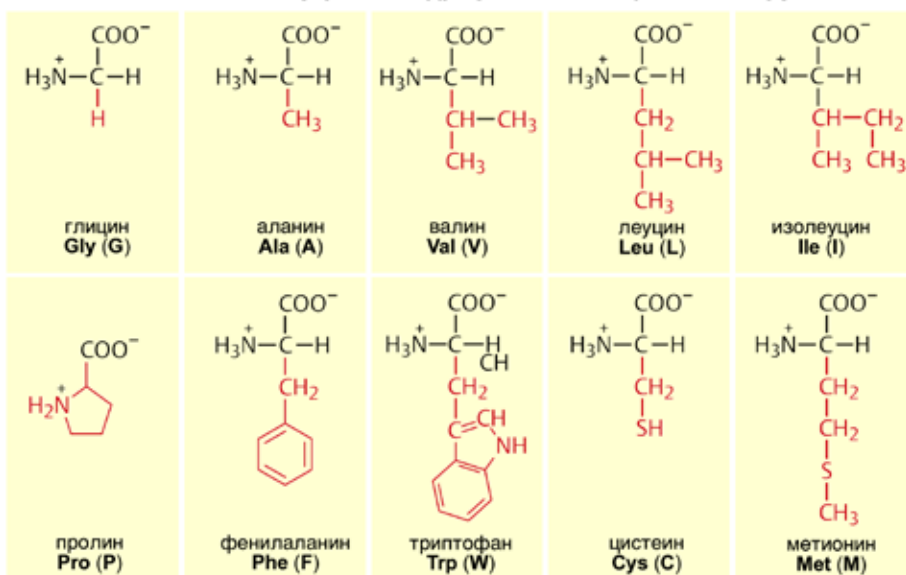
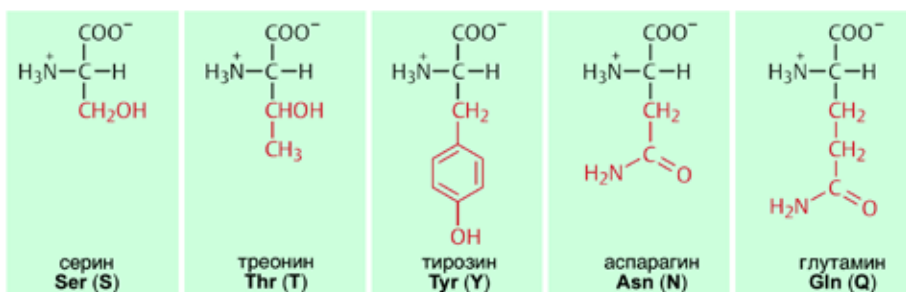
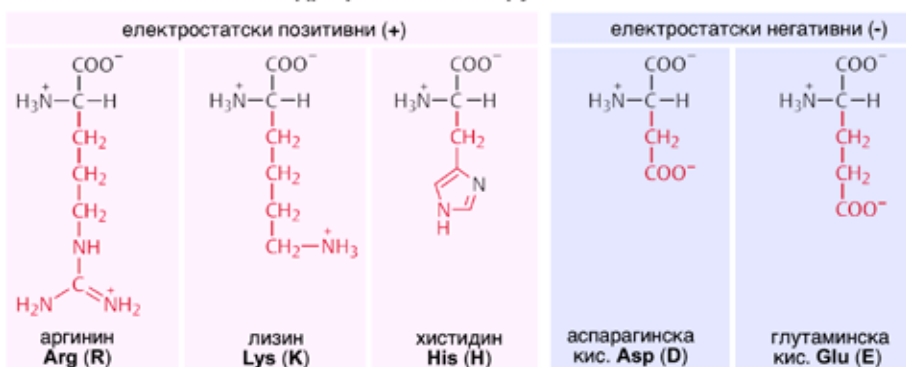
Сите аминокиселини, освен пролинот (кој е цикличен), имаат по еден централен јаглероден атом ( $C_{\alpha}$ ) поврзан со четири различни хемиски групи: со аминокиселинната ( $-NH_2$ ) групата, со карбоксилната ( $-COOH$ ) група, со водороден ( $H$ ) атом, и со една бочна ( $R$ ) група која се разликува меѓу аминокиселините и ги определуваат нивните различни физичко-хемиски особини. За повеќето клетки, при физиолошка рН (приближно неутрална), карбоксилните групи од аминокиселините се дисоцирани создавајќи карбоксилатен анион ( $-COO^-$ ), додека аминокиселините се протонирани ( $-NH_3^+$ ). Ваквата диполарна форма, кога вкупниот електростатски полнеж на аминокиселината е неутрален, во литературата се нарекува и цвистерјон (од германски: *zwitterion* - двоен јон).

Поради тоа што  $\alpha$ -јаглеродниот атом кај сите аминокиселини (освен кај глицинот) е хирален (во литературата се сретнува и изразот асиметричен), аминокиселините можат да бидат или десно-(D) или лево-(L) стереоизомери. Со ретки исклучоци, протеините се градени само од L-изомерите на аминокиселини.

Од бочните групи зависи структурата, големината и електростатскиот полнеж на секоја аминокиселина, хидрофилноста или хидрофобноста, нејзината реактивност во вода. Една од класификациите на аминокиселините е заснована на растворливост во вода (хидрофилност наспроти хидрофобноста) (слика 6-2).

Аминокиселините со поларни бочни групи се хидрофилни и често се наоѓаат на површината од протеинските молекули. Поради тоа и самите вакви протеини се растворливи во водени раствори, а овозможено им е и да создаваат нековалентни врски со други молекули растворливи во вода. Спротивно, аминокиселините со неполарни бочни групи се хидрофобни (ја избегнуваат водата) и често се наоѓаат во внатрешниот дел од протеинските молекули. Од овие причини, растворливоста на аминокиселинските остатоци има влијание врз крајната тридимензионална форма на протеините.



**А. Аминокиселини со неутрални хидрофобни неполарни бочни групи:**

**Б. Аминокиселини со неутрални хидрофилни поларни бочни групи:**

**В. Аминокиселини со хидрофилни бочни групи со полнеж:**


**Слика 6-2:** Класификација на дваесетте аминокиселини од кои се градени протеините според главните физичко-хемиски својства на бочните групи (нацртани со црвена боја). Во загради се обележани ознаките (со три букви и со една буква) кои често се користат наместо целосните имињата на аминокиселините.



Некои хидрофилни аминокиселини се јонизирани во воден раствор (во физиолошки услови вообичаено при  $\text{pH} \approx 7$ ) и со тоа имаат електростатски полнеж. **Аргининот** и **лизинот** имаат позитивен полнеж, додека **аспарагинската** и **глутаминската киселина** (се означуваат како аспартат и глутамат во јонизирана форма) се со негативен електростатски полнеж. Овие четири аминокиселини имаат најголем удел во вкупниот полнеж на целиот протеински молекул во чија градба учествуваат. **Хистидинот** е хидрофилна аминокиселина со имидазолан прстен, во кој азотниот атом, во зависност од киселоста на растворот, може да има позитивен или неутрален електростатски полнеж.

Бочните групи на **аспарагинот** и **глутаминот** немаат електростатски полнеж, поларни се и содржат амидни групи кои се склони да воспоставуваат водородни врски со други аминокиселински остатоци од истиот или од друг протеински молекул. Со нешто помал потенцијал за создавање водородни врски се и **серинот** и **треонинот**, кои имаат хидрофилни и поларни бочни групи.

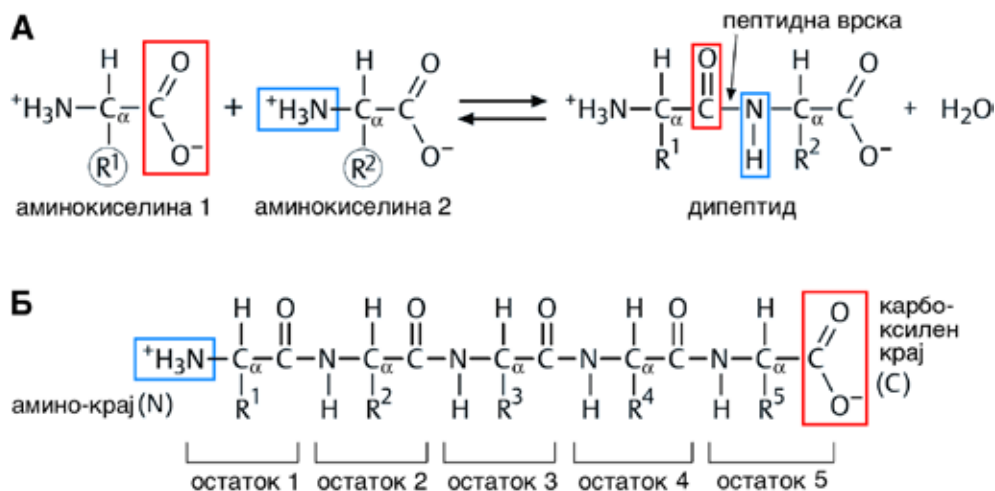
Бочните групи на хидрофобните аминокиселини се нерастворливи или минимално растворливи во вода. Нецикличните бочни групи на **аланинот**, **валинот**, **леуцинот**, **изолеуцинот** и **метионинот** се неполарни и имаат исклучиво јаглеродороден состав, освен метионинот кој има и еден сулфурен атом. **Фенилаланинот**, **тирозинот** и **триптофанот** поседуваат ароматични бочни групи.

Просторно најмалата аминокиселина е **глицинот** кој има само водороден атом наместо бочна група. Со тоа учествува во градбата на оние региони од протеинските молекули во кои тесниот простор не дозволува присуство на поволуминозни аминокиселински остатоци. Различна од сите преостанати аминокиселини е **пролинот**, која содржи **имино-**група ( $\text{NH}_2^+$ ) како бочна група која создава прстен, ковалентно врзувајќи се азотот поврзан со  $\text{C}_\alpha$ -атомот. Тоа предизвикува пролинот да биде ригиден и да создава фиксни агли во полипептидните вериги, со што во тие региони ги ограничува тродимензионалните структури на протеините. Бочната група на **цистеинот** содржи сулфхидрилна ( $-\text{SH}$ ) група која може со оксидација да формира ковалентни врски со друг цистеински остаток, што ќе биде подолу објаснето.

## 6.2 Пептидни врски

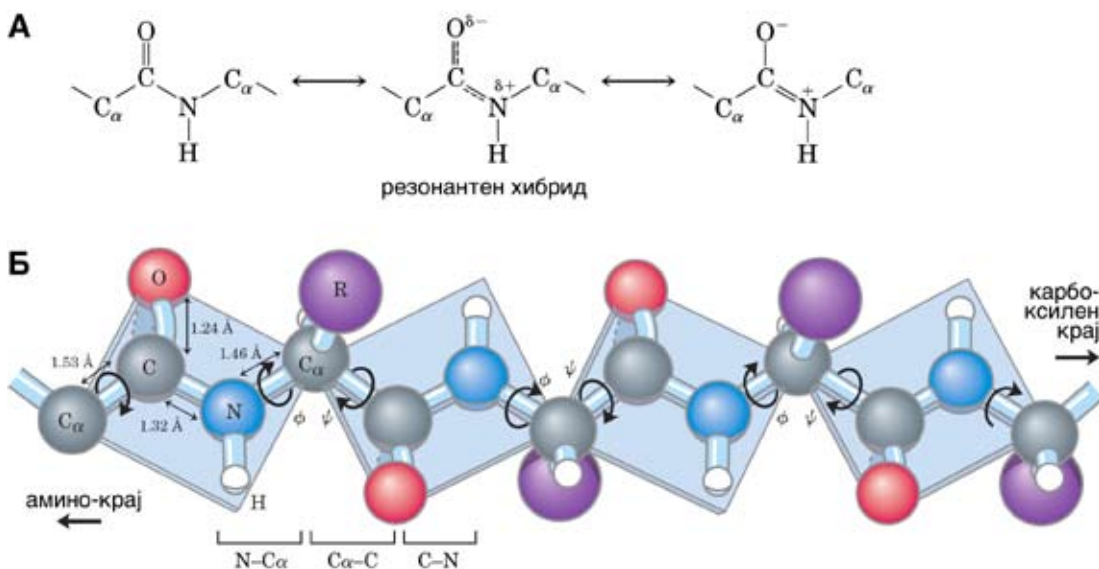
Во пептидите и протеините, линеарното поврзување на секои две соседни аминокиселини се остварува преку реакција на полимеризација при што карбоксилната група од едната аминокиселина воспоставува ковалентна пептидна врска со амино-групата од втората аминокиселина, при што се ослободува еден молекул на вода (**слика 6-3, А**). Повторувањата на азотниот атом од амидната група,  $\alpha$ -јаглеродниот атом и С-атомот од карбонилната група од секој аминокиселински остаток го создаваат т.н. **рбет** на полипептидниот молекул, од кој се простираат бочните (R) групи (**слика 6-3, Б**).

Пептидните врски резултираат со карактеристична насоченост (по аналогија на нуклеинските киселини) на целиот полипептид, поради тоа што амино-групата секогаш се наоѓа на истата страна од  $\text{C}_\alpha$ -атомот во пептидната врска. Оттаму, едниот крај од полипептидот има слободна амино група и се нарекува **амино-** или **N-крај**, додека спротивниот има слободна карбоксилна група и се означува како **карбоксилан** или **С-крај**.



**Слика 6-3:** Пептидни врски. **A:** Воспоставување на пептидна врска меѓу две аминокиселини со што се создава дипептид и по еден молекул вода. **B:** Пример за пентапептид во кој пет аминокиселински остатоци се поврзани линеарно со четири пептидни врски. Терминалните групи се прикажани со ориентација од лево кон десно. Бочните групи од секоја аминокиселина или остаток се прикажани со симболот: R.

Пептидната врска е стабилизирана со резонантен ефект (**слика 6-4, A**). Имено, кислородниот атом од карбоксилната група има делумно негативен електро-



**Слика 6-4:** Структура на планарните пептидни врски во протеинските вериги. **A:** Пептидната врска е стабилизирана со резонанција и има карактеристика на двојна ковалентна врска што оневозможува слободна ротација околу нејзината оска. **B:** Планарен карактер на пептидните врски (рамнините во кои лежат атомите од секој аминокиселински остаток шематски се претставени како сини квадратни плочи). Секој последователен C $\alpha$ -атом во полипептидната верига е раздвоен со три ковалентни врски од кои врските N-C $\alpha$  и C-C $\alpha$  можат да ротираат во дозволените просторни комбинации, додека врската N-C е ригидна.

статски полнеж, додека азотниот атом од амидната група е со делумно позитивен полнеж, што создава мал електричен дипол. Во литературата, вообичаено е пептидните врски да се претставуваат како што е прикажано на левиот дел од **сликата 6-4, А**, т.е. како комбинација на двојната врска C=O и единечната врска C-N. Другата крајност е структурата прикажана на десниот дел од **сликата 6-4, А**. Во реалноста, резонантниот ефект предизвикува пептидната врска да е стабилизирана во форма на резонантен хибрид (среден дел од **сликата 6-4, А**). Со тоа, пептидната врска има карактеристика на делумно двојна ковалентна врска (C=N) што оневозможува слободна ротација околу нејзината оска. Преостанатите две врски: N-C<sub>α</sub> и C<sub>α</sub>-C можат, теоретски, слободно да ротираат околу своите оски.

Покрај тоа, карбонилната група (C=O) е во **транс** положба во однос на групата N-H, па, пептидната врска има планарен карактер (**слика 6-4, Б**). На пример, во еден дипептид, во една иста рамнина лежат вкупно шест атоми од првата аминокиселина: првиот C<sub>α</sub>-атом, двата атома од групата C=O, двата атома од групата N-H и C<sub>α</sub>-атомот од следниот аминокиселински остаток. Истото се однесува и на втората аминокиселина од пептидот. Овие карактеристики овозможуваат слободна ротација меѓу соседните „крути“ пептидни рамнини (**слика 6-4, Б**). Дихедрискиот (торзиски) агол на ротација околу оската на врската N-C<sub>α</sub> се означува со симболот φ (фи), додека кај врската C-C<sub>α</sub> со ψ (пси).

Важно е да се има предвид дека ротациите околу оските на овие две врски не се целосно случајни и слободни, поради просторното (стеричко) пречење меѓу бочните групи од секој аминокиселински остаток, кои се простираат вон линеарниот пептиден њрбет. Затоа, дозволени се само специфични комбинации на овие агли при кои атомите од бочните групи нема да се судираат.

### 6.3 Номенклатура на протеините

**Пептидите** се куси вериги составени од помал број на аминокиселини. Нивната номенклатура се базира на бројот на аминокиселински остатоци во пептидот за што се користи соодветниот старогрчки префикс: дипептид е верига составена од две аминокиселини; трипептид од три, тетрапептид од четири, пентапептид од пет, итн. Иако терминологијата на пептидите која се користи во литературата не е целосно унифицирана, пептидите со должина од 12 до 20 аминокиселински остатоци најчесто се означуваат како **олигопептиди**, а тие подолги од 20 аминокиселини како **полипептиди**. Термините протеин и полипептид често пати се користат еден наместо друг. Но, изразот протеин има повоопштено значење и дефинира молекул кој е составена од една или од повеќе полипептидни вериги. Оттаму, протеините составени од само една полипептидна верига се нарекуваат **мономерни**, додека тие кои се составени од повеќе од една полипептидна верига се **мултимерни** протеини. Кај последниве, вообичаено е поединечните полипептиди да се означуваат како **субединици (протомери)**.

Понатаму, мултимерните протеини можат да содржат само еден тип на полипептиди (**хомомултимерни протеини**) или да се составени од различни полипептидни вериги (**хетеромултимерни протеини**) (**слика 6-5**).

При означување на бројот на мономерни во мултимерните протеини, исто така, се користат старогрчките префикси.



**Слика 6-5:** Примери за градба на протеините кои можат да се составени од една или повеќе мономерни субединици (поединечни полипептидни вериги). Субединиците се претставени само шематски, а не со структурен приказ.

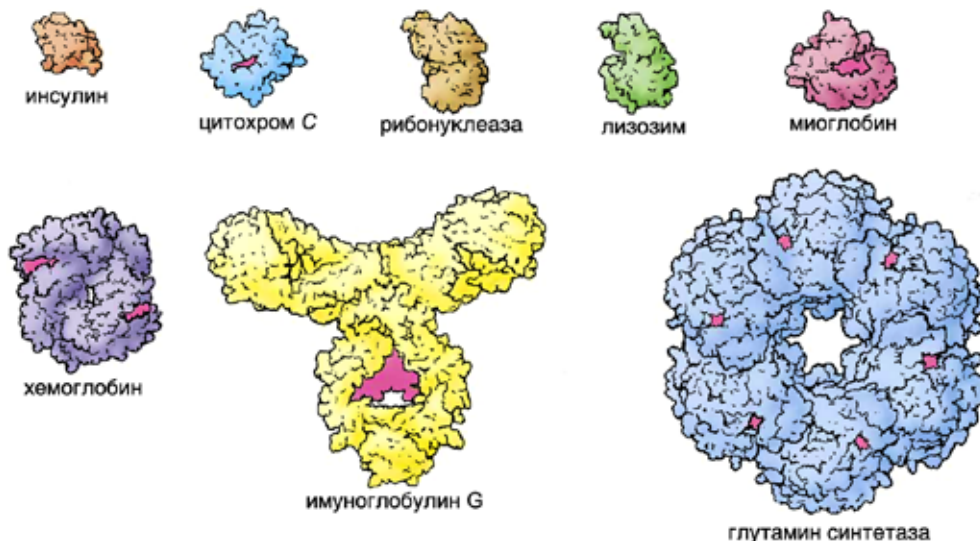
## 6.4 Големина на протеинските молекули

Полипептидните вериги во протеините можат да бидат долги од 20 па сè до десетици илјади аминокиселински остатоци. Важните протеински хормони кај вертебралните: глукагон и кортикотропин имаат само по 29, односно 39 аминокиселини, соодветно, додека мускулниот протеин титин има речиси 27 000 аминокиселински остатоци во една единствена полипептидна верига со молекулска маса од околу 3 000 000. Мултимерните протеински агрегати можат да имаат молекулска маса и од неколку милиони далтони. Големината на протеините може да се изрази преку нивната молекулска маса (единица мерка според SI системот без димензии), или според застарената, но, сè уште често користена единица мерка далтон (Da). На пример, големината на некој протеин со молекулска маса 10 000, во литературата често пати се означува и со 10 kDa.

**Табела 6-1: Споредба на молекулската маса и градбата на некои протеини**

протеин	молекулска маса	број на аминокис. остатоци	број на полипептидни вериги
цитохром <i>c</i> (човечки)	13 000	104	1
рибонуклеаза А (од говедски панкреас)	13 700	124	1
лизозим (од белката од кокошкино јајце)	13 930	129	1
миоглобин (од коњско срце)	16 890	153	1
химотрипсин (од говедски панкреас)	21 600	241	3
хемоглобин (од човек)	64 500	574	4
серумски албумин (од човек)	68 500	609	1
хексокиназа (од квасни габи)	102 000	972	2
RNA полимераза (од <i>E. coli</i> )	450 000	4 158	5
аполипопротеин <i>B</i> (од човек)	513 000	4 536	1
глутамин синтетаза (од <i>E. coli</i> )	619 000	5 628	12
титин (од мускул кај човек)	2 993 000	26 926	1

Заради споредба, во **табелата 6-1** се прикажани податоци за молекулската маса и градбата на некои протеини. Просторниот изглед во контекст на големината на молекулите е прикажан во ист размер на **сликата 6-6**



**Слика 6-6:** Споредба на формата и големината на некои протеини прикажани во приближно ист размер.

Интересно е што не постои цврста корелација меѓу сложеноста на протеинската функција и неговата големина. Различни клетки или организми можат да поседуваат протеини со драстично различна големина за извршување на една иста биолошка функција. Така, ензимот глутамин синтетаза кај *E. coli* има молекулска маса од 600 000, додека ензимот со идентична функција (ист биохемиски чекор за синтеза на глутамин) во човековиот мозок има молекулска маса од само 380 000.

Просечната молекулска маса на еден аминокиселински остаток во протеините е 113 (113 Da), при што е пресметано дека при формирањето на секоја една пептидна врска меѓу две аминокиселини се издвојува по еден молекул вода. Со оваа вредност може да се пресмета приближниот број на аминокиселински остатоци во некој протеин според неговата молекулска маса, и обратно, да се пресмета неговата приближна молекулска маса според познатиот број на аминокиселински остатоци.

## 6.5 Хиерархиски нивоа на протеинската структура

Комплексната архитектура на протеинските молекули наметнува дефинирање на неколку нивоа на нивната молекуларна структура. Изразот конфигурација се користи за опишување на геометрискиот сооднос меѓу определени атомски групи во протеинскиот молекул, какви што се L- и D-изомерите на аминокиселините, додека терминот конформација се однесува на целокупниот просторен распоред (аранжман) на сите атоми и функционални групи во протеинскиот молекул. Можните конформации кои протеинот може да ги заземе ги вклучуваат сите структурни состојби кои



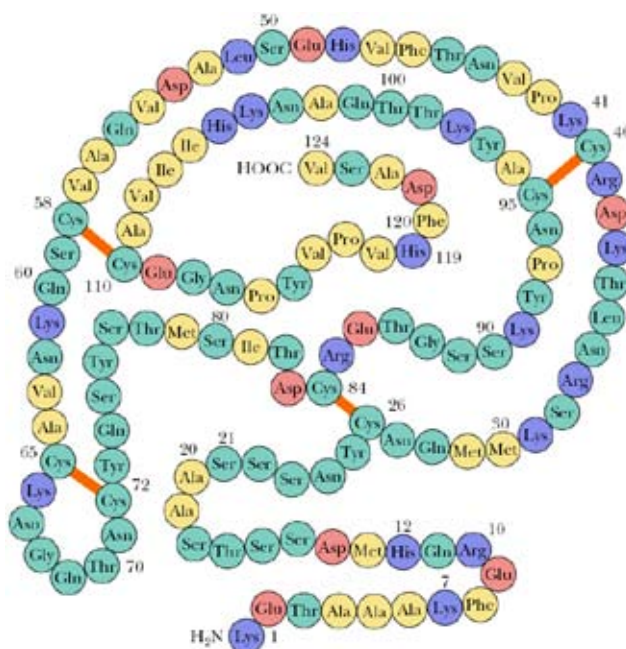
можат да се постигнат без раскинување на ковалентните врски. Секоја полипептидна верига содржи онолку пептидни врски колку што има аминокиселински остатоци, минус една. Поради тоа што атомските групи можат слободно да ротираат околу поголем број од тие врски, теоретски, протеинот може да заземе речиси неограничен број конформации. Бројот на поединечни комбинации од аглиите  $\phi$  и  $\psi$  во секоја од пептидните врски во некој протеин, кои ги определуваат можните конформации, може да биде неверојатен. Пресметано е дека би биле потребни милијарди години доколку протеинскиот молекул би ги испробувала сите можни поединечни конформации преку принципот на случајност. Сепак, секој протеин има своја специфична тридимензионална структура која е термодинамички максимално стабилна, со најниско енергетско ниво во оптималните услови и која ја определува неговата биолошка функција. Важно е да се има предвид дека тридимензионалниот распоред е условена пред сè од примарната структура, т.е. од аминокиселинската секвенца на полипептидот. Како што ќе биде објаснето подолу, некои протеини функционираат со промена на својата тридимензионална структура.

## Примарна структура

Линеарниот редослед (секвенцата) на аминокиселините во полипептидната верига се дефинира како **примарна структура** на протеините. Во примарната структура на протеините учествуваат само ковалентните пептидни врски и дисулфидни врски (мостови) меѓу цистеинските остатоци кај некои протеини (слика 6-7).

Како што секвенцата на нуклеинските киселини секогаш се пишува од 5' кон 3'-насока (5'→3'), вообичаено е аминокиселинскиот редослед (секвенцата) на пептидите и полипептидите да се пишува од amino- кон карбокси-крајот. На пример, секвенцата на пептидниот хормон ангиотензин II е:

N-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-C, доколку се користат кратенките од по три букви за секоја аминокиселина. Наместо тоа, може да се користат и кратенки од по една буква, па, заради заштеда на простор, можат дури и да се изостават ознаките за краевите на пептидот: DRVYIHPF. Со латинската буква X се означува кој било аминокиселински остаток во полипептидната верига.

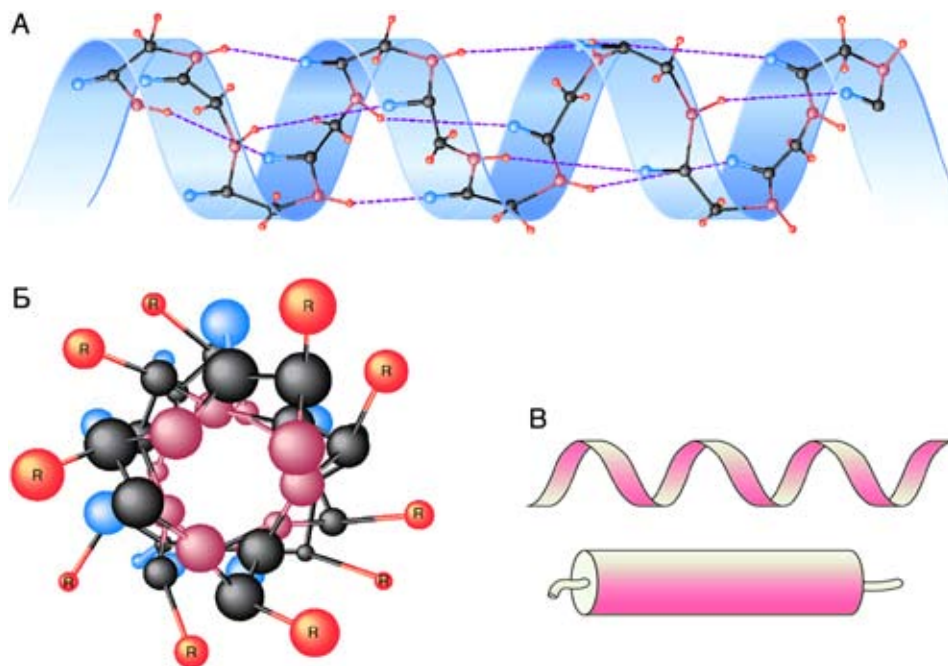


**Слика 6-7:** Примарна структура на говедската панкреасна рибонуклеаза А. Полипептидот содржи 124 аминокиселински остатоци и четири дисулфидни врски (мостови).

Како што е наведено и за нуклеинските киселини, така и полипептидните вериги, теоретски, можат да имаат каква било секвенца. Со оглед на тоа што секоја од 20-те аминокиселини може да биде на секоја од позициите во веригата, постојат  $20^n$  можни комбинации на секвенци, каде  $n$  е бројот на аминокиселинските остатоци. За типичен протеин со должина од 300 аминокиселини, теоретски се можни  $20^{300}$  (нешто повеќе од  $2,037 \times 10^{390}$ ) различни комбинации на протеински молекули со различни секвенци. Тоа е толку голем број што, дури и кога од секоја комбинација би се создал само по еден молекул, би биле потребни повеќе атоми отколку што постојат во целиот универзум.

## Секундарна структура

Во биолошките системи, полипептидните ланци не остануваат хаотични конци, туку формираат тридимензионални структури со прецизна форма. Оттаму, следното ниво на структурна организација на протеините е **секундарната структура** и се однесува на карактеристичните стабилни форми (како спиралите, на пример) кои се создаваат во некои региони на протеинските молекули. Со овие структури се опишува локалната конформација на делови од полипептидот. Секундарните структури се формираат со интеракции посредувани со водородни врски меѓу соседните ами-



**Слика 6-8:** Шематски приказ на  $\alpha$ -хеликс. На панелот **A** е структурниот цртеж гледано од страна, додека на **B** е прикажан гледано одозгора (низ оската). На панелот **C** се шематските прикази на  $\alpha$ -хеликалните структури кои често се користат во литературата. Водородните врски се прикажани со виолетови точексти линии на панелот **A**. Со R се означени бочните аминокиселински групи.



нокиселински остатоци во полипептидните вериги. Најкарактеристични секундарни структури се:  $\alpha$ -хеликсот,  $\beta$ -плочата,  $\beta$ -завојот и јамката.

**$\alpha$ -хеликс** - првата дефинирана структура кај протеините (оттаму и изразот алфа) ја опишале Паулинг и Кореј кон средината на минатиот век. Ова е и најзастапената структура кај протеинските молекули и е особено честа кај глобуларните протеини. Оваа хеликална структура може да се формира во определен регион од полипептидната верига преку воспоставување на водородни врски меѓу аминокиселинските остатоци во истата линеарна полипептидна верига (**слика 6-8, А**).

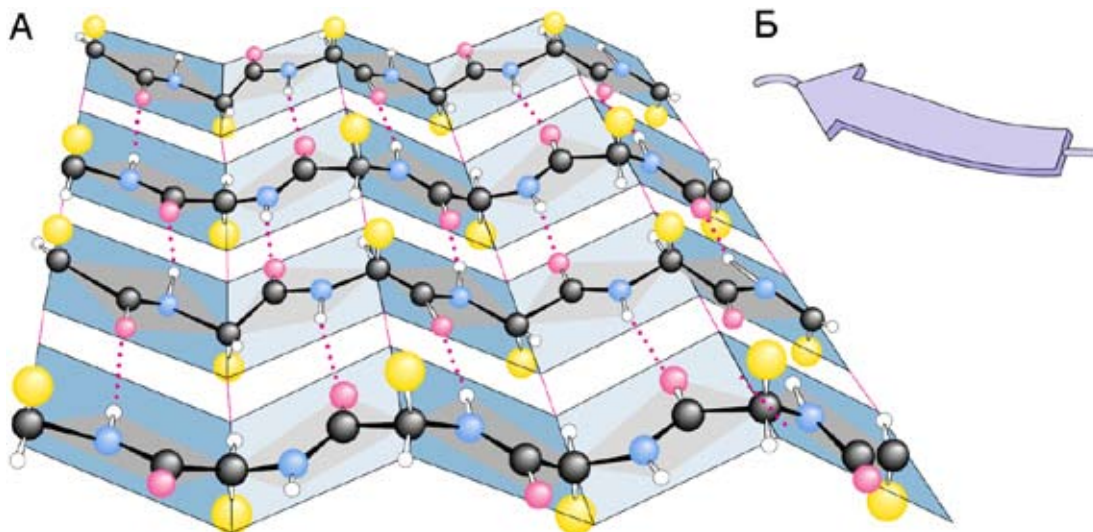
Кислородниот атом од карбонилната група од пептидната врска на еден аминокиселински остаток воспоставува водородна врска со amidниот водороден атом од четвртиот аминокиселински остаток во правец на С-крајот од полипептидот. Просечно има по 3,6 аминокиселински остатоци во еден целосен свиок (на едно целосно свртување на спиралата по должината на оската) од  $\alpha$ -хеликсот. Таквиот периодичен распоред на водородните врски меѓу кислородните и водородните атоми создава спирална структура и поради која е и наречена  $\alpha$ -хеликс (спирала), а може сликовито да се спореди со винт од шраф. Поради стрчењето на бочните аминокиселински групи вон полипептидната верига, оваа структура потсетува на цилиндар, поради што и ваквиот симбол често се користи за нејзино прикажување на шемите и цртежите (**слика 6-8, В**).  $\alpha$ -хеликалната структура се формира кога постои карактеристичен редослед на определени аминокиселински остатоци во полипептидната верига. Поради тоа што азотниот атом од пептидната врска кај пролиноот (циклична аминокиселина) не може да воспостави водородна врска, пролиноот може да биде вклопен само во првиот свијок од  $\alpha$ -хеликсот. Во сите други позиции, пролиноот би предизвикал премногу остар свијок на полипептидниот хеликс, а со тоа и прекин на  $\alpha$ -хеликалната структура. Поради своите мали димензии и глициноот може да предизвика остри свијоци во  $\alpha$ -хеликсите. Поголем број на остатоци од аминокиселините кои имаат полнеж поставени еден по друг во полипептидот, исто така можат да ја нарушат хеликалната структура поради тоа што се склони да создаваат јонски врски или меѓусебно да се одбиваат електростатски.

Кај многу  $\alpha$ -хеликални структури карактеристично е што на едната страна од оската на цилиндарот преовладуваат аминокиселински остатоци со хидрофобни бочни групи, додека на спротивната страна се главно хидрофилни групи. Протеините со такви амфипатични хеликси можат да имаат и специфична функција во формирањето на мембрански пори, јонски канали итн.  $\alpha$ -хеликсот е честа структура кај фибриларните структурни протеини, како кератинот, на пример.

Влакната од косата, кои се составени главно од кератин, можат да се истегнуваат затоа што се раскинуваат водородните, а не ковалентните, врски од  $\alpha$ -хеликсот, а кога влакното ќе се отпушти, водородните врски повторно се воспоставуваат и ја враќаат хеликалната структура.

**$\beta$ -(набрана) плоча** - оваа структура е втората по ред проучена регуларна структура кај протеините (оттаму и симболот  $\beta$ ) и се формира со воспоставување на водородни врски меѓу групите N-H од еден, и групите C=O од друг аминокиселински остаток од полипептидната верига кога се послани странично една покрај друга (**слика 6-9**).

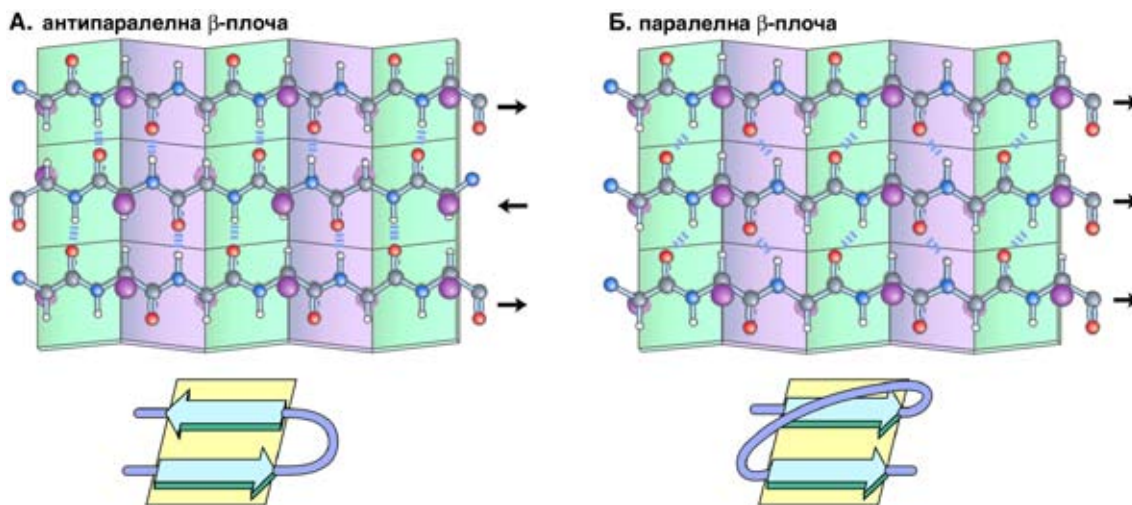
Структурата може сликовито да се претстави како хартија (плоча) испревиткана во цик-цак форма. За разлика од компактниот полипептиден њрбет кај  $\alpha$ -



**Слика 6-9:** Шематски приказ на  $\beta$ -плоча. На панелот **A** е структурниот цртеж. На **B** е шематскиот приказ на  $\beta$ -набраната плочеста структура кој најчесто се користи во литературата. Водородните врски се прикажани со виолетови точексти линии на панелот A.

хеликсот, полипептидните вериги кај  $\beta$ -плочата се целосно развлечени.  $\beta$ -плочата може да се формира и меѓу два региона од истиот или од две различни региони на полипептидната верига. Молекуларната архитектура на  $\beta$ -плочата е карактеристична по тоа што бочните (R) групи на аминокиселинските остатоци стрчат наизменично под и над рамнината на плочата.

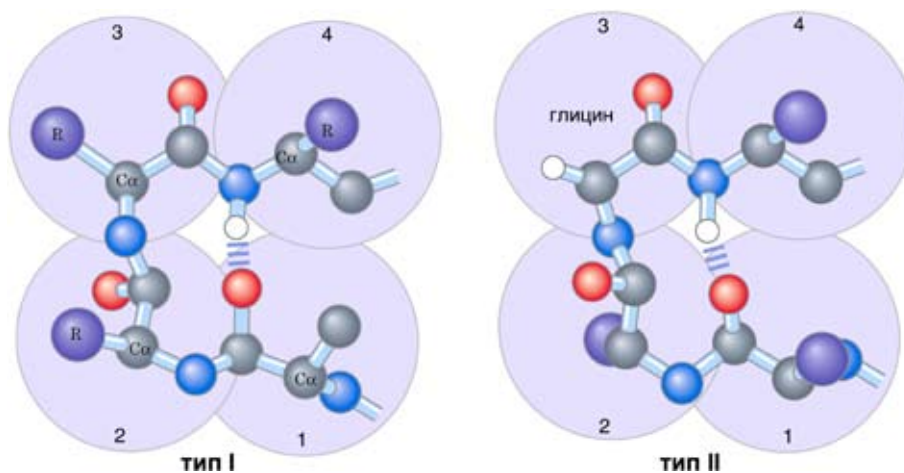
Соседните полипептидни вериги кои учествуваат во формирањето на  $\beta$ -плочата можат да се поставени во иста насока (паралелно) или во спротивна насока



**Слика 6-10:** Шематски приказ на **A** паралелна и **B** антипаралелна  $\beta$ -плоча. Водородните врски се прикажани со сини цртчики. Во долниот дел од цртежот се шематски прикази на ориентацијата на полипептидниот рбет кај двете структури.

(антипаралелно) една покрај друга во однос на amino- и карбокси-крајот на полипептидот. Антипаралелните  $\beta$ -плочи се постабилни од паралелните поради тоа што водородните врски се меѓусебно колинеарни (слика 6-10). Групаии на  $\beta$ -плочести структури често се наоѓаат во внатрешниот регион кај многу глобуларни протеини.  **$\beta$ -завој** - се формира во вид на остар свијок под агол од  $180^\circ$  (т.е. во форма на латинската буква U) и често ги поврзува соседните  $\alpha$ -хеликси или  $\beta$ -плочи во истиот полипептид.  $\beta$ -завојот е особено чест кај глобуларните протеини кои имаат компактно здиплени полипептидни вериги и кај кои речиси една третина од аминокиселинските остатоци учествуваат во формирање на завои и јамки. Типичен пример е  $\beta$ -завојот кој ги поврзува двата соседни краја од истиот полипептид кај антипаралелната  $\beta$ -плоча (слика 6-10, А).

Во протеините се најчести два типа на  $\beta$ -завои, означени како: тип I и тип II. Типот I е застапен почесто и во неговото формирање учествуваат вкупно четири соседни аминокиселински остатоци (слика 6-11).



Слика 6-11: Шематски приказ на најчестите типови на  $\beta$ -завои.

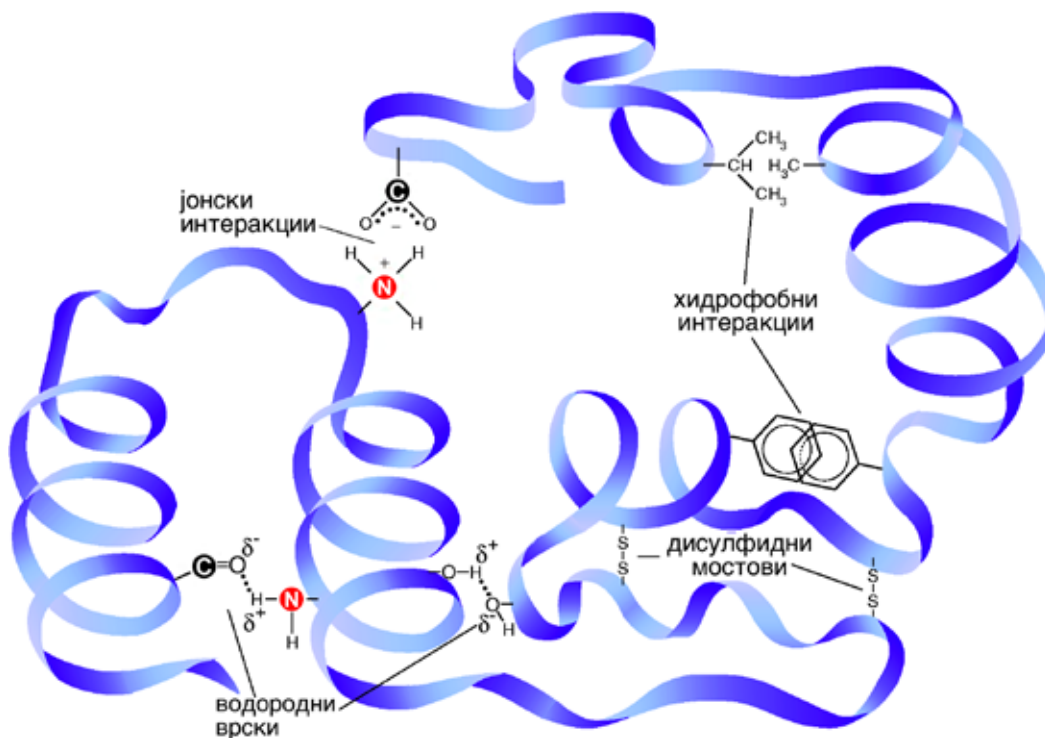
Водородните врски се создаваат меѓу бочните групи од првиот и од четвртиот аминокиселински остаток. Кај  $\beta$ -завоите од типот II важи истиот принцип со таа разлика што третиот аминокиселински остаток, по дефиниција, е глицин. Како што е спомнато, глицино и пролино се ретки во  $\alpha$ -хеликалните структури токму поради склоноста да создаваат свијоци и завои, па, тоа е и причината што се најчесто застапени аминокиселини во  $\beta$ -завојот.

**јамки** - овие протеински структури се подолги во однос на завоите и не се толку прецизно структурно дефинирани, туку имаат конформација која може да биде заземена помалку или повеќе случајно или која е резултат на целокупната тридимензионална структура на протеинскиот молекул.

Околу 60% од аминокиселинските остатоци во досега проучените протеини учествуваат во создавањето на  $\alpha$ -хеликсите и  $\beta$ -плочите, додека остатокот се  $\beta$ -завоите, како и веригите кои случајно ја заземале својата конформација. Многу протеини содржат  $\alpha$ -хеликси и  $\beta$ -плочи во истата полипептидна верига.

## Терциерна структура

Севкупната тридимензионална конформација на еден полипептид се означува како **терциерна структура**. Таа зависи од интеракциите меѓу поединечните секундарни структури во полипептидот. Во создавањето и стабилизирањето на терциерната структура, покрај водородните врски, учествуваат и други нековалентни хемиски врски: јонските (електростатски), Ван дер Валсовите и особено хидрофобните интеракции (слика 6-12).

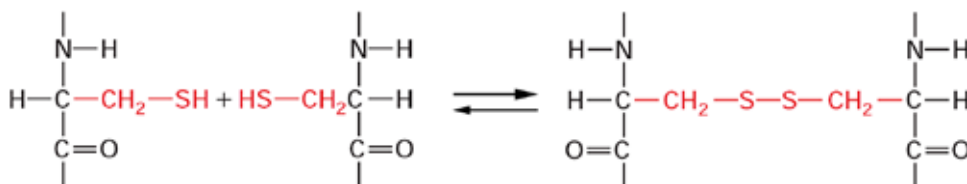


**Слика 6-12:** Шематски приказ на некои од хемиските врски кои учествуваат во создавањето на терциерната структура на протеинскиот молекул.

Покрај нековалентни врски, терциерната структура кај некои протеини е стабилизирана и со ковалентни **дисулфидни врски** или **мостови (-S-S-)** меѓу цистеинските остатоци од истата полипептидна верига при што се создава т.н. **цистински остаток (слика 6-13)**.

Таквите стабилизирачки привлечни сили ги поставуваат секундарните структури на полипептидната верига во компактна и структурно дефинирана формација. Сепак, тоа не значи дека терциерната структура на протеинот е крута и непроменлива. Слабите нековалентни сили кои ја создаваат и стабилизираат целокупната конформација, и другите молекуларни феномени овозможуваат извесна еластичност на терциерната структура која, во минимална мерка, постојано флукутира. Со воспоставувањето на терциерната структура на протеинот, некои аминокиселински остатоци

доаѓаат во близок контакт иако се оддалечени во аминокиселинската секвенца на полипептидот.

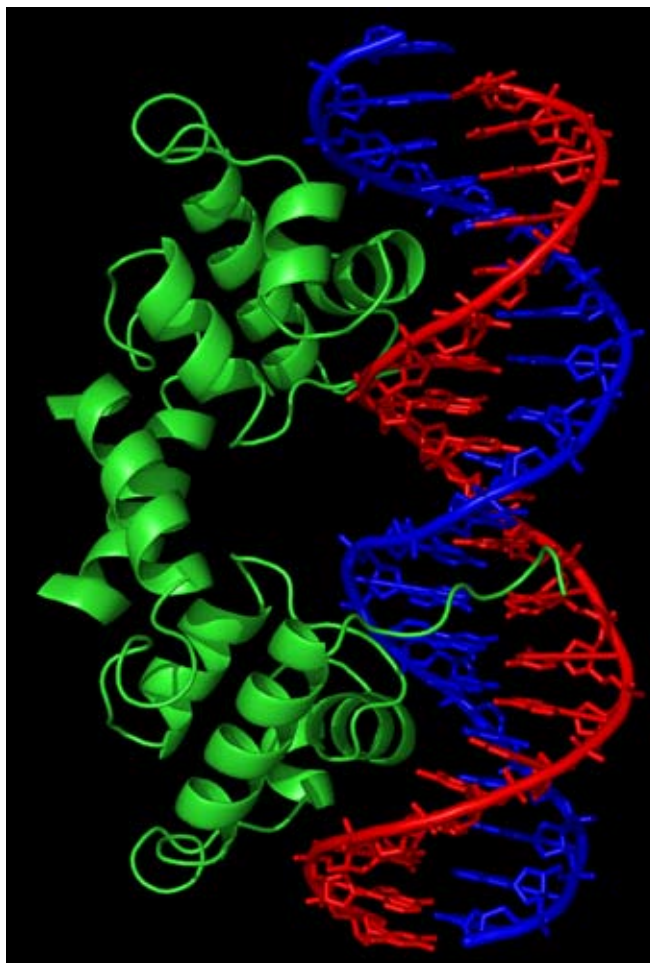


**Слика 6-13:** Создавање на интрамолекуларни дисулфидни врски меѓу два цистеински остатоци од полипептидната верига.

Малите промени на конформацијата се клучни за алоsterијата и за други механизми кои овозможуваат биолошка функционалност на регулаторните и протеините кои се врзуваат со DNA, како и на ензимите, на пример (слика 6-14).

Од екстремниот број на досега проучувани протеини чија терциерна структура е позната во релативно голема мерка е примерот прикажан на **сликата 6-15**.

**Мотиви** - терциерната структура на протеините може да е составена само од  $\alpha$ -хеликси, само од  $\beta$ -плочи, и од разни комбинации на овие две најчести секундарни структури, како и од други, поретко застапени структури. Карактеристичните комбинации на секундарни структури (наизменично повторување на  $\alpha$ -хеликси и  $\beta$ -плочи, на пример, или некој друг шаблон) создаваат форми кои личат на орнаменти и се наречени **мотиви** или **супра-секундарни структури**. Мотивот претставува структурна сигнатура која може да има и специфична биолошка функција. Едноставните мотиви од типот  $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$  или



**Слика 6-14:** Компјутерски создаден модели на молекуларната интеракција меѓу на  $\lambda$ -репресорниот протеин и двоверижниот DNA-хеликс.



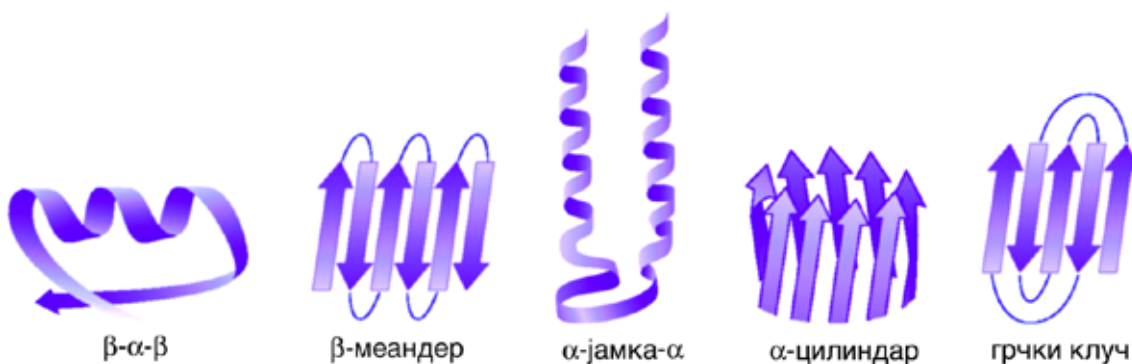


**Слика 6-15:** Пример за терциерна структура на протеините. Прикажан е структурниот модел на ензимот триоза фосфат изомераза. Наизменично се повторуваат  $\alpha$ -хеликси (спирални ленти) и  $\beta$ -плочи (сплескани стрелки).

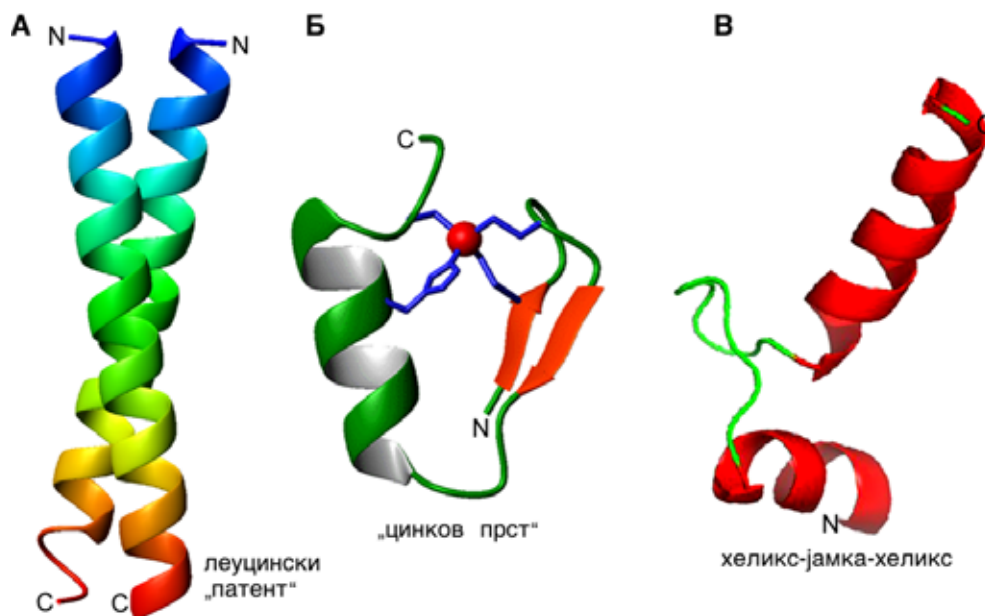
$\alpha$ -јамка- $\alpha$  (слика 6-16) се сретнуваат кај многу протеини.

Постојат и посложени мотиви каков што е **леуцинскиот „патент“**, на пример, кој се наоѓа кај многу фиброзни протеини и кај некои регулаторни протеини кои се врзуваат со DNA. Кај овој протеински мотив, двете паралелно поставени  $\alpha$ -хеликални секундарни структури од истиот полипептид формираат се поврзуваат преку хидрофобни интеракции меѓу хидрофобните аминокиселински остатоци од едната хеликална спирала со леуцински остатоци (кои исто така се хидрофобни) од другата хеликална структура (слика 6-17, А). Оттаму и името на ваквите мотиви. Чест структурен мотив кај протеините кои се врзуваат со DNA, а се вклучени во регулацијата на транскрипцијата е т.н. **цинков „прст“**. Содржи три секундарни структури: две антипаралелни  $\beta$ -плочи и еден  $\alpha$ -хеликс поврзани со слободни јамки (слика 6-17, Б). Пар хистидински и пар цистеински остатоци од овие три структури се поврзани со еден цинков атом при што заедно создаваат прстовидна формација (оттаму и

изразот цинков „прст“). Протеините кои имаат такви мотиви на цинкови „прсти“ можат да препознаат определени DNA-секвенци и стабилно да се поврзат со нив, што е клучно за нивната регулаторна улога. Мотивот **хеликс-јамка-хеликс** содржи специфична комбинација од две  $\alpha$ -хеликални секундарни структури меѓу кои се наоѓа куса јамка и има способност за врзување на калциумови јони ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (слика 6-17, В). Ваквиот мотив се наоѓа кај повеќе од 100 различни калциум-врзувачки протеини, како калмодулинот, на пример. Овој протеин содржи вкупно четири хеликс-јамка-



**Слика 6-16:** Примери за некои поедноставни протеински мотиви. Шематски се прикажани секундарните структури кои ги градат мотивите (орнаментите). Нивниот назив често пати се дава според орнаментот на кој потсетуваат.



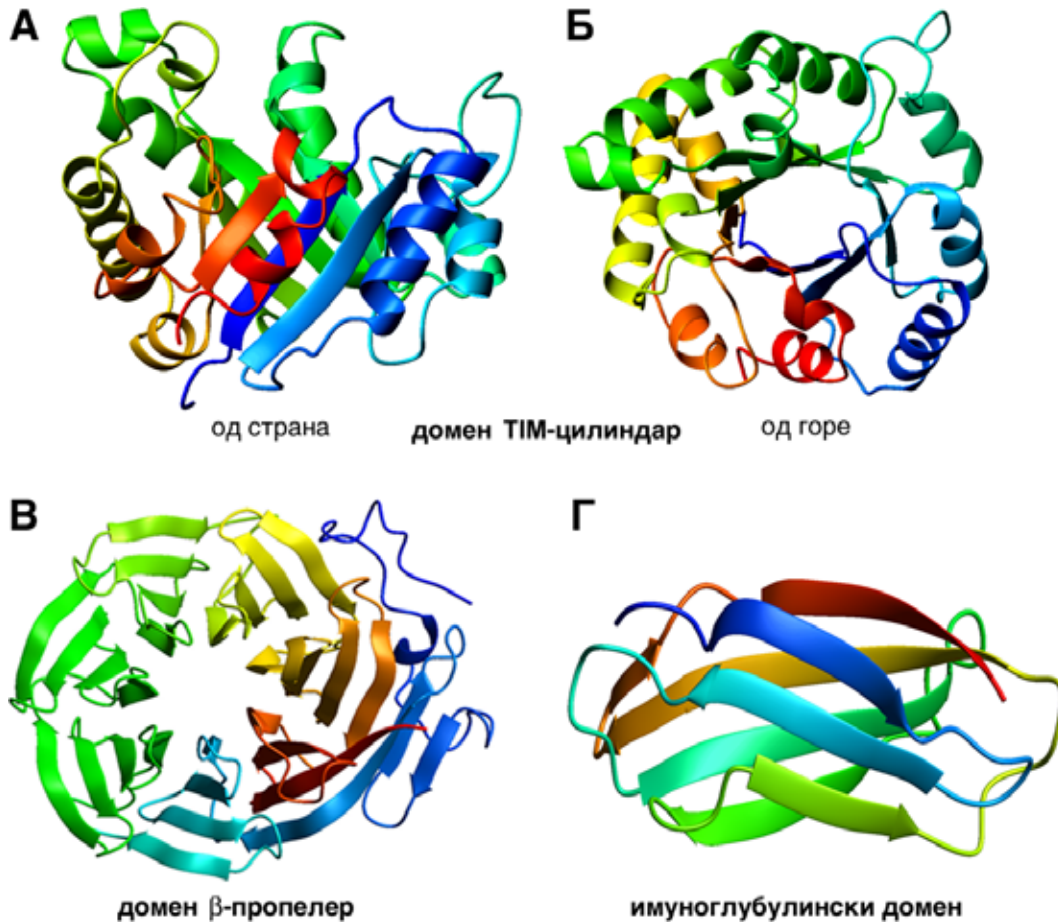
**Слика 6-17:** Примери за мотиви на секундарната протеинска структура. **А:** две делумно преплетени  $\alpha$ -хеликални структури кои се меѓусебно поврзани со хидрофобни реакции меѓу леуцинските остатоци (оттаму и изразот: леуцински [патент за овој мотив]). **Б:** цинковиот прст е мотив во кој цинковиот атом (црвено топче) е поставен меѓу парот  $\beta$ -плочи (со црвена боја) и единствениот  $\alpha$ -хеликс (зелено обоен) и тоа со пар хистидински и пар цистеински остатоци (означени со сина боја). **В:** мотивот хеликс-јамка-хеликс има способност за нековалентно врзување на по еден калциумов јон во јамката меѓу двата хеликса и е чест кај некои калциум-врзувачки протеини, како кај калмодулинот, на пример.

хеликс мотиви со определени хидрофобни региони со кои нековалентно врзуваат по еден калциумов јон со помош на јонски интеракции.

**Домени** - здружувањето на повеќе протеински мотиви создава локални, компактни, делумно независни структурни единици во протеинскиот молекул, кои се нарекуваат **домени** и можат да се сметаат за фундаментални модуларни единици на терциерната структура. Домените најчесто опфаќаат меѓу 40 и 350 аминокиселински остатоци од полипептидот. Терциерната структура на протеините зависи од составот, типот и бројот на домените, а тие, пак, зависат од секундарните структури. Домените можат да бидат класифицирани според структурниот шаблон (комбинација на мотиви) или според функционалната улога. Имено, биолошката активност на протеините обично е локализирана во мал дел од полипептидната верига. Така, ензимите содржат каталитични домени во кои се наоѓа активниот центар, додека протеините кои се врзуваат со DNA поседуваат домени кои се способни за нековалентна интеракција со полинуклеотидните вериги од DNA-молекулот.

На пример, доменот наречен **ТМ-цилиндар** се состои од осум  $\alpha$ -хеликални и осум  $\beta$ -плочести секундарни структури кои наизменично се повторуваат со мотивот:  $(\alpha-\beta)_8$  по должината на полипептидот, создавајќи соленоидна формација (слика 6-18, **А** и **Б**). Оваа протеинска структура името го добила по триоафосфат изомеразата





**Слика 6-18:** Пример за неколку протеински домени. **A:** Домен со ТИМ-цилиндар, прикажан од страна и **Б,** од озгора; **В:** домен со  $\beta$ -пропелер кај регулаторниот протеин *Tup1* кај квасците; и **Г:** имуноглобулински домен.

(ТИМ), гликолитички ензим кај кој за првпат е пронајдена. Подоцна, овој еволуциски конзервиран домен е пронајден и кај многу други ензими. Всушност, ТИМ-цилиндарот досега е најден само кај ензимите, па, детекцијата на овој домен во некој протеин речиси сигурно укажува на неговата каталитична (ензимска) функција.

Доменот кој е означен како  **$\beta$ -пропелер** се состои исклучиво од  $\beta$ -плочи организирани во тороидна структура со една централна оска, од каде и го добил името (**слика 6-18, В**). Се наоѓа кај некои ензими, како кај неураминидазата во вирусот на грип, на пример. Овој тетрамерен протеин е составен од четири  $\beta$ -пропелерни домени кои се составени од по шест „перки“ (за разлика од пропелерот со седум „перки“ во протеинот *Tup1* прикажан на **слика 6-18, В**).

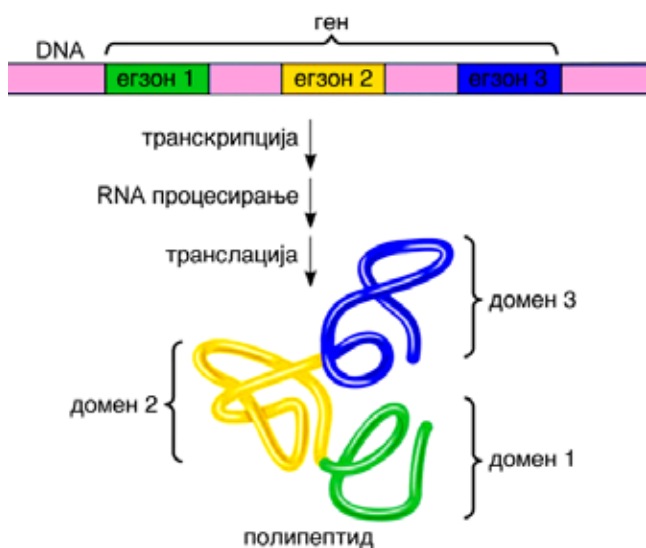
**Имуноглобулинскиот домен** се состои исклучиво од  $\beta$ -структури организирани во две паралелни рамнини (**слика 6-18, Г**). Овој домен за првпат е нејаден кај антителата (имуноглобулините), а подоцна и кај многу други протеини со различна функција.

Понекогаш, наместо конкретно име, домените се означуваат според структурната улога: како глобуларни или фибриларни. **Хемаглутининот** од вирусот на грип, на пример, на пример, е површински протеин кој се наоѓа вклопен во вирусната мембрана и се состои од три идентични полипептидни субединици (**слика 6-19**). Секоја субединица се состои од фибриларен домен кој има издолжени  $\alpha$ -хеликси и е вктовен во вирусната мембрана, и од глобуларен домен кој стрчи надвор од вирусната мембрана.

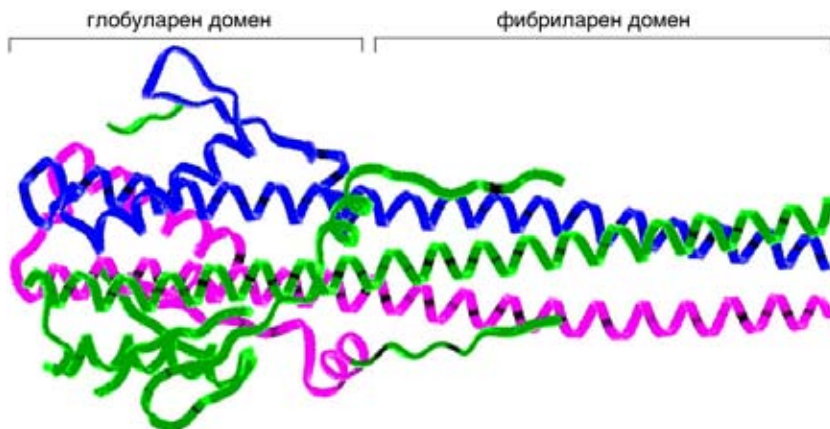
Интересно е што полипептидните региони кои ги создаваат домените, често се кодирани од различни егзони во соодветниот ген (**слика 6-20**). Изразот егзон е објаснет понатаму во текстот.

Постојењето на повеќе домени во структурната организација на поголемите протеини укажува на општиот принцип

дека комплексните молекули се градени од поедноставни компоненти. По аналогија, како што некои мотиви се чести секундарни структури, домените се терцирени структури кои како модули се вклопени во различни протеини. Користењето на модуларниот принцип во протеинската архитектура е препознатливо кај поголемите протеини кои, сликочито, се мозаици од различни домени и поради тоа можат истовремено да вршат различни функции.



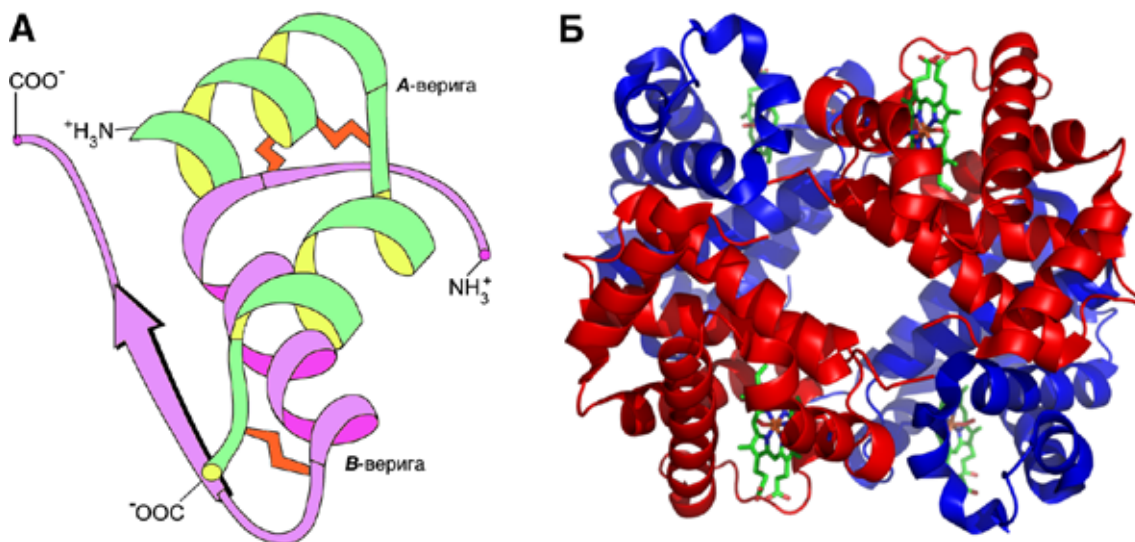
**Слика 6-20:** Поврзаност на егзоните (во генот кој го кодира протеинскиот продукт) и домените во полипептидната верига.



**Слика 6-19:** Молекуларен модел за структурата на хемаглутининот-протеин од обвивката на вирусот на грип. Секоја од трите полипептидни субединици е означена со различна боја.

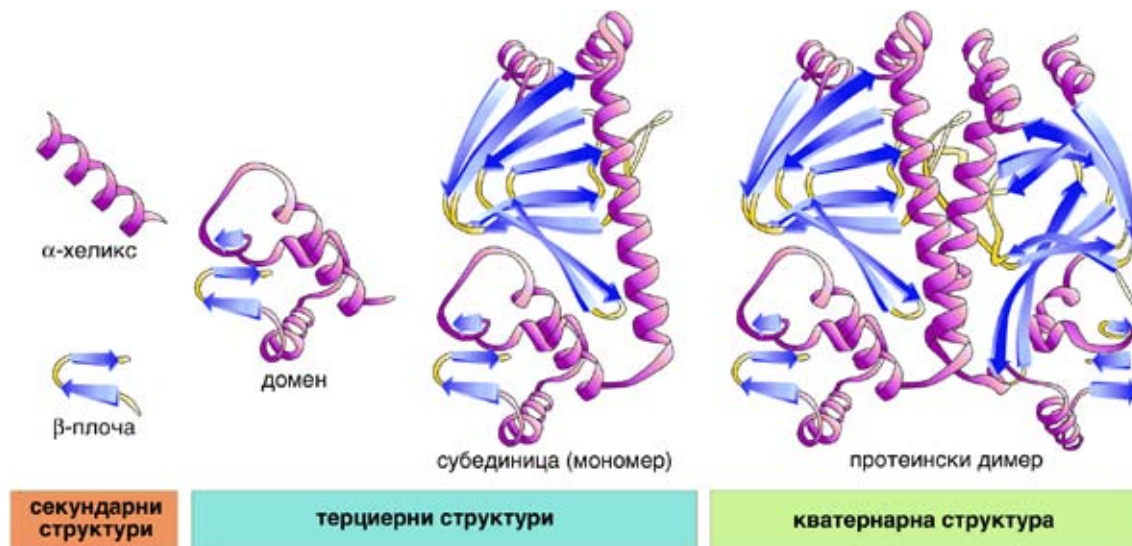
## Кватернарна структура

Четвртото ниво на структурна организација на протеините, т.н **кватернарна структура** се однесува само на протеините кои се составени од две или повеќе независни полипептидни вериги (субединици). Од правилната кватернарна структура на ваквите протеини, зависи и нивната биолошка активност. Полипептидните субединици меѓусебно се организираат во мултимерен протеин со нековалентни врски (хидрофобни и електростатски интеракции и водородни врски), а во помал број и со ковалентни врски (главно со дисулфидни мостови). На **сликата 6-21** прикажани се два примера за кватернарна структура на протеините: инсулин и хемоглобин.



**Слика 6-21:** Примери на кватернарни структури. **А:** Шематски приказ (со модел на ленти) на човековиот инсулин. Веригите *A* (зелена боја) и *B* (виолетова боја) се поврзани со три ковалентни дисулфидни врски (црвена боја). **Б:** Кватернарна структура на човековиот хемоглобин. На компјутерскиот молекуларен модел, прикажани се двете  $\alpha$ -субединици (со црвена боја), двете  $\beta$ -субединици (со зелена боја), како и четирите непротеински хем-групи (со зелена боја).

Соодносот меѓу различните нивоа на протеинската структура е илустриран на **сликата 6-22**.

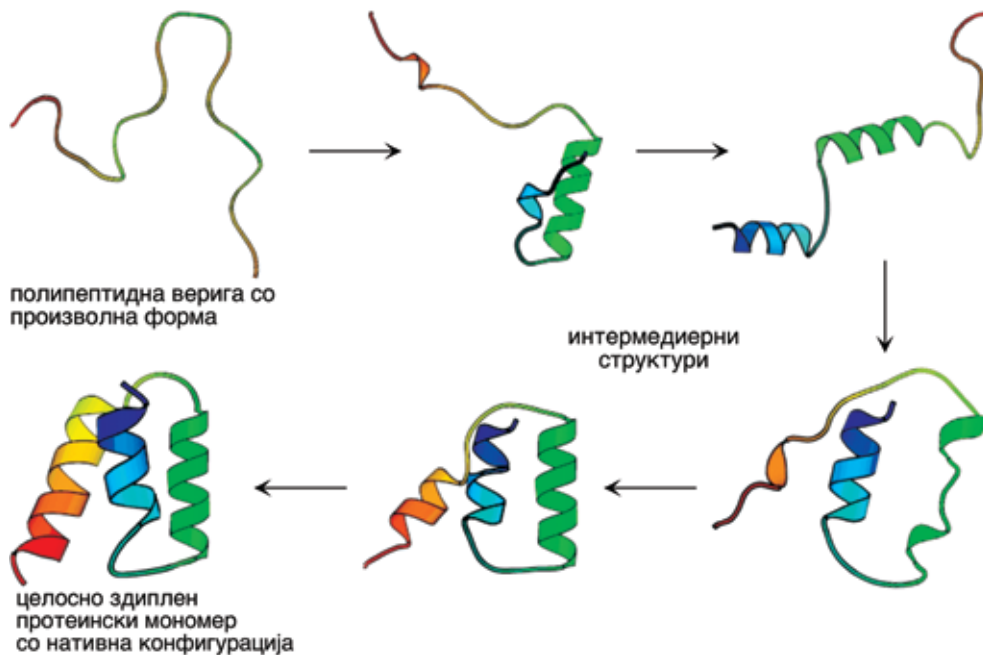


**Слика 6-22:** Поврзаност меѓу секундарните, терциерните и кватернарните структури на протеините.  $\alpha$ -хеликалните структури се обележани со виолетова боја,  $\beta$ -плочите со сина, а јамките со жолта боја.

## 6.6 Постигнување на нативната форма на протеините и денатурација

Просторните интеракции меѓу бочните групи од аминокиселинските остатоци од полипептидот ја определуваат специфичната тридимензионална структура на функционалниот протеин. Повеќето протеини кои се синтетизираат во клетката самостојно ја заземаат својата нативна, функционална конформација во рок од неколку секунди, па, сè до неколку минути по нивната синтеза. Состојбата при која протеините, во определени услови, ја имаат постигнато својата биолошки функционална конформација се означува како **нативна**. Процесот на заземање на нативната форма на протеинот понекогаш сликовито се опишува и како здиплување и се одвива низ повеќе чекори (**слика 6-23**).

Иако прецизните механизми и текот на овие последователни чекори се во голема мерка непознати, се претпоставува доаѓа до постепено здиплување на полипептидната верига преку привлекување или одбивање на бочните аминокиселински групи, се воспоставуваат водородни врски, хидрофобни интеракции со молекулите од околниот раствор, а кај некои протеини и интрамолекуларни дисулфидни врски. Притоа, од верига која има хаотична, произволна форма, полипептидот стекнува сè поголема организираност, при што постепено се формираат секундарните структури и мотивите, потоа домените и на крајот терциерната структура, односно полипептидот конечно ја стекнува својата нативна, биолошки функционална конформација.



**Слика 6-23:** Спонтано постигнување на крајната нативна, биолошки активна форма на полипептидот се одвива низ серија на чекори почнувајќи од полипептидот кој хаотично се протега во растворот (или цитосолот), па, сè до целосно здиплеениот протеин.

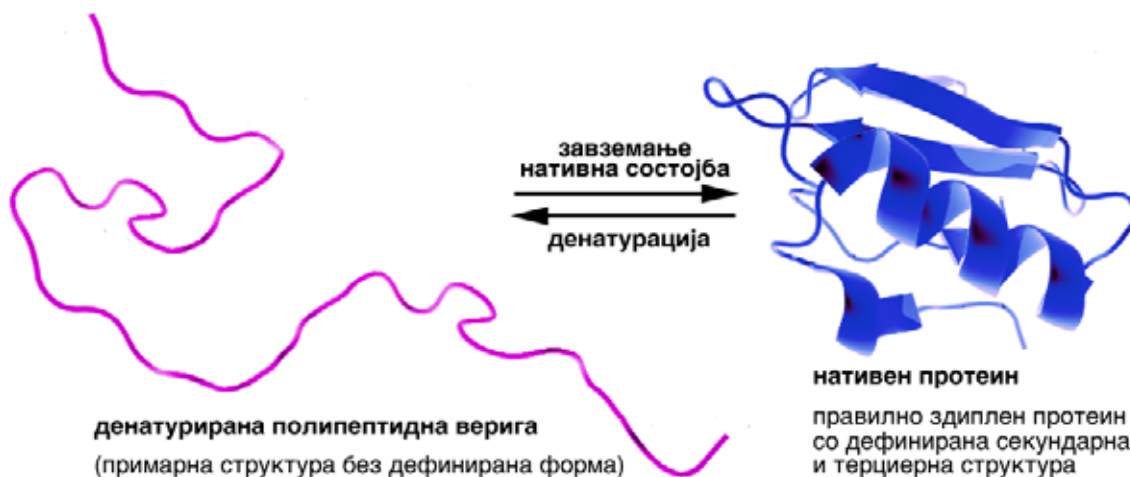
Спротивно, **денатурацијата** претставува губење на нативната состојба, но, без прекин на полипептидниот њрбет (**слика 6-24**). Денатурацијата може да настане поради нефизиолошки услови или физичко-хемики агенси какви што се:

- **температурните промени** - зголемувањето на температурата предизвикува засилување на молекуларните вибрации и раскинување на водородните и другите слаби хемики врски и интеракции. Некои протеини се зачудувачки отпорни кон температурна денатурација;
- **pH-екстреми** - промените на концентрацијата на водородните јони предизвикува протонирање на некои од аминокиселинските бочни групи и раскинување на водородните и јонските (електростатски) врски. Со приближување кон pH-вредноста при која протеинскиот молекул е електростатски неутрален (т.н. **изоелектричната точка**), брзо опаѓа растворливоста на протеинот и истиот може лесно да денатурира и да преципитира во растворот;
- **денатурирачки и редуцирачки соединенија** - уреата и други т.н. хаотропни молекули предизвикуваат силна денатурација на протеините. Меркаптоетанолот предизвикува редукција на дисулфидните мостови во сулфхидрилни групи од цистеинските остатоци. Отстранувањето на овие соединенија од растворот (со дијализа, на пример) може во определени случаи да овозможи ренатурација на протеинот и повторно правилно создавање на дисулфидните врски;
- **висока концентрација на соли** - јоните од солите се врзуваат со бочните групи од аминокиселинските остатоци во протеинот, нарушувајќи го нивното меѓусебно



поврзување според спротивниот електростатски полнеж. Покрај тоа, солите реагираат со водените молекули што ја менува локалната солватација на полипептидот. Сето тоа предизвикува таложење на протеините. Поради тоа што ваквата денатурација е обично реверзибилна, солите често се користат во протеинската биохемија за изолација и пречистување на некои протеини. Оваа препаративна техника често се нарекува **изсолување**;

- **органски растворувачи** - некои неполярни растворувачи (како етанол) или неполярни (хлороформ, на пример), можат да ги нарушат хидрофобните интеракции кои ја одржуваат терциерната структура, па, со тоа да предизвикаат денатурација;
- **детергенти** - овие амфипатични молекули исто така ги раскинуваат хидрофобните интеракции при што протеинот ја губи нативната состојба и преминува во полипептидна верига без дефинирана форма;
- **тешки метали** - јоните на некои метали какви што се живата ( $\text{Hg}^{2+}$ ) и оловото ( $\text{Pb}^{2+}$ ) ги нарушуваат електростатските интеракции во протеинскиот молекул создавајќи сопствени јонски врски со бочните групи кои имаат негативен полнеж;
- **механички стрес** - интензивно мешање на протеински раствор може да доведе до денатурација. Матењто на белката од кокошкиното јајце, на пример, доведува до денатурацијата на овалбуминот и другите протеини, што е видливо и со голо око преку промена на изгледот и конзистенцијата.



**Слика 6-24:** Структурна разлика меѓу денатурираниот (или протеин кој сè уште не ја заземал нативната состојба) и нативниот протеин со дефинирана конформација. Важно е тоа што денатурацијата често е иреверзибилна.

Денатурацијата е најчесто иреверзибилен процес и протеините трајно ја губат нативната конформација и биолошката функција. Понекогаш враќањето на физиолошките услови доведува до спонтан **ренатурација** на претходно денатурираните протеини, но, многу често протеините остануваат иреверзибилно денатурирани.

Последниов случај е многу чест кај ензимите и антителата (имуноглобулините), кои се, генерално, исклучително чувствителни на екстремни промени на средината.

Кај некои протеини, интрамолекуларните (во истиот полипептиден синџир) ковалентни дисулфидни врски (-S-S-) дополнително ја стабилизираат нивната терциерна структура.

Како што е објаснето подолу, заемањето на правилната тридимензионална, нативна конформација на протеините понекогаш е можно само со помош од посебни протеини-придружници.

## 6.7 Молекуларни придружници - хаперони и хаперонини

Некои протеини, особено подолгите полипептиди, не можат самите да ја постигнат потребната нативна тридимензионална конформација, па, во тоа им помагаат посебни, т.н. **ауксиларни протеини**. Имено, клеточниот цитосол содржи висока концентрација на протеини (околу 350 g/L) што може предизвика агрегација и таложеење на неполярните региони од полипептидните вериги поради хидрофобниот ефект при меѓусебен контакт. Покрај тоа, протеините кои не ја постигнале својата нативна конформација се многу поподложни на ензимска деградација со протеинази. Па сепак, околу 95% од клеточните протеини имаат постигнато нативна, правилна конформација.

Се претпоставува дека релативно брзото и ефектно воспоставување на нативната конформација на протеините веројатно се должи на посебни ауксиларни протеини наречени **хаперони** (англ. *chaperon*, придружник). Оваа класа на протеини е присутна кај сите организми, од бактериските, па, сè до човековите клетки. Покрај тоа, хапероните се присутни во сите клеточни компартмани, можат да се врзуваат со широк опсег на протеини, а учествуваат во клеточните механизми кои помагаат во воспоставувањето на нативната, биолошки функционална конформација на протеините. Тие делуваат како молекуларни скелиња обезбедувајќи микросредината за правилно постигнување на просторната тридимензионална структура на полипептидните вериги. Покрај тоа, хапероните ги штитат протеините од **денатурација**, која што претставува губеење на нормалната нативна состојба на протеините поради повисока температура, рН или некои денатурирачки соединенија. Хапероните најпрво биле откриени кај *Drosophila* како „протеини на топлотниот шок“ (**HSP** од англ. *heat-shock proteins*), кога мушичката била изложена на повисока амбиентална температура.

Досега се откриени две главни класи на хаперони:

- **молекуларни хаперони**, кои се врзуваат со новосинтетизираните протеини, ги стабилизираат и ги спречуваат наведените штетни контакти на сè уште несозреаните полипептиди. Кај вертебралните, а класа на хаперони се протеините **Hsp70** и нивните хомолози, додека кај бактериите тоа е протеинот DnaK.
- **хаперонини**, кои директно им олеснуваат на целните протеини да си ја заземат својата конечна, нативна конформација. Познати се хаперонините **TriC** кај еукариотите и **GroEL/ES** комплексот кај бактериските клетки.

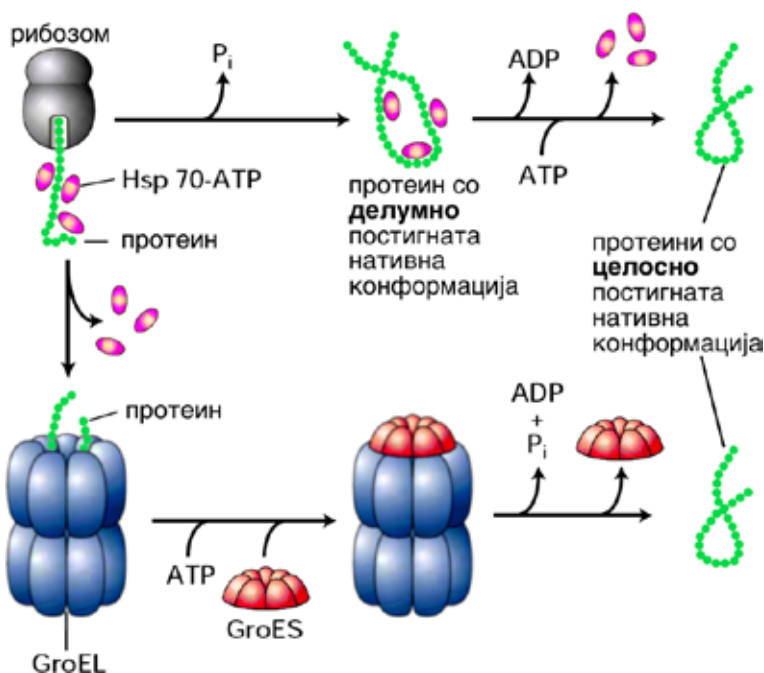
Хаперонот Hsp70 ги штити новосоздадените протеини, особено подолгите, додека ја заземат својата конечна, нативна конформација. Кога Hsp70 протеините ќе



се врзат со АТР, заземаат активирани, отворена форма со која се врзуваат со полипептидните вериги кои се штотуку синтезирани во рибозомите. Хидролизата на врзаниот АТР обезбедува енергија со која молекуларните хаперони создаваат затворена форма со чија помош полипептидот ја воспоставува својата правилна конформација (нативна структура) (слика 6-25).

Заземањето на правилната конформација на штотуку синтезираните полипептидни вериги од рибозомите го олеснуваат и хаперонините, кои претставуваат огромни цилиндрични

макромолекуларни агрегати. На пример, сложениот хаперонински комплекс GroEL/ES кај бактериите, митохондриите и хлоропластите е составен од компонентата GroEL кој има форма на буренце составено од два прстена од по седум протеински протомери. Втората, помала компонента GroES (т.н. ко-хаперонин) има улога на молекуларно капаче (слика 6-25). Малку се знае за еукариотскиот комплекс Tric, додека механизмот на делување на комплексот GroEL/ES е најдобро проучен кај бактериите, па, служи како општ модел за хаперонините. Се претпоставува дека свежо синтезираниот полипептид се внесува во внатрешноста на компонентата GroEL, се затвора со GroES (кој има улога на капаче), а потоа со реакција која е зависна од АТР, ја постигнува својата нативна конформација и се ослободува од комплексот.



**Слика 6-25:** Постигнување на правилната конформација на протеините со помош на хаперони и хаперонини.

## 6.8 Протеолиза

Векот на траење на протеините варира силно во опсег од неколку минути кај циклините (регулатори на клеточниот циклус), па, сè до кристалините (протеини во очната леќа) кои траат колку што живее индивидуата. Покрај инхерентната стабилност на протеините, нивниот животен век во голема мерка е определен со подложноста за разложување со протеолитички ензими означени како **протеази** (или **протеинази**).

Аналогно на терминологијата на нуклеазите, и протеазите се класифицирани на **ендопротеази**, кои ги хидролизираат пептидните врски внатре во полипептидната

верига и на **егзопептидази**, кои хидролизата ја вршат од N-крајот (означени и како аминокиселини) или од C-крајот (карбоксипептидази) на полипептидот. Покрај таквата класификација, протеазите се означуваат и според биохемискиот механизам, т.е. според клучната аминокиселина во активниот (каталитичен) центар на самиот ензим: серин-протеази, цистеин-протеази итн. Металопротеазите се зависни од присуство на некои метални јони. Протеазите можат да се специјализирани за својот супстрат, каква што е еластазата, колагеназата, тромбинот, плазминот и други.

Ензимската хидролиза на протеините (протеолиза) се одвива под дејство на различни типови ензими со различна клеточна или екстрацелуларна локализација, како и за различни цели. Еден од главните интрацелуларни патишта за деградација со протеолитички ензими се одвива во лизозомите. Лизозомската протеолиза се користи главно за уништување на екстрацелуларните протеини кои се внесени во клетките преку ендоцитоза и за остарените или оштетени органели од самата клетка.

Со контролирана протеолиза се отстранува метионинскиот остаток од аминокиселинскиот крајот на речиси сите новосинтетизирани протеини веднаш по транслацијата. Сигналната аминокиселинска секвенца се отстранува од протеините на кои има била неопходна за насочување и транспорт до соодветната клеточна органела. Некои протеини се синтетизираат во биолошки неактивна форма (такви се зимогените, проензимите и прохормоните), а по протеолитичкото пресекување меѓу специфични аминокиселински остатоци се создаваат биолошки активните протеини. На пример, инсулинот настанува со специфична протеолиза на проинсулинот, а химотрипсинот од химотрипсиногенот. Покрај интрацелуларната локализација, протеазите се лачат и во дигестивниот тракт на животните каде ги хидролизираат ингестираните протеински состојки од храната и со тоа имаат клучна улога во неговата физиологија.

Активноста на повеќето протеази можат селективно да се намали или запре со **протеазни инхибитори**. Во лабораториски услови, хелаторите на дивалентните јони (EDTA, на пример) можат да се користат за инхибиција на протеазите за кои е неопходно присуство на такви јони, каков што е  $Mg^{2+}$ . Постојат и специфични инхибиторни соединенија и протеини. На пример, силни инхибитори на серин-протеазите, какви што се трипсинот и химотрипсинот се: апротининот, кој е мал глобуларен протеин и фенилметилсулфонил флуоридот (PMSF), кој е органско соединение.

## Разградување на протеините посредувано со убиквитин

Во еукариотските клетки постојат неколку интрацелуларни протеолитички механизми за деградација на протеините кои имаат погрешна конформација или се денатурирани, како и за нормалните протеини кои се застарени или чија концентрација треба да се намали. За разлика од лизозомскиот пат, разложувањето на протеините со цитосолните механизми се врши во посебни протеолитички молекуларни структури наречени **протеазоми**. Протеините се насочуваат кон деградација во протеазомот само доколку се хемиски модифицирани со додавање на посебен протеин означен како **убиквитин**. Овој кус полипептид со должина од 76 аминокиселински остатоци, делува како молекуларна етикета со која протеините се обележуваат и насочуваат за протеолитичка деградација во протеазомот.

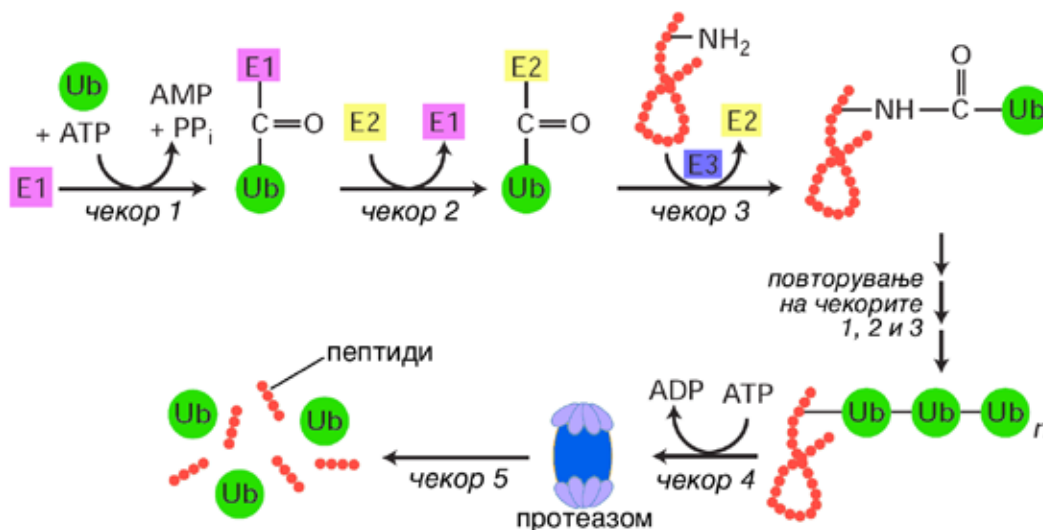
Убиквитинот е наречен така поради тоа што е убиквитарен, т.е. универзал-

но е распространет кај сите еукариотски клетки. Аминокиселинската секвенца на убиквитинот е една од еволуциски највисоко конзервираните досега најдени, што укажува на неговата енормна важност во базичните клеточни процеси. Секвенцата на овој протеин кај квасните габи се разликува од хуманиот убиквитин за само 3 од вкупно 76 аминокиселински остатоци и покрај тоа што овие два организми се еволуциски оддалечени стотици милиони години.

Обележувањето на „застарениот“ или погрешно здиплениот протеин со убиквитин се нарекува и **убиквитилагања**.

Овој процес се одвива низ три чекори (слика 6-26):

1. активација на **убиквитин-активирачкиот ензим (E1)** преку реакција на адисија при што се троши АТФ;
2. ковалентно врзување на активираниот убиквитин со цистеинските остатоци од **убиквитин-конјугирачкиот ензим (E2)**;
3. создавање на пептидна врска меѓу убиквитин-E2 комплексот и лизинските остатоци од целниот протеин кој се обележува за деградација. Овој чекор е посредуван со ензимот **убиквитин лигаза (E3)**.

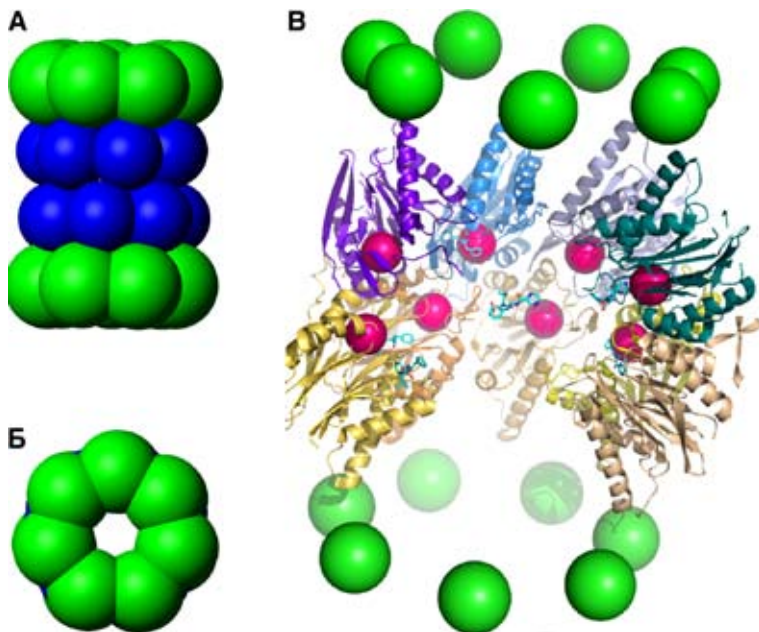


**Слика 6-26:** Разградување на протеините во протеазом посредувано со убиквитин.

Овие три чекори се повторуваат поголем број пати при што ковалентно се врзуваат сè повеќе убиквитински молекули со протеинот кој е потребно да се деградира. Протеинот кој е вака обележан со т.н. **полиубиквитинска верига**, се разложува со протеолитичката активност на протеазомот, при што се троши енергијата на АТФ и се добиваат куси пептиди (деградациски продукти) и се ослободуваат интактни убиквитински молекули.

Протеазомите се наоѓаат во клетките на сите еукариотски организми, археите и кај некои бактерии. Во еукариотските клетки, протеазомите се застапени во огромно количество од речиси 1% од сите клеточни протеини и се наоѓаат во

цитосолот, јадрото и во цистерните на ендоплазматскиот ретикулум. Протеазомот е супрамолекуларна формација во која се врши протеолиза, па, се означува и како молекуларен „гробар“ на протеините.



**Слика 6-27:** Структура на протеазомот 20S. На панелите **A** и **B** е прикажана централната единица на протеинскиот агрегат, гледана од страна и од одозгора, соодветно. На панелот **C** е прикажан расклопениот (дисасемблиран) комплекс, при што се прикажани повеќето протеински компоненти. Каталитичните региони (со треонинските остатоци во активните центри) се прикажани како сфери обоени со виолетова боја.

Поради сложеноста, овој голем протеински комплекс може да се смета и за една од клеточните молекуларни машини. Протеазомот има форма на шуплив цилиндар кој се нарекува централна единица или 20 протеазомска компонента (ознаката *S* се однесува на Сведбергските единици). Цилиндарот е составен од четири прстени од по седум поединечни полипептиди (слика 6-27). Во внатрешноста на оваа структура се одвива каталитичната активност на протеазомот.

Разложувањето на протеините со убиквитин-протеазомскиот систем има клучна улога и во регулацијата на повеќе процеси, какви што се: клеточниот циклус, апоптозата, ген-ската експресија, одговорот кон оксидативниот стрес, имунолошкиот одговор, растот индуциран со сигнали кај растенијата и други.

Разложувањето на протеините со убиквитин-протеазомскиот систем има клучна улога и во регулацијата на повеќе процеси, какви што се: клеточниот циклус, апоптозата, ген-ската експресија, одговорот кон оксидативниот стрес, имунолошкиот одговор, растот индуциран со сигнали кај растенијата и други.

## 6.9 Абнормална конформацијата на протеините

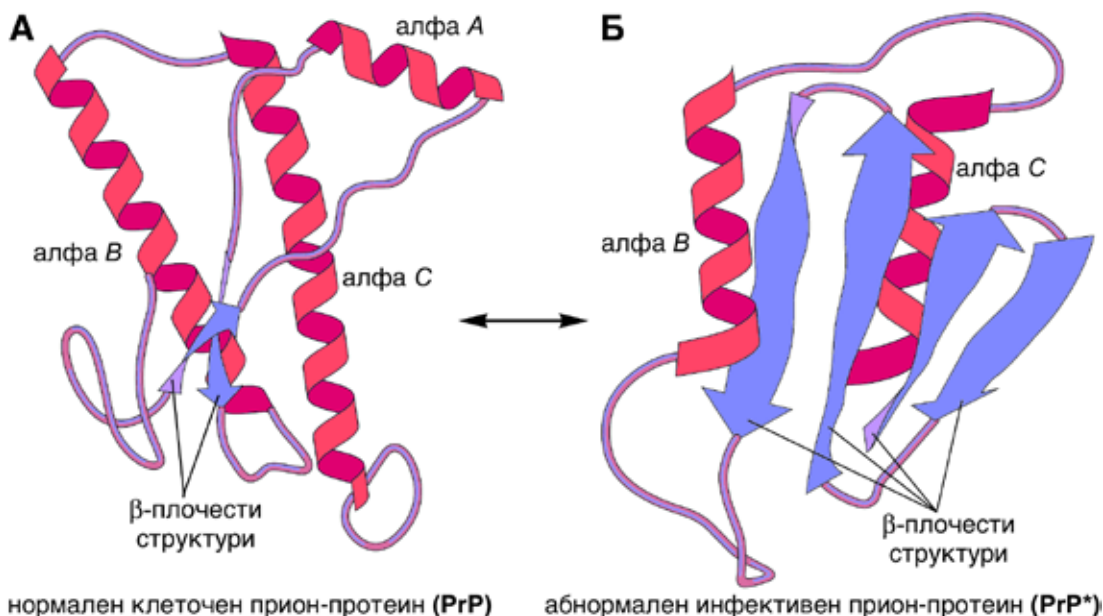
Како што е веќе напоменато, протеините било самостојно или пак, помогнато од хапероните или хаперонините, ја заземаат својата нативна, правилна конформација која, во најголем број примери, е определена од примарната структура, т.е. од аминокиселинската секвенца. Така здиплените полипептиди стекнуваат единствена конформација која е хемиски и енергетски најстабилна и е биолошки активна.

Поновите истражувања покажуваат дека во ретки исклучоци, протеините можат да бидат здиплени во алтернативни конформационски форми кои влијаат врз нивната биолошка функција или ги обележуваат таквите молекули за протеолитичка деградација и акумулирање на протеолитичките фрагменти во клетките. Такви-

те промени можат да предизвикаат сериозни заболувања кај луѓето и животните. Погрешното здиплување на полипептидите може да биде резултат на несоодветна посттранслациска модификација на самиот полипептид или на генетска мутација, а понекогаш и поради непознати причини. Во некои случаи кога протеините заземале погрешна конформација, истите имаат тенденција да агрегираат во клетките со што сериозно ги оштетуваат или предизвикуваат нивна смрт. Крупните протеински агрегати кои се отпуштаат од умерените клетки имаат тенденција да се акумулираат во екстрацелуларниот матрикс и да доведат до оштетување на ткивото.

Нервните клетки се особено чувствителни на вакво оштетување. Во патогенезата на некои чести невродегенеративни заболувања какви што се Алцхајмеровата и Хантингтоновата болест учествуваат протеински агрегати настанати поради акумулирање на определени протеини со стабилна, но, абнормална тридимензионална конформација во нервните клетки. Кај Алцхајмеровата болест, на пример, иако основната причина (етиологија) на заболувањето е сè уште непозната, се претпоставува дека амилоидниот прекурзорен протеин стекнува погрешна конформација при која абнормално се создаваат  $\beta$ -плочести структури наместо  $\alpha$ -хеликалните структури, со што протеинот стекнува отпорност кон нормалната протеолиза. Тоа предизвикува акумулирање на таквиот протеин и создавање на филаментозни патолошки структури од  **$\beta$ -амилоид** во мозокот на заболените лица.

Исклучителен пример се и **прионските заболувања** какви што се скрапи кај овците, говедската спонгиформна енцефалопатија (популарно позната како болест на лудите крави) и неколку заболувања кај луѓето (Кројцфелд-Јакобовата болест,



**Слика 6-28:** Различни конформации кои може да ги заземе прион-протеинот и покрај истата примарна структура (аминокиселинска секвенца). **А:** конформација на нормалниот прион-протеин (PrP или PrPC) кој е присутен во нервните клетки на здравите индивидуи. **Б:** абнормална конформација на мутираниот прион-протеин (PrP\* или PrPSc) кај индивидуи со некои невролошки заболувања.

„куру“ кај некои домородни племиња во Нова Гвинеа кои практикувале канибализам, и други). Кај овие невролошки заболувања се јавува сунѓеровидна (спонгиформна) дегенерација на нервното ткиво предизвикана од една иста причина: неправилна конформација на **прион-протеинот** ( $\text{PrP}$  или  $\text{PrP}^{\text{C}}$ ). На **сликата 6-28** е прикажан еден од претпоставените модели за конверзија на нормалниот прион-протеин ( $\text{PrP}$ ) во **инфективен прион-протеин** ( $\text{PrP}^*$  или  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ ). Притоа, наместо три подолги  $\alpha$ -хеликси и две мошне куси  $\beta$ -плочести структури во полипептидот, кај абнормалниот прион-протеин има четири долги  $\beta$ -плочи и две покуси  $\alpha$ -хеликални структури, со што се менува и целата конформација на полипептидот.

За жал, нормалниот протеин  $\text{PrP}$  има својство мошне лесно да преминува во абнормалната форма  $\text{PrP}^*$  и тоа преку своевидна верижна реакција. Молекуларното „допирање“ на абнормалниот прион-протеин  $\text{PrP}^*$  го конвертира и нормалниот  $\text{PrP}$  молекул во абнормален, а потоа тие две молекули во контакт со други протеини  $\text{PrP}$  ги конвертираат во  $\text{PrP}^*$ , со што прогресивно се распространуваат молекулите  $\text{PrP}^*$  низ мозочното ткиво. Абнормалните прионски протеини имаат склоност кон меѓусебно агрегирање и создавање филаментозни структури кои се резистентни на дејството на протеазите.

Се смета дека токму тие карактеристики се клучни за патогенезата на прионските заболувања на централниот нервен систем, кои се прогресивни, неизлечиви и фатални. Невообичаената отпорност на прион-протеините  $\text{PrP}^*$  кон денатурација предизвикана со топлина и дезинфициенси, резултира со лесно пренесување од заболени врз здрави индивидуи. Тоа е е, засега единствен, пример за инфективен протеин, по што прионот и го добил името (од: **пр**отеинска **ин**фективна честичка, и **-он**, од вирион-вирусна честичка:).

Имено, абнормалните приони се инфективни агенси без нуклеински киселини, па, не можат да се класифицираат како вируси иако се заразни и предизвикуваат смртоносни заболувања кај луѓето и животните. Појавата на повеќе случаи на спонгиформна енцефалопатија кај луѓе кои консумирале месо од т.н. „луди крави“ доволно ја илустрира реалната опасност од прионите.

Прионските заболувања заслужуваат посебно место во проучувањето на молекуларната биологија поради неколку карактеристики. Имено, прионските протеини се меѓу ретките примери на полипептиди кои можат да бидат здиплени во различни алтернативни конформациски форми.

Понатаму, прион-протеинот е кодиран од генот *PRNP*, и некои случаи на спонгиформна енцефалопатија кај луѓето се предизвикани од генска мутација во овој ген, со што и кодираниот прион-протеин има мутирана аминокиселинска секвенца. Таквата примарна структура го прави мутантниот прион-протеин склон да ја заземе абнормалната конформација и да стане прион-протеин  $\text{PrP}^*$ .

Причината за појава на инфективните абнормални прион-протеини  $\text{PrP}^*$  со нормална аминокиселинска секвенца не е позната. Некои истражувачи претпоставуваат дека постои, сè уште неоткриен, протеин „икс“ (X) кој иницијално ја менува конформацијата на нормалниот во прионски протеин, по што верижната реакција доведува до ширење на истите.

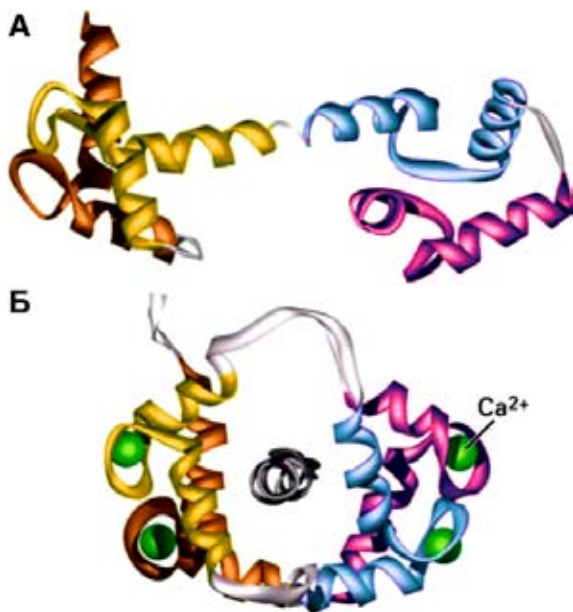
Прионските заболувања се единствени и по тоа што можат да бидат спорадични, генетски и инфективни, што е изолиран пример во целокупната патологија.



## 6.10 Алостерија и алостерична модификација

Конформацијата на некои протеини значително се променува при врзувањето со мали молекули наречени **лиганди**. Тоа се најчесто мали органски молекули (јаглекхидрат или аминокиселина), супстрати, јони или протеини со пониска молекулска маса. Промената на протеинската конформација индуцирана со врзување на лигандот се нарекува **алостерична модификација** или **алостерија** (израз што означува промена на формата). Овој феномен може да предизвика различни ефекти, какви што се промена на ензимската активност на протеинот или зголемен афинитет на протеинот кон некој друг лиганд, на пример. Во зависност од тоа дали карјниот резултат на промената е активација или инхибиција, лигандот кој ја предизвикува алостеричката модификација понекогаш се означува и како алостеричен ефектор или инхибитор, соодветно.

Алостеричките модификации на некои протеини имаат улога и на **молекуларни прекинувачи** за модулирање на активноста на истиот или на друг протеин, како и за регулирање на многу интрацелуларни процеси. На пример, калмодулинот е протеин кој има четири места за врзување со калциумовите јони. Конформацијата на калмодулинот при врзување со калциумови јони драстично се менува и овозможува негово обвивање околу определени полипептиди, со што ја менува нивната активност (**слика 6-29**).



**Слика 6-29:** Алостеричка промена на конформацијата на протеинот калмодулин во отсуство (**А**) и при врзување со калциумови јони (**Б**). Прикажан е и полипептидот околу кој е обвиен калмодулинот.

Алостеричката модификација е најчест механизам за регулација на ензимската активност во биолошките системи. Покрај тоа, алостеријата е клучна за протеините-регулатори на транскрипцијата кои се способни за врзување со специфични региони од DNA-молекулите само кога се врзани со определен лиганд или обратно кога не се врзани со лигандот. Сепак, алостеричкиот механизам не е застапен кај сите DNA-регулаторни протеини.

Изразот **кооперативното врзување** се користи кога еден регион од протеинот се врзува со DNA-хеликсот, додека друг дел од истиот протеин се врзува со определен ензим (како RNA-полимераза, на пример). Таквата интеракција овозможува специфично доближување и насочување на ензимот врз определен DNA-регион или ген.



## 6.11 Хемиски модификации на протеините

Голем дел од протеините се градени само од аминокиселини и во литературата често се означуваат како **едноставни или прости протеини**. Покрај нив, постојат и протеини во чија структура учествуваат разновидни хемиски соединенија, па, овие протеини понекогаш се нарекуваат **конјугирани протеини**. Кога неаминокиселинскиот дел од протеинскиот молекул е клучен за функцијата, таквиот хемиски остаток се означува како **простетичка група**. Таа може да биде поврзана со некоја од аминокиселинските остатоци во полипептидот со помош на ковалентна врска или со некоја од слабите хемиски врски. Во последниов случај, денатурацијата на протеинот со соодветен хемиски или физички метод резултира со раздвојување на протеинскиот дел од полипептидната верига. Протеините од кои е отстранета простетичката група се нарекуваат **апопротеини**.

Конјугираните протеини можат да се класифицираат според хемиската природа на неаминокиселинската компонента. Примери за такви протеини се следниве класи:

- **гликопротеини** - содржат јаглехидратни остатоци. Типичен пример се протеините какви што се фибронектинот и протеогликаните кои се експортираат надвор од клетката и се главни компоненти на екстрацелуларниот матрикс. Обемно гликозилирани протеини се и имуноглобулините од класата G кои се типични антитела што циркулираат во плазмата кај вертебралните организми и се вклучени во хуморалниот имун одговор. Гликозилирани се и екстрацелуларните региони од голем дел мембрански протеини.
- **липопротеини** - конјугирани со липиди. Такви конјугати се плазмините липопротеини чија главна функција е транспорт на липидите до местата каде што се метаболизираат и каде што се врши активна синтеза на мембрани.
- **нуклеопротеини** - рибозомите и вирусните честички се примери за протеини врзани со нуклеински киселини. Во поширока смисла, дури и хромозомите претставуваат гигантски комплекси меѓу еден непрекинат DNA-хеликс и огромен број протеински молекули.
- **фосфопротеини** - содржат фосфатни групи и се добиени со естерификација на хидроксилните групи од серинските, треонинските или тирозинските остатоци во полипептидниот молекул. Пример е млечниот протеин казеин, кој е обемно фосфорилиран и преку кој доенчињата на цицачите внесуваат големи количества на фосфор. Присуството или отсуството на фосфорна група на определена аминокиселинска позиција кај некои регулаторни и сигнални протеински молекули има клучна улога во определувањето на нивната активност или неактивност. Многу чекори во метаболичните и во сигналните клеточни патишта се регулирани преку статусот на фосфорилација на некои протеински молекули.
- **металопротеини** - кај кои определени метални јони имаат клучна важност за функцијата на протеинот. Кај феритинот, на пример, железото се складира и служи како резерва во организмот. Кај некои ензими, металниот атом учествува во каталитичната функција како клучен дел од активниот центар. Хемопротеините се посебна поткласа на металопротеини кај кои простетичката група е составена од **хем**, односно фeroпротопорфирин IX. Претставници на овие протеини се хемоглобинот и миоглобинот кои се присутни кај огромен број анимални видови.

- **флавопротеини** - содржат **флавин**, хемиско соединение кое е есенцијално за активноста на повеќе важни оксидоредуктази кои учествуваат во процесите на електронски транспорт и оксидативната фосфорилација.

## 6.12 Структурна класификација на протеините

Постојат повеќе структурни класификации кои се базираат на тридимензионалната форма на протеинските молекули и нивната растворливост во вода или разредени соли. Иако некои од овие класификациски системи се веќе опсолетни, сепак сè уште можат да се сретнат во литературата. Според терциерната структура, протеините се класифицирани на: **фибриларни** и **глобуларни**. Мембранските протеини се посебен тип на глобуларни протеини вклопени во фосфолипидниот слој на клеточните мембрани.

### Фибрилари (кончести) протеини

Овој тип на протеински молекули има релативно едноставна, регуларна линеарна структура. Обично се нерастворливи во водени раствори и имаат структурна улога во анималните клетки и ткива, а типични примери за вакви протеини се: колагенот, кератинот и фиброинот.

### Глобуларни протеини

Овие протеини имаат приближно или неправилно сферична форма и содржат многубројни секундарни структури ( $\alpha$ -хеликси и/или  $\beta$ -плочи). Повеќето ензими и регулаторни протеини имаат молекуларна архитектура на глобуларни протеини. Главна структурна карактеристика на глобуларните протеини е тоа што нивната површина (надворешност) е хидрофилна, па, лесно се растворливи во водени раствори, што е од големо значење за нивната функција. Спротивно, внатрешноста на глобуларните протеини е главно хидрофобна.

Во натамошниот текст ќе бидат прикажани по неколку примери на фибрилари и глобуларни протеини. Покрај нив, поради специфичната структура и, пред сè, големата важност за молекуларната биологија, посебно ќе бидат прикажани и основните карактеристики и примери на мембранските протеини.

## 6.13 Биолошки функции на протеините

Како извршители на биолошките функции, протеините учествуваат во речиси сите клеточни активности, по кои и можат функционално да се класифицираат. Структурата и физичко-хемиските особини на протеините овозможуваат тие да воспостават нековалентни интеракции со други молекули. При таквите интеракции, протеините можат да ја менуваат својата форма и тридимензионална конформација на што и се должи нивната неверојатна функционална варијабилност. Треба

да се има предвид дека кај повеќето биолошки процеси, истовремено учествуваат неколку протеински класи.

Протеините можат да се класифицираат според биолошки функции кои ги вршат во организмите:

- 1. Структурна улога** - мономерните субединици од кои се изградени структурните протеини полимеризираат во долги влакнести или во фибриларни мрежести структури чија главна улога е одржување на формата и механичката цврстина на клетките и ткивата, како и структурата на екстрацелуларниот матрикс. Структурни протеини, меѓу преостанатите, се и: колагенот (главната состојка на соединителните ткива), кератинот (во косата, ноктите, канците итн.), фиброинот во свилата, еластинот во епителните ткива и многу други.
- 2. Каталитични реакции** - ензимите, со исклучок на мал број рибозими, се протеински катализатори кои извршуваат илјадници хемиски реакции во клетките и вон нив и тоа со неверојатна ефективност и специфичност. Ензимите се и најголема класа на протеини, воопшто. Досега се познати над 3000 различни ензими и секој од нив има строго специфична функција и делува само врз определена хемиска реакција. Активноста на ензимите е импресивна: тие ја забрзуваат реакцијата дури и до  $10^{16}$  пати во однос на некатализираната реакција. Во својата молекуларна структура, ензимите имаат т.н. **активен центар** каде што се врзува супстратот и каде што се одвива специфичната реакција. Активноста на некои ензими е зависна од непротеински компоненти кои се означуваат како **коензими**. Често тоа се јони ( $Mg^{2+}$  или  $Zn^{2+}$ , на пример) или сложени органски соединенија (на пример: пиридоксал фосфат). Самиот ензим без непротеинскиот коензим се означува и како **апоензим**. Целиот ензим (доколку сите полипептиди доколку ензимот е мултимерен), заедно со коензимот се нарекува **холоензим**. Ензимите се класифицирани според природата на реакцијата која ја катализираат. На пример, ензимите кои го катализираат преносот (трансферот) на фосфатна група од еден до друг молекул, се нарекуваат фосфотрансферази, додека тие кои ги катализираат оксидо-редуктивни реакции се оксидоредуктази.
- 3. Регулација** - протеинските и пептидните хормони, други лиганди (аминокиселини, нуклеотиди, стероиди, па, дури и гасови, каков што е азотниот моноксид), како и факторите на раст можат да имаат улога на сигнални молекули во регулацијата на метаболизмот и на многу други биохемиски, генетски и физиолошки процеси во организмите. Врзувањето на тие сигнални молекули со соодветните рецептори на клеточната мембрана или со соодветен интрацелуларен рецептор предизвикува низа на реакции кои доведуваат до промена во клеточната функција. Примери за протеински хормони се инсулинот и глукагонот, кои се вклучени во регулираат нивото на глюкозата во крвта кај човекот и многу животни. Факторите на раст се протеински молекули кои учествуваат во регулацијата на клеточната делба и диференцијацијата. Такви регулаторни молекули, на пример, се: тромбоцитниот фактор на раст (PDGF) и епидермалниот фактор на раст (EGF). Протеините кои имаат способност за специфично препознавање на определени регулаторни DNA-секвенци и врзувањето со нив имаат клучна во регулацијата на генската експресија и многу други процеси во кои се инволвирани DNA или RNA-молекулите.
- 4. Транспорт** - како што е претходно опишано, пренесувањето на јоните и молекулите низ клеточните мембрани се врши преку посебни транспортни мембрански

протеини каков што е глюкозниот транспортер. Покрај мембранскиот транспорт, посебни протеини служат за пренесување на специфични молекули во разни ткива и органи. На пример, хемоглобинот го транспортира кислородот од алвеолите на белите дробови до ткивата, додека липопротеините (LDL и HDL) кои ги пренесуваат липидите од цревата и од црниот дроб до други органи. Трансферинот и церулоплазминот се плаزمини протеини кои ги транспортираат јоните на железото и бакарот, соодветно.

5. **Специфично меѓуклеточно препознавање** - овој тип на функции се остварува преку интеракција на протеините од клеточната мембрана со соодветни мембрански протеини од друга клетка. На тој начин се остварува една од најосновните и најкритични биолошки функции кај мултицелуларните организми: меѓуклеточната комуникација и сигнализација. Тие феномени опфаќаат низа интеракции кои се специфични за различни клеточни типови и ткива и се клучни за развојот и опстанокот на целиот организам. Препознавањето е клучно и за адхезијата на клетките со протеините од меѓуклеточниот матрикс и при реакциите антиген-антитело во текот на имуниот одговор.
6. **Движење** - контрактилните протеини, какви што се миозинот, актинот се главните компоненти на контрактилните влакна кои овозможуваат движење на цели органи и делови од телото кај животните. Динеинот и кинезинот се задолжени за движењата на цитоскелетните елементи, органелите и други материи во клетката, како и раздвојувањето на хромозомите во текот на делбата. Посебна категорија на т.н. моторни протеини овозможува линеарни и ротирачки движења на определени органели, што ќе биде понатаму објаснето преку примери.
7. **Заштита и опстанок** - голем број протеини имаат заштитна улога за организмот. Кај животните постојат голем број такви протеини кои се вклучени во разновидни физиолошки процеси за кои заеднички аспект е заштитата на индивидуата. Фибриногенот и тромбинот се протеини кои учествуваат во коагулацијата на крвта, со што обезбедуваат заштита од неконтролирано крвавење при минорни повреди на крвните садови. Имуноглобулините (антитела) се протеини кои се една од најважните компоненти на имуниот систем и се синтетизираат од посебен тип на лимфоцити. Имуноглобулините се способни строго специфично да ги препознаат соодветните антигени молекули, кои меѓу останатото се наоѓаат и кај бактериите и вирусите. Врзувањето на специфичните антитела со инфективните агенси е важен чекор во имуниот одговор на организмот при инфекцијата. Отровите кои ги лачат некои животни (некои видови змии, риби, медузи, пајаци и многу други), растенија (буника, рицин и многу други), габи (некои отровни видови печурки) и бактерии (*Vibrio cholerae*, на пример) служат за одбрана на организмите или за напад. Некои риби од Антарктикот поседуваат „антифриз“-протеини кои ја спуштаат точката на мрзнење на нивните телесни течности, со што и можат да живеат во океанската вода чија температура е пониска од нулата.
8. **Адаптерни протеини** - посебен тип протеински молекули помагаат во приближувањето и воспоставувањето контакт меѓу други протеини во рамките на некој интрацелуларен сигнален пат. Определени региони (означени и како модули) од овие адаптерни протеини специфично препознаваат структурни региони од други протеини, се врзуваат со нив, а со тоа го привлекуваат и врзуваат и насочуваат следниот протеин кој е дел од низата на соодветниот интрацелуларен

пат. Иако самите немаат ензимска активност, сепак имаат незаменлива улога во интрацелуларните сигнални патишта, делувајќи како посредници или адаптери, од каде и потекнува нивното име. Под изразот адаптерни се вклучени и протеините кои делуваат како молекуларни скелиња. Околу нив се врзуваат протеинските молекули кои ги градат мулипротеинските комплекси. Типичен пример за тоа се рибозомските протеини кои имаат улога на скеле околу кое се асемблираат (склопуваат) преостанатите рибозомски протеини и рибозомските RNA-молекули, создавајќи целосен рибозом.

9. **Стрес-протеини** - им помагаат на комплексните организми какви што се вишите безрбетници, рбетниците и вишите растенија да го се прилагодат на брзите промени во надворешната средина и да преживеат. Пример е фамилијата на ензими означена како цитохром P450 чија основна улога е детоксификација на токсичните соединенија внесени во анималните и растителните организми. Пример за стрес-протеини е и металотионеинот кој е универзално присутен во речиси сите мамалиски клетки, а неговата функција е врзување на токсичните тешки метали (кадмиум, жива, сребро и други). Нефизиолошки високата амбиентална температура и другите стресни состојби предизвикуваат синтеза на, веќе споменатите, протеини на топлотниот шок кои им помагаат на другите протеини да ја задржат својата правилна комплексна конформација. Ензимите кои се вклучени во репарацијата на оштетувањата на DNA-молекулите предизвикани со јонизирачки зрачења, исто така можат да се класифицираат во оваа функционална група протеини.
10. **Резервни протеини** - некои есенцијални соединенија или јони се складираат и пренесуваат во организмот преку посебни протеини. Овалбуминот во јајцата на птиците и казеинот во млекото кај цицачите обезбедуваат метаболичен извор на азот неопходен за ембриогенезата, односно растот. Растителните протеини каков што е зеинот има слична улога во семињата кои ртат.
11. **Други функции** - некои протеини имаат биолошка улога која не е вклопива во претходните категории. Протеинот монелин кој е изолиран од едно западноафриканско растение (*Dioscoreophyllum cumminsii*), се врзува за гутаторните рецептори за сладок вкус на површината на јазикот и обезбедува околу 100000 пати посладок вкус од сахарозата (при споредба на моларната маса) и се очекува негова употреба како засладувач во прехранбената индустрија, на место на цикламатот, аспартамот и другите вештачки засладувачи. Резилинот е протеин во зглобовите кај некои артроподи кој има речиси неверојатни еластични својства. Лепливите протеини кои ги лачат некои морски школки им овозможуваат исклучително силно прицврстување врз мазни површини, па, се очекува комерцијална примена на ваквите протеини во низа технолошки производи.
12. **Молекуларни машини** - Поради својата сложена градба и циновска молекуларна маса, се издвојува посебна структурна и функционална класа на протеини кои во последно време се означуваат и како молекуларни машини. Поврзувањето на повеќе независни протеини, какви што се ензимските комплекси, во агрегати или макромолекуларни структури, може да се смета и за највисоко ниво на протеинската структура. Таквите молекуларни агрегати имаат, типично, вкупна молекуларна маса поголема од 1 милион Далтони (1 MDa), содржат десетици, па, и стотици полипептидни вериги, во некои случаи содржат и нуклеински киселини, а имаат големина од 30 до 300 nm. Примери за некои поважни или подобро проучени молекуларни машини се прикажани на **табелата 6-2**.

**Табела 6-2: Примери за молекуларни машини**

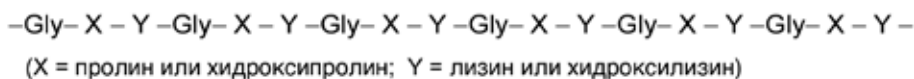
назив	главни компоненти	локализација во клетката	функција
<b>реплизом</b>	DNA-полимераза, хеликаза, примаза, лигаза	јадро	DNA-репликација
<b>комплекс за иницирање на транскрипцијата</b>	RNA-полимераза, промотор-врзувачки протеин, хеликаза, општи транскрипциски фактори	јадро	RNA-репликација
<b>сплајсеозом</b>	незрела mRNA, snRNA-молекули, протеински фактори	јадро	mRNA-сплајсинг
<b>комплекс на јадрената пора</b>	нуклеопорини	јадрена мембрана	регулација на транспортот низ јадрената мембрана
<b>рибозом</b>	органела составена од rRNA-молекули и рибозомски протеини, mRNA и протеински фактори (IF, EF)	цитоплазма, површина на ендоплазматски ретикулум	синтеза на протеини
<b>хаперонин</b>	GroEL, GroES	цитоплазма, митохондри, ендоплазматски ретикулум	помош во воспоставувањето и одржувањето на нативната конформација на протеините
<b>протеазом</b>	повеќе протеински компоненти	цитоплазма	разградување на протеините
<b>фотосистем</b>	повеќе протеински молекули и пигменти кои ги градат комплексот за прием на светлината и реакцискиот центар	тилакоидна мембрана во растителните хлоропласти, плазма мембрана кај фотосинтезирачките бактерии	фотосинтеза
<b>каскада на MAP-киназата</b>	адаптерен протеин, повеќе различни протеин-кинази	цитоплазма	сигнална трансдукција
<b>саркомера</b>	миозински и актински филаменти, тинеин/небулин и други протеини	цитоплазма на мускулните клетки	контракција

## 6.14 Примери за структура и функција на протеините

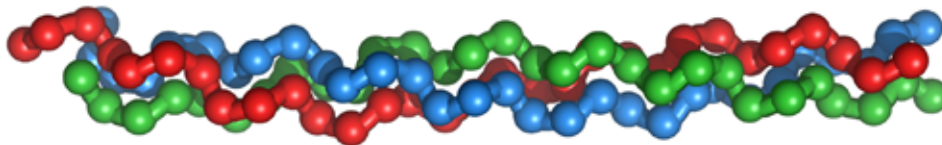
### Структурни протеини: колаген

Колагенот е ригиден протеин кој не се растегнува и кој е главна компонента на животинските соединителни ткива, какви што се тетивите, ѓрскавиците, коските, забите, кожата и крвните садови. Тој е најзастапениот протеин во анималното царство, воопшто, а кај цицачите, учествува со 25% од вкупното количество протеини во организмот. Под терминот колаген се опфатени повеќе типови протеински молекули со слични својства, класифицирани според основните структурни и функционални особини. Познати се 27 типови на колаген, означени со римски броеви: I - XXVII. На пример, типот I е најзастапен во тетивите, лигаментите и коските, типот II во ѓрскавиците, типот III во артериите, гастроинтестиналниот тракт и утерусот, додека

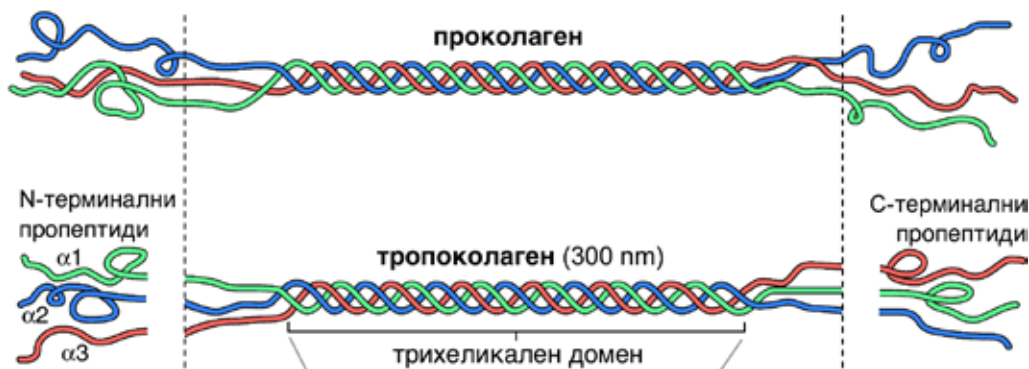
#### A аминокиселинска секвенца



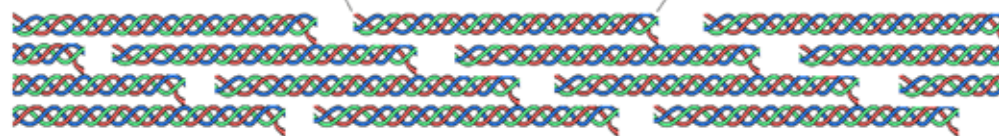
#### Б структура на тројниот хеликс



#### В создавање на тропоколаген од проколагенот



#### Г формирање на колагенски фибрили



Слика 6-30: Молекуларна структура на колагенот.



типот IV доминира во базална мембрана кај епителните ткива.

Полипептидите од кои е граден колагенот имаат карактеристичен аминокиселински состав кој е клучен за неговата тридимензионална структура и за специфичните механички особини (**слика 6-30, А**). Секој трет аминокиселински остаток во полипептидот (субединицата) е глицин, а од преостанатите доминираат пролин, лизин и хемиски модифицираните аминокиселини хидроксипролин и хидроксилизин. Општиот структурен мотив на колагенските полипептиди е: **(Gly-X-Y)<sub>n</sub>**, каде X е или пролин или хидроксипролин, а Y е лизин или хидроксилизин. Колагенот не создава вообичаен  $\alpha$ -хеликс, туку трите полипептидни вериги се преплетуваат во трихеликална структура (**слика 6-30, Б**).

Ваквата молекуларна архитектура е овозможена со присуството на глицин, кој е просторно доволно ситна аминокиселина (има водороден атом наместо бочна R-група) за да се вклопи во местата каде меѓусебно се допираат секоја од веригите од тројниот хеликс. Бочните групи од преостанатите аминокиселини се просторно преголеми за внатрешната оска на тројниот полипептиден хеликс.

Основна структурна единица на колагенот е **тропоколагенот**, составен од три независни полипептидни вериги кои се преплетуваат меѓусебно, формирајќи троен хеликс. Синтезата на колагените ќе биде изложена преку примерот за типот I. Со транслацијата во рибозомите во грануларниот ендоплазматски ретикулум (ГЕР) се создаваат трите полипептидни субединици. Секој од полипептидните вериги содржи и сигнална секвенца за насочување кон луменот на ГЕР по синтезата. Во оваа органела се отстрануваат кусите пептиди кои ги содржат сигналните секвенци. Во луменот на ГЕР се врши хидроксилација на некои од пролинските и лизинските остатоци. Важно е што во овој процес, како кофактор, учествува и аскорбинската киселина (витамин Ц). Токму од тие причини, недостатокот на овој витамин резултира со тешки нарушувања на структурата на колагенот, а со тоа и на градбата и функцијата на многу потпорни ткива во организмот. Трите полипептидни вериги се преплетуваат создавајќи троен хеликс кој се нарекува **проколаген** (**слика 6-30, В**). Проколагенскиот молекул се транспортира до Голџиевиот систем, каде што се пакува во секреторни везикули, а истите се изнесуваат од клетката со процесот на егзоцитоза во екстрацелуларниот простор. Во екстрацелуларниот матрикс, ензимот проколаген-пептидаза врши прецизна хидролиза со која се одвојуваат N-терминалните и C-терминалните пропептиди и се добива фибриларниот **тропоколаген**. Тропоколагенските молекули се здружуваат во паралелно поставени низи кои меѓусебно се врзани преку хидроксилираните аминокиселински остатоци, со што создаваат **колагенски фибрили** (**слика 6-30, Г**). Механичката сила на колагенските фибрили е импресивна: секоја може да издржи тежина од речиси 10 kg.

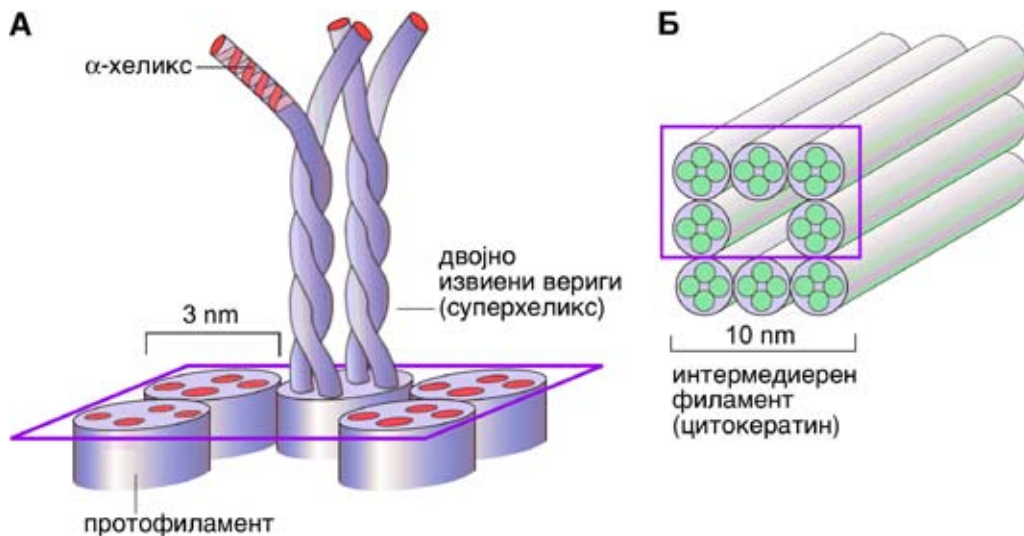
Во коските, калциумовите соли во форма на долги минерални кристали (главно хидроксиапатит) се таложат во просторите околу линеарните полипептидни единици на колагенот и создаваат исклучително цврсто коскено ткиво.

Нецелосната хидролиза на колагенот предизвикува негова денатурација и раздвојување на трите полипептидни вериги, со што се губи и целокупната фибриларна структура. Во воден раствор, ваквиот дериват создава желатиозна маса која е позната како желатин и има примена во човековата исхрана.

## Структурни протеини: кератин

Кератинот опфаќа фамилија на слични фибриларни структурни протеини кои се распространети во анималниот свет, особено кај ѓртениците. Како и преостанатите фибриларни протеини, кератините се нерастворливи во вода и се механички цврсти, но, не се минерализирани, за разлика од колагените. Од кератинот, механички поцврст протеин единствено е хитинот кој е распространет кај инвертебралните организми. Кератинот е основен протеин во структурите кои се творби на кожата. Постојат два основни типа на кератин:

- **$\alpha$ -кератинот** е граден од по два пара на полипептиди со  $\alpha$ -хеликална структура, кои се извиени еден преку друг создавајќи структурен елемент означен како протофиламент (**слика 6-31, А**). Во секвенцата на  $\alpha$ -кератинот доминира т.н. квазирепетитивен сегмент составен од 7 аминокиселински остатоци од типот:  $(a-b-c-d-e-f-g)_n$ , каде со букви се означени аминокиселинските остатоци. Иако не е вистински репетитивен мотив, остатоците *a* и *d* најчесто се неполарни аминокиселини. Овој тип кератин се наоѓа во влакната од косата и волната, ноктите, роговите, канците и копитата кај цицачите. Од  $\alpha$ -кератин е градена и посебна класа на интермедиерни филаменти кои се дел од цитоскелетот, а се наоѓаат и во екстрацелуларниот матрикс (**слика 6-31, Б**);



**Слика 6-31:** Структура на  $\alpha$ -кератинот. **А:** меѓусебно преплетување на  $\alpha$ -хеликалните кератински молекули и создавање на кератински протофиламенти. **Б:** осум кератински протофиламенти здружени во интермедиерен филамент кој учествува во градбата на цитоскелетот.

- **$\beta$ -кератинот** е граден од  $\alpha$ -хеликални и од  $\beta$ -плочести структури. Овој тип на кератин е поцврст и е најзастапен во лушпите, оклопите и канците кај влечугите, како и во пердувите, клуновите и канците кај птиците. **Фиброинот** во свилата

е протеин граден исклучиво од  $\beta$ -плочи и во неговиот состав доминираат аминокиселините со просторно мали бочни групи (глицин, аланин или серин). Тие лесно се вклопуваат во речиси кристалната структура на фиброинот, на што се должи и големата механичка цврстина на свилата.

Кератинските протеини се наоѓаат и во инвертебралните организми (кај Брахиоподите и некои валчести црви, на пример), како и во лушките на некои риби (кај Целокантите, кои се сметаат за „живи фосили“).

Најцврст тип е  $\alpha$ -кератинот во рогот на носорозите во кој цистеинот е застапен со околу 18% од сите аминокиселински остатоци. Дисулфидните ковалентни врски кои се формираат меѓу просторно соседните цистеински остатоци во овој тип на  $\alpha$ -кератин доведуваат до многу поголема структурна стабилност, а со тоа и до механичка цврстина на протеинот.

### Пример за транспортни протеини: миоглобин

Историски, ова е првиот протеин чија тридимензионална структура била објаснета уште во 1950-тите години од страна на Кендру (John Kendrew) и соработниците. Миоглобинот е релативно мал мономерен протеин составен од полипептид со должина од 153 аминокиселински остатоци и со молекулска маса 16 700. Содржи и еден протопорфириински прстен (**хем група**) во која се наоѓа и еден атом на железо ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Оваа хем група се наоѓа и во хемоглобинот во еритроцитите и има висок афинитет кон кислородот. Таа е и причина за темно црвено-кафената боја на мускулното ткиво.

Основната функција на миоглобинот е врзување и пренос на кислородот во мускулните клетки. Животните кои нуркаат имаат многу високи концентрации на миоглобин во своите мускулни ткива, па, оттаму е и кафената боја на мускулите кај овие суштества.

Основниот полипептиден њрбет на миоглобинот создава осум релативно прави  $\alpha$ -хеликси меѓу кои некаде се наоѓаат и  $\beta$ -завои (**слика 6-32**).

Најдолгата  $\beta$ -плоча содржи 23 аминокиселински остатоци, а најкусата само 7. Повеќе од 70% од полипептидот се вклучени во  $\alpha$ -хеликални структури. Компјутерските анализи на тридимензионалната структура на миоглобинот покажале карактеристично поставување на бочните аминокиселински групи, што ја условува конечната конформација и вкупната стабилност која, пред сè, се должи на хидрофобните интеракции.

Повеќето хидрофобни бочни групи се насочени кон внатрешниот дел од миоглобинскиот молекул, скриени од водата која го опкружува во клетките. Освен две, сите поларни аминокиселински остатоци се наоѓаат на нејзината површина и се хидратирани. Миоглобинот е толку компактно здиплен полипептид, што во неговата внатрешност можат да се сместат само две молекули на вода. Таквото густо хидрофобно „јадро“ е карактеристично за глобуларните протеини.

Поради екстензивната проучување, миоглобинот е еден вид на глобуларен протеин кој е модел во молекуларната биологија, и сознанијата кои се добиени од неговото проучување се применуваат и во расветлувањето на структурно-функционалните односи и кај многу други протеини.



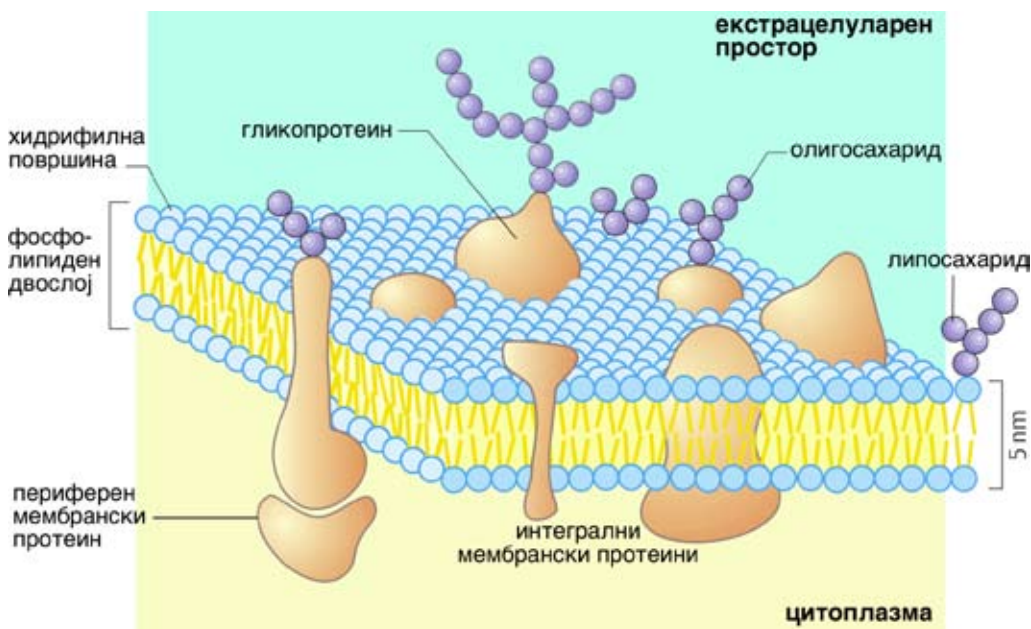
**Слика 6-32:** Структурен модел на миоглобинот.

## Мембрански протеини

Како што и асоцира името, тие се вклопени во плазмалемата, ендомембранскиот систем во клетката (ендоплазматскиот ретикулум, мембраната на Голџи системот, јадрената двојна мембрана), митохондриската, лизозомската или во мембраните на други органели. Биомембраните се градени од полутечен фосфолипиден двослој во кој се вклопени разновидни мембрански протеини. Иако основната структура ја обезбедува самиот фосфолипиден двослој, специфичните функционални карактеристики на биомембраните се должат на протеините вклопени во нив. Во зависност од типот на клетката, варира и составот, бројот и функционалноста на нејзините мембрански протеини. Во миелинската мембрана на аксоните кај нервните клетки, која има функција на електричен изолатор, протеините учествуваат со помалку од 25% од масата на мембраната. Наспроти тоа, биомембраните вклучени во синтезата на АТФ (какви што се внатрешните мембрани на митохондриите и хлоропластите) содржат приближно 75% протеини.

Спротивно на глобуларните протеини, аминокиселинските бочни групи кои се наоѓаат на надворешната површина на мембранските протеини се хидрофобни. Причината за тоа е што овие протеини се вклопени во неполярната, хидрофобна фаза од фосфолипидната мембрана. Деловите од полипептидните вериги кои формираат свиоци и излегуваат надвор од мембраната имаат хидрофилни својства. Во градбата на нивните полипептидни вериги многу често учествуваат  $\alpha$ -хеликални структури кои неколку пати ја пробиваат мембраната наизменично кон цитосолот и обратно, како извиткана змија, од што и произлегува изразот серпентинести мембрански протеини.

Протеините вклопени во биолошките мембрани можат да се разликуваат и по својата структура: можат да бидат градени главно од  $\alpha$ -хеликси или од  $\beta$ -плочести структури. Според начинот на кој мембранските протеини се поврзани со самиот фосфолипиден двослој, тие можат да се класифицираат во три класи: интегрални, периферни и на мембрански протеини врзани со фосфолипидите (слика 6-33).

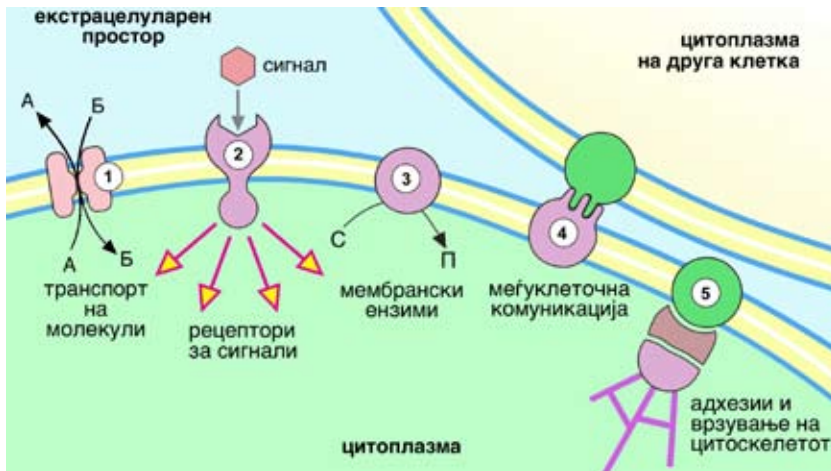


**Слика 6-33:** Типови на протеини во клеточната мембрана. Заради поедноставен приказ, протеините се претставени само шематски, без приказ на нивната структура.

**Интегралните протеини** (често означени и како **трансмембрански протеини**) физички се вклопени во фосфолипидниот двослој и целосно се провлекуваат низ него, стрчејќи од двете површини на мембраната. За разлика од нив, **периферните протеини** не се вклопени директно во фосфолипидите на мембраната, туку се поврзани нековалентно со нивните поларни групи или со хидрофилните региони од интегралните протеини преку електростатски интеракции и водородни врски. Периферните протеини често имаат улога на регулатори на мембранските ензими. Посебна класа се **протеините кои се уковтвени во фосфолипидниот двослој** на клеточната мембрана. Тие протеини ковалентно се врзани со липидни остатоци какви што се: миристоилната, палмитоилната и фарнесилната липидна група која, пак, е уковтвена во неполарниот хидрофобен регион од фосфолипидниот двослој.

Протеините на клеточната мембрана често се гликозилирани, односно на нив ковалентно се врзани разгранети јаглехидратни остатоци кои се протегаат кон екстрацелуларниот простор и имаат улога во меѓуклеточното и имунолошкото препознавање. Покрај тоа, и липидните компоненти на плазмалемата можат да бидат гликозилирани.

Според функцијата, мембранските протеини можат да се класифицираат во неколку типа (слика 6-34):



**Слика 6-34:** Основни функции на протеините од клеточната мембрана.

- 1. транспортни протеини** - пренесуваат јони и молекули од едната кон спротивната страна од биомембраната. Овие протеини ќе бидат подетално претставени во натамошниот текст;
- 2. рецепторни (мембрански) ензими** - се активираат при врзување на соодветниот екстрацелуларен лиганд (хормон, фактор на раст и други) и катализираат ензимска реакција при која се создава интрацелуларен гласник. Во голем број примери, овие рецептори имаат **протеин-киназна** активност, односно ензимската реакција предизвикува фосфорилација на самиот рецептор или на следниот протеин во каскадата на интрацелуларниот пат. Сигналот понатаму патува преку низа протеински молекули до промоторот или друга регулаторна DNA-секвенца од генот чија експресија се регулира. Крајниот ефект силно варира во зависност од рецепторот и лигандот, но, се однесува на промена на метаболизмот на клетката, нејзината делба и диференцијација и на регулацијата на генската експресија;
- 3. рецептори за сигнална трансдукција** - слично како и претходниот тип рецептори, и овие протеини ги пренесуваат сигналите од клеточната мембрана кон соодветните сигнални интрацелуларни патишта, но, самите не поседуваат каталитична активност. Во некои случаи, овие рецептори понатаму го пренесуваат сигналот до соодветен интрацелуларен ензим чиј продукт е дел од интрацелуларниот пат до самиот ген. Поради големата важност на овие рецептори, нивниот подетален опис е прикажан понатаму во текстот;
- 4. меѓуклеточна комуникација** - една од главните карактеристики на повеќеклеточните организми е координираната комуникација меѓу клетките од истиот организам. Посебни мембрански протеини имаат улога на маркери на клеточниот идентитет кои се специфични за ткивото. Кај ѓрбетниците, сите клетки поседуваат протеини од **главниот комплекс на хистокompatibilност (МНС, од англ. major histocompatibility complex)**. Комбинацијата на овие молекули е уникатна за секоја



индивидуа, па, имунолошкиот систем ги препознава клетките кои ги поседуваат овие антигени како сопствени.

- 5. адхезија со екстрацелуларниот матрикс и со цитоскелетот** - некои мембрански протеини служат за укотвување на делови од цитоскелетот како, на пример, мрежно поставениот фибриларен протеин **спектрин** веднаш под еритроцитната мембрана. Досега се откриени повеќе десетици протеини кои колективно се нарекуваат **молекули за клеточна адхезија** (CAM од англ. *cell adhesion molecules*) и ги вклучуваат фамилиите на кадерици, селектини, интегрини и CAM-молекули слични на имуноглобулините и служат за врзување со протеините од екстрацелуларниот матрикс.

## Мембрански транспортни протеини

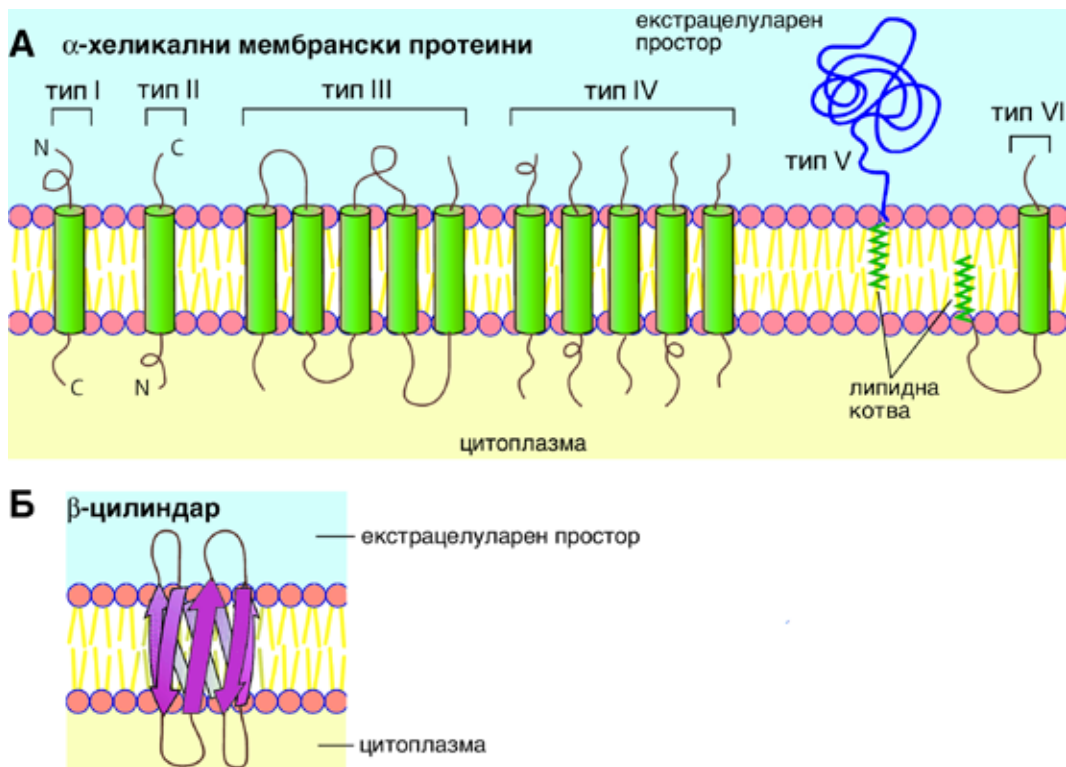
Самиот фосфолипиден слој е непропустлив за повеќето молекули растворливи во вода, за јоните и за водата. Исклучок се гасовите (кислород, јаглерод диоксид, азот), како и некои мали поларни, електростатски неутрални молекули (уреа и етанол, на пример) кои ја преминуваат биолошката мембрана преку проста (пасивна) дифузија. Селективниот пренос на сите преостанати молекули и јони низ плазмалемата и преостанатите мембрани во клетката се врши преку посебни **мембрански транспортни протеини**. Мембранските протеини се класифицирани според тополошките карактеристики во однос на мембраната, односно според тоа колку пати поминуваат низ мембраната, ориентацијата на полипептидот и начинот на кој се поврзани со истата.

Повеќето досега познати мембрански протеини содржат поголем број (типично 6 до 7)  $\alpha$ -хеликални структури. Топологијата на интегралните протеини е определена со нивната локализација во однос на фосфолипидниот двослој, како и со начинот на кој се поврзани со него. Според тие критериуми, мембранските протеини кои содржат  $\alpha$ -хеликални структури се класифицирани на шест типа (**слика 6-35, А**).

Протеините од типот I и II содржат само по еден трансмембрански  $\alpha$ -хеликс кој целосно минува низ фосфолипидната двослојна мембрана. Тие се разликуваат само по ориентацијата на полипептидните краеве во однос на мембраната: кај протеините од типот I, карбоксилниот-крај е во цитоплазмата, а аминокрајот е кон екстрацелуларниот простор, додека кај типот II е обратно. Кај типот III, еден ист полипептид содржи повеќе трансмембрански хеликси кои наизменично се провлекуваат низ мембраната што сликовито може да се спореди со серпентини (змијовидни извиткувања). За разлика од нив, кај протеините од типот IV, неколку трансмембрански хеликси, но, од различни полипептиди, се здружуваат слично на претходниот тип. Типот V се протеини кои се поврзани ковалентно со липидите од фосфолипидната мембрана (сликовито, тие се укотвени во мембраната), додека протеините од типот VI се поврзани слично на овој начин, но, покрај тоа содржат и трансмембранска  $\alpha$ -хеликална структура.

Карактеристично е што трансмембранскиот регион во секој од  $\alpha$ -хеликсите на мембранските протеини содржи околу 20 до 25 хидрофобни аминокиселински остатоци кои се во директен контакт со средниот, хидрофобен регион од фосфолипидниот двослој.

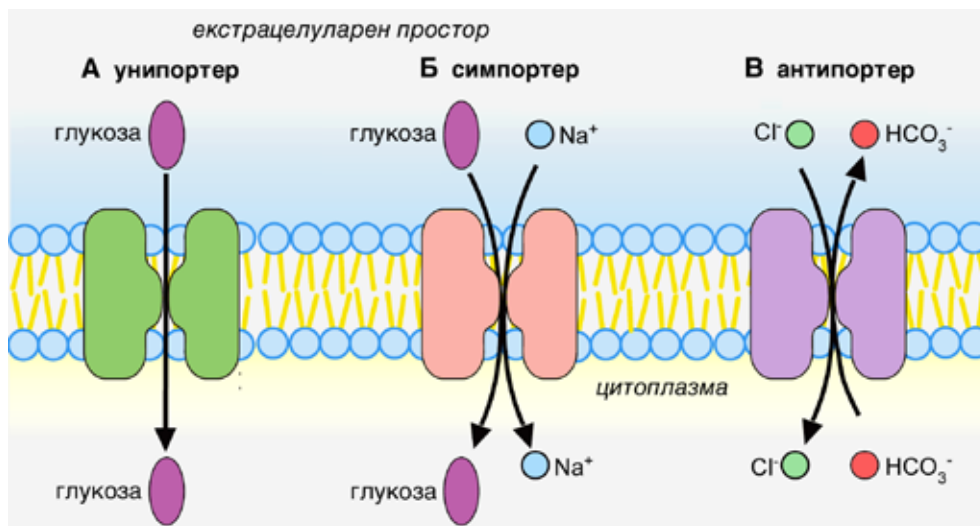




**Слика 6-35:** Типови на мембрански протеини. **А:** класификација на  $\alpha$ -хеликалните мембрански протеини според нивниот распоред. **Б:** трансмембрански протеин со домен на  $\beta$ -цилиндар.

Покрај  $\alpha$ -хеликални структури, постои и посебна класа на трансмембрански протеини градени од полипептиди кои имаат само  $\beta$ -плочести структури (**слика 6-35, Б**). Тие досега се најдени само во надворешната мембрана кај Грам-негативните бактерии, клеточниот ѕид кај Грам-позитивните бактерии, како и во надворешните мембрани кај митохондриите и хлоропластите. Ваквите протеини се означуваат и како **порини**.

Од функционален аспект, преносот на јоните и малите органски молекули (јаглехидрати, аминокиселини, метаболити и други) низ биомембраните се врши преку три класи на трансмембрански протеини: транспортери, јонски канали и АТФ-азни пумпи. **Транспортерите** (или **протеини-носачи**) вршат транспорт низ клеточните мембрани на јони и молекули какви што се: натриумовите и хлоридните јони или глукозата, на пример. Постојат три типа на вакви протеин кои се разликуваат според насоката и начинот на мембранскиот транспорт: **унипортерите** вршат внесување на само еден тип молекули во цитоплазмата (како глукоза) и тоа пасивно: од страната на мембраната со повисока, кон другата страна со пониска концентрација на молекулот или јонот (**слика 6-36, А**). **Симпортерите** истовремено внесуваат две различни типа молекули или јони, додека **антипортерите** го прават тоа во спротивна насока (**слика 6-36, Б и В**). Последниве два типа протеини транспортот го вршат активно (наспроти концентрацискиот градиент), а заедно се означуваат и како **котранспортери**.

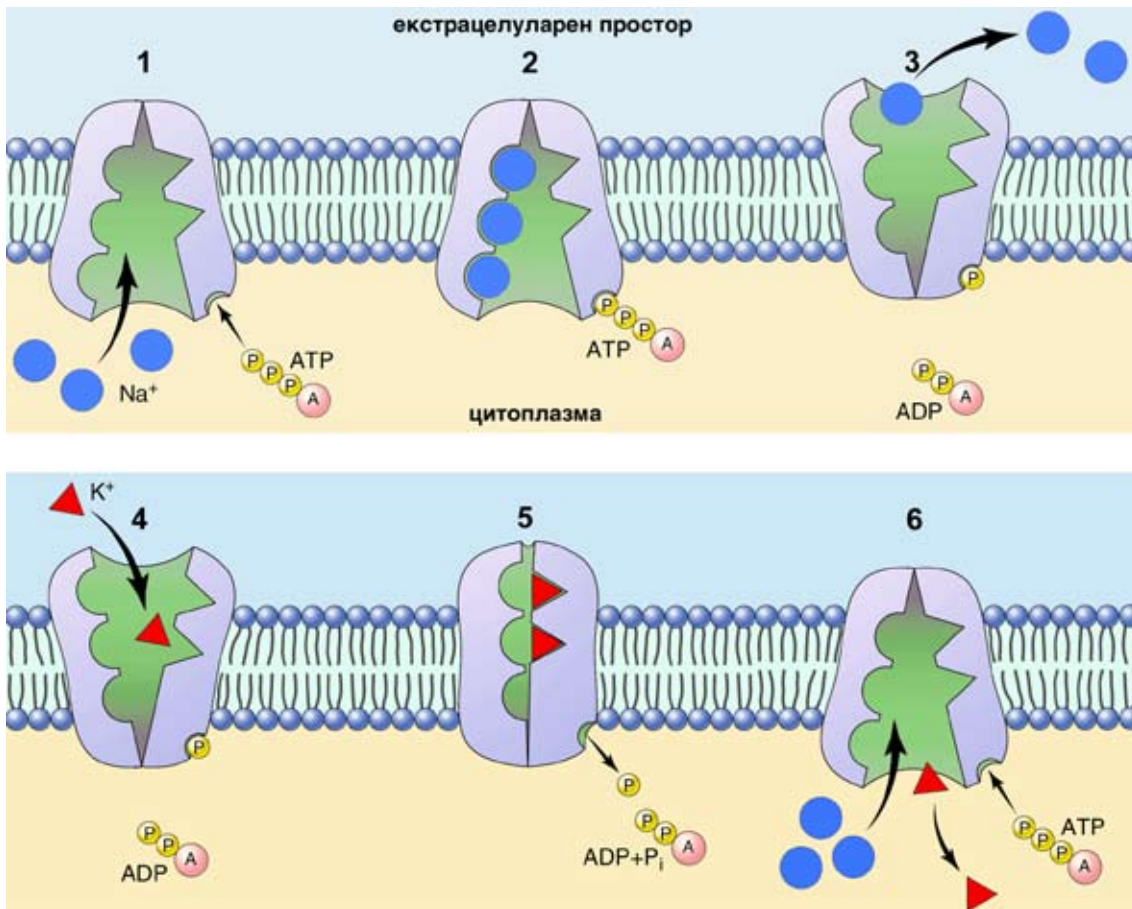


**Слика 6-36:** Три типа на мембрански транспорт посредуван со протеини-носачи.

**Јонските канали** вршат транспорт на вода или на определени јони и хидрофобни органски молекули во насока на градиентот на концентрација на дадениот јон или молекул во однос на двете спротивни страни од мембраната. Така се изнесуваат некои јони и мали органски молекули од цитосолот (каде концентрацијата им е повисока) во клетката или во органелата (каде концентрацијата е пониска). Сличен принцип на транспорт се одвива кога постои електрохемискиот градиент: определени јони се транспортираат од страната на мембраната каде потенцијалот е повисок кон спротивната страна со понизок потенцијал. Токму затоа овој процес се нарекува **олеснета дифузија** и е форма на **пасивен транспорт** низ мембраната. Некои канални протеин вршат транспорт само доколку за нив е врзан специфичен лиганд или доколку се активирани со промена на трансмембранскиот електричен потенцијал.

**АТР-азните пумпи** се транспортни протеини кои имаат АТР-азна ензимска активност и, користејќи ја енергијата добиена со хидролиза на АТР, вршат **активен транспорт** на јоните или малите молекули низ мембраната. Тоа подразбира дека транспортот може да се врши и спротивно на градиентот на концентрација на дадениот јон или молекул. На пример, активниот транспорт овозможува пренос на јони од цитосолот (каде концентрацијата на дадениот јон е пониска) во екстрацелуларниот простор или егзосолот (каде концентрацијата на јонот е повисока). Истиот принцип се однесува и кога транспортот е спротивен на електрохемискиот градиент.

Пример за ваков тип на транспортни протеини е **Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> АТР-азна пумпа**. Кај речиси сите анимални клетки, концентрацијата на натриумови јони е пониска, а на калиумовите јони е повисока во цитоплазмата, во однос на концентрациите во екстрацелуларната течност. Ваквата нерамнотежа се одржува со функцијата на Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> АТР-азна пумпа. Овој интегрален протеин е составен од две полипептидни субединици ( $\alpha$  и  $\beta$ ) кои градат тетрамер со состав:  $\alpha_2\beta_2$ . Механизмот на пумпање на јоните со Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> АТР-аза вклучува фосфорилација, дефосфорилација и промена на конформацијата на овој протеин. Дефосфорилираната форма на протеинот (**слика 6-37, 1**



**Слика 6-37:** Модел за функцијата на  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATP-азна пумпа.

и 2) има висок афинитет кон натриумовите јони кои навлегуваат од цитоплазмата и се врзуваат со транспортниот протеин. Хидролизата на ATP доведува до сопствена фосфорилација што предизвикува промена на конформацијата (слика 6-37, 3) и ослободување на три натриумови јони во екстрацелуларниот простор.

Фосфорилираната форма на пумпата има висок афинитет кон калиумовите јони: по два  $\text{K}^+$  од екстрацелуларната течност се врзуваат со соодветните места за врзување во протеинот. Тоа предизвикува дефосфорилација, обратна промена на конформацијата и отпуштање на двата калиумови јони во цитоплазмата. Со секој циклус на  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATP-азната пумпа, од цитоплазмата во екстрацелуларниот простор се транспортираат по три натриумови јони, а по два калиумови јони се внесуваат во цитоплазмата. Не само што овој процес одржува спротивен концентрациски градиент на  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  јони од двете страни на клеточната мембрана, туку создава и градиент на електростатски полнеж.

Пресметано е дека се одвиваат по околу 100 циклуси во секоја секунда при кои се врши обратен транспорт на  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  јони. Интересно е што на функционирањето на  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATP-азната пумпа во мирување се трошат околу 25% од целокупната енергија во човековото тело.

## Молекуларни мотори

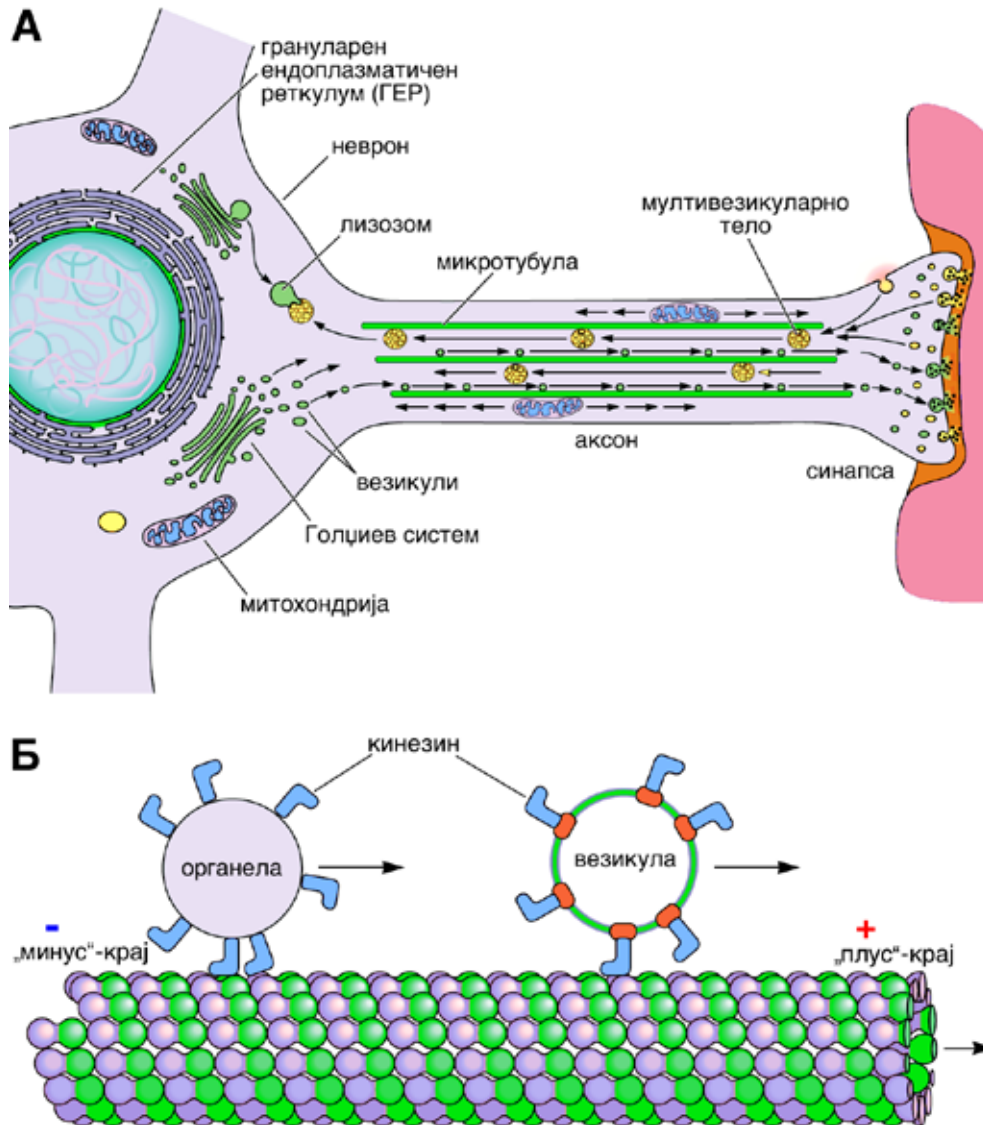
Посебна категорија на сложени протеински комплекси се **молекуларните мотори** кои вршат линеарни или кружни движења. Молекуларните мотори се механохеми-ски ензими или протеински комплекси кои ја конвертираат енергијата добиена со хидролиза на АТР или од јонскиот градиент во механичка сила. Од аспект на наносветот, молекуларните мотори ја одвиваат DNA-репликацијата, сплајсингот, ги раздвојуваат хромозомите во текот на клеточната делба и уште многу други комплексни процеси во клетките. Од аспект на макросветот, пак, токму линеарните или ротациските движења на молекуларните мотори се тие што се драстично видливи кај видовите од животинскиот свет: протеинските комплекси во мускулите ја предизвикуваат перисталтиката на цревата, но, им овозможуваат и на билдерите да подигнуваат тегови со тежина стотина килограми или на големата мачка-чита да трча со огромна брзина.

**Линеарни молекуларни мотори за интрацелуларен транспорт** - Како што е опишано во воведниот дел, микротубулите се постојано динамични структури што овозможува некои моторни протеини да се врзат со нив и да се движат во една насока, трошејќи ја енергијата обезбедена со хидролиза на АТР. Микротубулите можат да се најдат здружени со молекули од други две суперфамилии на моторни протеини: **динеините** и **кинезините** кои поседуваат АТР-азна активност. Комплексите со овие протеини овозможуваат движење на определен молекуларен „товар“ (карго) по должината на микротубулата, која тогаш има улога на молекуларен лифт кој го транспортира каргото низ клетката.

Карактеристично е што динеините и кинезините се движат во спротивен правец по должината на микротубулите. На таков начин, секреторните везикули, мултивезикуларните телца и митохондриите, како и други структури, можат се транспортираат до потребната дестинација во клетката. Аксонскиот транспорт, на пример, се одвива со релативно брзо движење на органелите или везикулите обложени со кинезин по должината на микротубулите во аксоните во нервните клетки (**слика 6-38**). Со тоа се врши транспорт меѓу синаптичкиот крај и телото на нервната клетка. Со сличен принцип на интрацелуларен транспорт се напластуваат и везикулите во Голџиевиот систем, на пример.

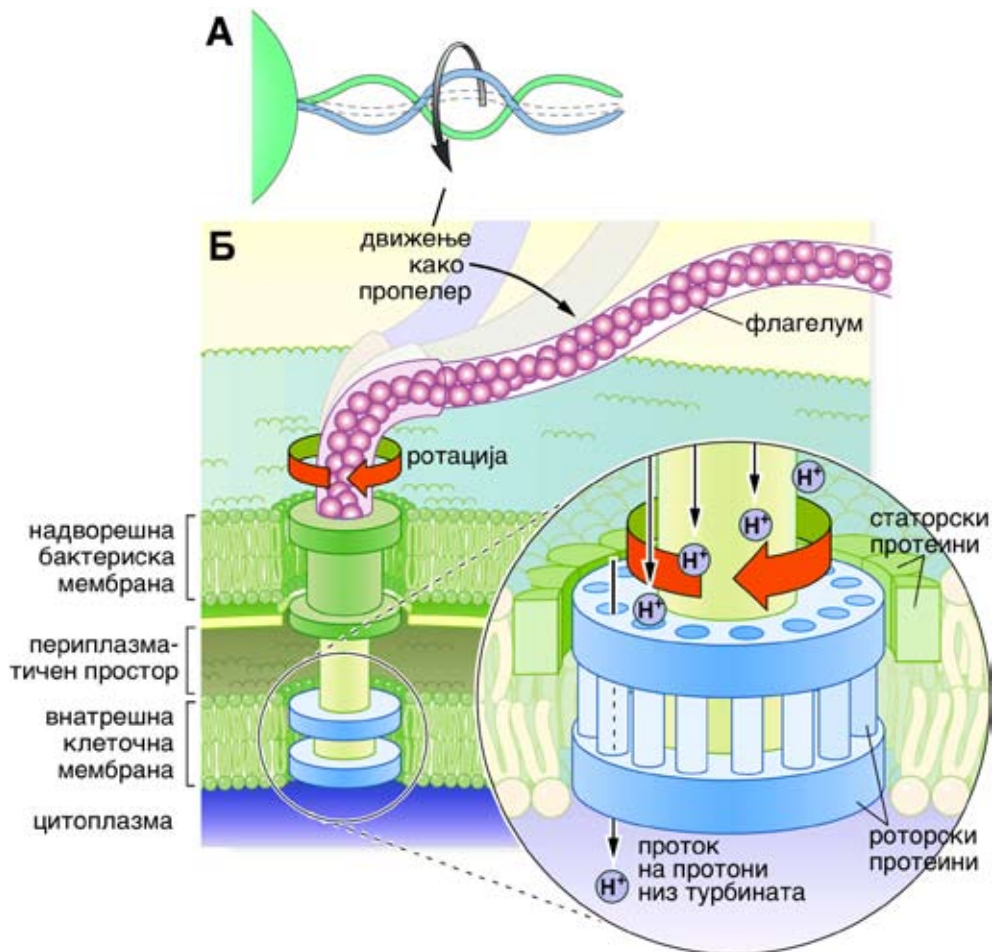
**Ротирачки молекуларни мотори кај бактериските флагелуми** - Некои бактериски клетки поседуваат камшиче (флагелум) со кои се движат во течните медиуми. Тоа е овозможено со т.н. **флагеларен мотор** кој е пример за ротациски моторни протеини кои предизвикуваат карактеристични кружни движења кои сликовито можат да се споредат со пропелер. Самото бактериско камшиче е градено од протеинот **флагелин** и е укотвено во бактерискиот сид и мембрана со посебен комплекс на протеини (**слика 6-39**). Меѓу нив, најдобро се проучени протеините MotA кои се вклопени во клеточната мембрана и формираат кружна низа, а припаѓаат на неподвижните (статорски) протеини од комплексот. Наспроти нив, протеините MotB го градат подвижниот (роторски) дел и, заедно со статорските протеини, ја создаваат т.н. **протонска турбина** која ротира под дејство на протокот на водородни јони (протони) и со тоа

го врти и самиот флагелум. Движечка сила за флагеларниот мотор обезбедува разликата (градиентот) на концентрациите на протоните што се создава од посебен и одвоен протеински комплекс кој пумпа протони во периплазматскиот простор (меѓу двете мембрани).



**Слика 6-38:** Интрацелуларен транспорт посредуван со микроотубули. **А:** Аксонален транспорт на митохондрии и други органели, мултивезикуларни телца и везикули преку микроотубулите во аксонот на нерва клетка. **Б:** Принцип на транспортот на везикули и органели по должината на микроотубулата со помош на протеинот кинезин.





**Слика 6-39:** Флагеларен мотор кај бактерии. **А:** Карактеристично движење на бактериското камшиче. **Б:** прикажано е камшичето вклопено во бактериските мембрани. Зголемен е делот од шемата на т.н. протонска турбина низ која протокот на протони го обезбедува кружното движење на флагелумот.

Ваквиот единствен механизам е извонредна и исклучително функционална структура: пресметано е дека се потребни 800 - 1200 водородни јони да поминат низ турбината за едно кружно движење, а флагелумот ротира приближно 100 пати во секунда и како пропелер ја движи бактеријата низ течности. Комплексноста на овој механизам може да се согледа и со тоа што досега се идентифицирани повеќе од 40 гени чии протеински производи учествуваат во неговата градба. По сево ова, на бактерискиот флагеларен мотор му нема рамен пример во светот на еукариотите.





# СТРУКТУРНА ОРГАНИЗАЦИЈА НА DNA-МОЛЕКУЛОТ ВО ХРОМОЗОМИТЕ

## Глава 7

Претходно опишаните структури на DNA-молекулите главно се однесуваат на *in vitro* испитувања. Но, во живите клетки, DNA-молекулите имаат многу подинамична форма и можат да имаат различна структурна организација. Таквата организација е последица на морфолошките, функционалните и други специфики кај живите клетки, како и заради поголемата стабилност.

Кај наједноставните биолошки ентитети какви што се плазмидите (екстрахромозомски циркуларни DNA-молекули кои се наоѓаат кај бактериите), како и кај повеќето вируси, геномот е составен од двоверижна циркуларна или линеарна DNA (слика 7-1).

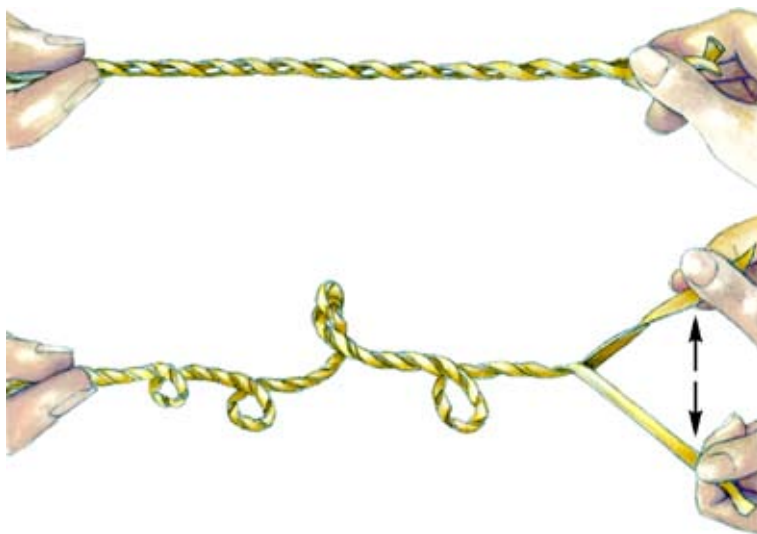


**Слика 7-1:** Скенинг-електронска микрографија на молекули на плазмидна DNA. Сликата е дополнително вештачки обоена заради подобра прегледност и визуелен ефект.

Кај некои вируси, какви што се HIV и вирусот на грип, геномот е составен од RNA-молекули.

## 7.1 Суперспирална структура на циркуларните DNA-молекули

Досегашниот опис на структурата на DNA може да остави погрешен впечаток дека двојниот хеликс има форма на право стапче. Електронските микрографии на DNA-молекулите покажуваат дека тие имаат форма на низа или врвка, која може да се преплетува и да зазема различен просторен изглед, слично како што и јажето, на пример, може да формира разни структури.



**Слика 7-2:** Споредба на суперспиралната структура на DNA со двожилен спирално извиен кабел.

Самиот кабел има своја „релаксирана“ спирализираност (горен дел од сликата). Ако двете жици од едниот крај на кабелот се одвојуваат, ќе започне замотување (суперспирализација) на кабелот, при што ќе се создадат структури во форма на плетенки (долен дел од сликата). За да се олабави (релаксира) спирализацијата на кабел, неопходно е да се ослободи еден од неговите краеве.

Аналогно, затворените (циркуларни) двоверижни DNA-молекули (какви што се плазмидите), можат да постојат и во релаксирана и во суперспирална форма.

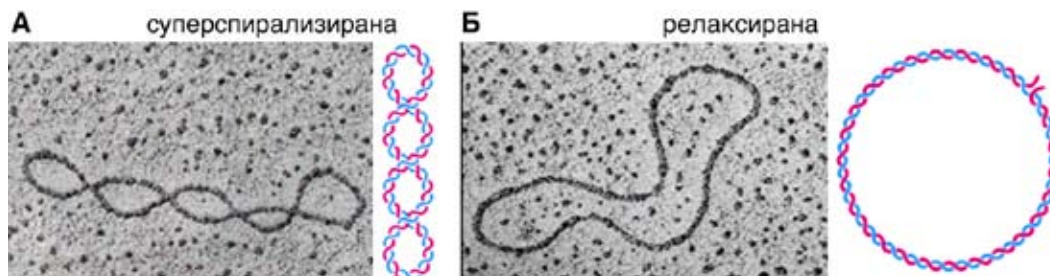
Кај линеарните DNA-молекули, слободните двоверижни краеве овозможуваат релативно слободна ротација на двете комплементарни вериги. Но, циркуларните двоверижни DNA-молекули можат да создаваат и структури од повисоки конформациски нивоа, кога двојниот хеликс се извртува самиот со себе, создавајќи **суперспирална** структура, слична на плетенка.

Сликовита споредба може да се направи со електричен кабел составен од две спирално извиени жици (слика 7-2).

## 7.2 Тополошки параметри на суперспиралните DNA-молекули

Постојат разлики во формите на идентична DNA кога е во суперспирална и во релаксирана состојба (слика 7-3). Релаксирањето може да се постигне со прекин на едната верига од двоверижниот хеликс.

DNA-молекулите кај вишите еукариоти се линеарни, но, се врзани со протеини и компактно се спакувани во хромозоми. Поради тоа, краевите од DNA-веригите не можат слободно да ротираат, па, и кај нив се јавуваат региони со суперспирална структура, слично како и кај циркуларните DNA-молекули. Таквите региони кај кои



**Слика 7-3:** Електронски микрографии и шематски структури (десно од секоја) на суперспирална (А) и на релаксирана форма (Б), кај која има едноверижен прекин во циркуларниот DNA-молекул.

степенот на извртување (т.е. на спирализираност) е променет, се јавуваат при DNA-репликацијата, транскрипцијата и кај другите процеси при кои дел од DNA-молекулот мора се деспирализира, со цел да овозможи просторен пристап до соодветните ензими и други протеини.

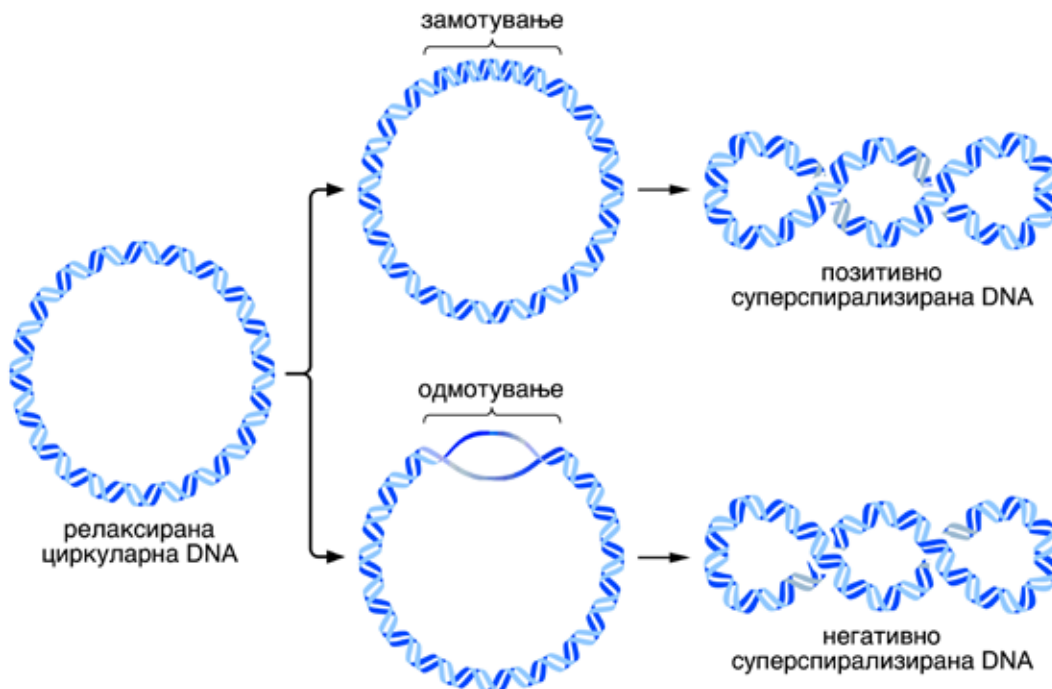
Посебни ензими, **DNA-топоизомераз**и вршат промена на локалниот степен на спирализираност, најпрво со едно- или двоверижни прекини, по што вршат зголемување или намалување на извртеноста, и на крајот повторно ги воспоставуваат прекинатите фосфодиестерски врски во DNA-молекулот. DNA-жираза е форма на топоизомераза која ја релаксира суперспиралната DNA во текот на репликацијата кај бактериите. Повеќе детали за овие ензими се даден во следната глава посветена на репликацијата на DNA.

**Врзувачкиот број** ( $L$  или  $Lk$ ) има целобројна константна вредност за даден двоверижен циркуларен DNA-молекул, независно од тоа колкава дисторзија се предизвикува врз тој молекул. Промената на врзувачкиот број е возможна само со прекин на фосфодиестерските ковалентни врски во еден или во двете комплементарни DNA-вериги со ензимско или механичко делување. Врзувачкиот бројот означува колку пати двете комплементарни вериги на DNA-молекулот се преплетуваат меѓусебно и е збир од две други геометриски компоненти:  $T$  или  $Tw$  (од англискиот збор *twist* за алка, врска) и  $W$  или  $Wr$  (од англискиот збор *writhe*-превиткување). Оттаму произлегува дека врзувачкиот број може математички да се изрази со следната равенка:

$$L = T + W$$

На **сликата 7-4**, прикажани се три **топоизомери**: релаксираната циркуларна двоверижна DNA, како и нејзините позитивни и негативни суперспирални форми настанати под дејство на DNA-топоизомераза. Важно е што трите топоизомери се исти DNA-молекули кои имаат иста нуклеотидна секвенца и должина (во базни парови), но, се разликуваат по степенот и насоката на спирализираност. Негативната суперспирализација врши торзиско влијание врз DNA-молекулот и има тенденција да предизвикува локално одвиени региони (слични на меурчиња) кај кои се раскинати водородните врски меѓу комплементарните бази. Се претпоставува дека тоа има клучно значење за започнување на процесите на репликација и транскрипција.

Иако се важни од теоретски аспект, засега, овие тополошки параметри не можат експериментално да се измерат.



**Слика 7-4:** Топоизомери на еден ист двоверижен циркуларен DNA-молекул: едниот во релаксирана форма, вториот (прикажан во средина, горе на сликата) со позитивна суперспирална состојба и третиот (прикажан во средина, долу на сликата) во негативна суперспирална состојба.

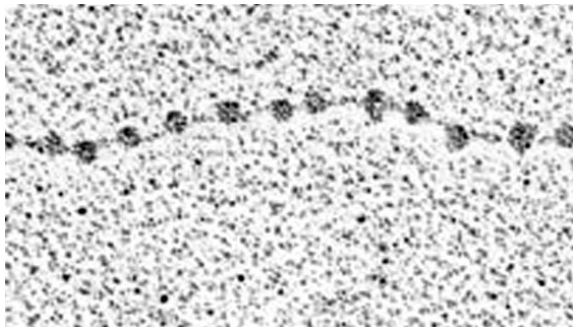
Стабилноста, но, и ензимски-катализираните промени и прилагодувања на топологијата на DNA-молекулите се од клучна важност за процесите на репликација, транскрипција и за многу други процеси. Топологијата има практично значење и при нивната електрофоретска анализа, како што е опишано во главата 20: Основни методи во молекуларната биологија и молекуларната генетика.

### 7.3 Нуклеозомска организација на DNA кај еукариотите

Кај еукариотските организми, секоја клетка содржи многу поголемо количество на DNA во однос на прокариотските клетки. Кај луѓето, хаплоидниот геном содржи DNA со вкупна должина од околу  $3,2 \times 10^9$  (3,2 милијарди) базни парови. Поради тоа што луѓето се диплоидни организми, сите телесни клетки (освен половите) имаат по два сета на хромозоми, па, вкупното количество на DNA во секоја соматска клетка е двојно поголемо, т.е.  $6,4 \times 10^9$  базни парови DNA. Ако се има предвид дека пресметаната должина на секој еден базен пар во DNA-молекулот е 0,33 nm, произлегува дека вкупната должина на DNA-молекулите од секоја поединечна клетка изнесува повеќе од 2,1 метри.

Но, големината на повеќето клетки е во редна величина од десетина микрометри, па, DNA-молекулите мора да бидат густо спакувани. Кога започнува митозата, хроматинот значително се кондензира (згуснува) и во текот на профазата, а особено

во метафазата, компактоста на структурата е најголема при што се препознаваат карактеристичните хромозоми. Во секоја хроматида има по еден густо спакуван, двоверижен линеарен DNA-молекул. Скусувањето на должината како резултат на кондензирањето во текот на метафазата е поголемо од 10 000 пати.

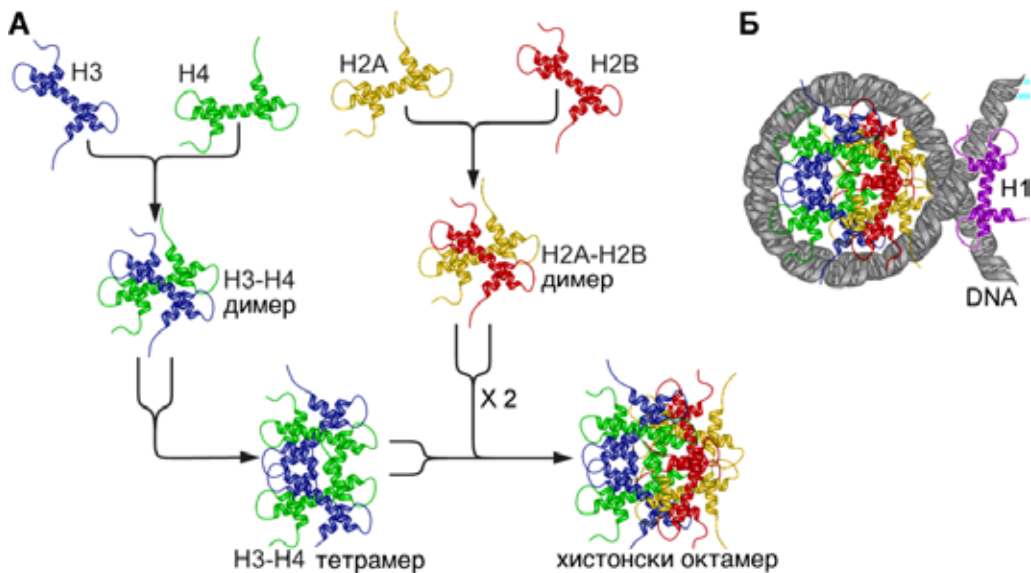


**Слика 7-5:** Трансмисиjsка електронска микрографија на нуклеозомска нишка.

Сите еукариоти (освен Динофлагелатите, род *Dynoflagellata*) имаат хистони и со нив DNA-молекулите се организирани во посебни топчести структури означени како **нуклеозоми**. Нуклеозомските нишки се составени од линеарни DNA-молекули кои се намотани околу хистонски цилиндари - „макари“, со што формираат структури кои личат на ѓердан со бисери (**слика 7-5**).

Во текот на интерфазата (G1, S и G2), како и кај клетките кои не се делат (G<sub>0</sub>), нуклеозомската DNA е доста деспирализирана и е дисперзирана во јадрото

формирајќи аморфна морфолошка структура означена како **хроматин**. Хроматинот е нуклеопротеински комплекс, а негови основни структурни единици се нуклеозомите. Протеините што го формираат хроматинот врзувајќи се со DNA-молекулите можат да се поделат на алкални (базични) електростатски позитивни протеини наречени **хистони** и на нехистонски протеини со помал електростатски полнеж. Хистоните се релативно мали протеини (со молекулска маса околу 10 000) кои се

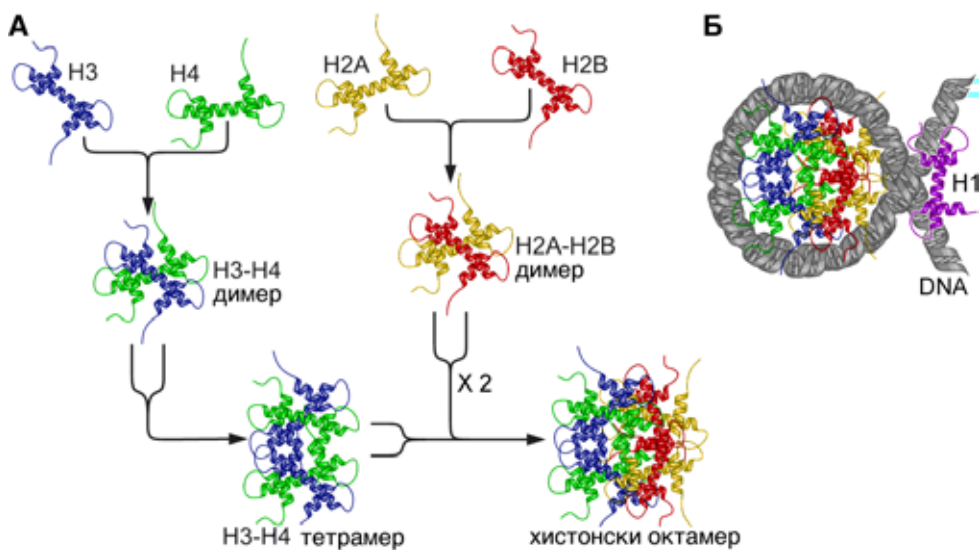


**Слика 7-6:** Формирање на нуклеозомите. **А:** формирање на хистонскиот октамер; **Б:** намотување на двоверижниот DNA-хеликс околу хистонската „макара“. Хистонот H1 го стабилизира DNA-хеликсот намотан околу хистонскиот октамер.



исклучително богати со аминокиселините лизин и аргинин, што и резултира со нивниот мошне алкален карактер. Аминокиселинската секвенца на хистоните е екстремно конзервирана кај најголем број од досега истражени еукариотски организми, што ја покажува нивната еволуциска важност. Кај сите еукариотски клетки се наоѓаат пет класи на хистонски протеини, кои се разликуваат по аминокиселинскиот состав и молекулската маса: **H1**, **H2A**, **H2B**, **H3** и **H4**.

Хистоните H3 и H4 формираат тетрамер составен од по две молекули од секој од нив, додека хистоните H2A и H2B формираат димери. Нуклеозомското „јдро“ е составено од по два хистона H2A, H2B, H3 и H4, со што се создава хистонски октамер (структура од 8 субединици) од типот:  $(H3/H4)_2-(H2A-H2B)_2$ . Овој октамер има улога на цилиндар околу кој DNA-молекулот се намотува 1,7 пати, со должина од околу 200 базни пара (слика 7-6).



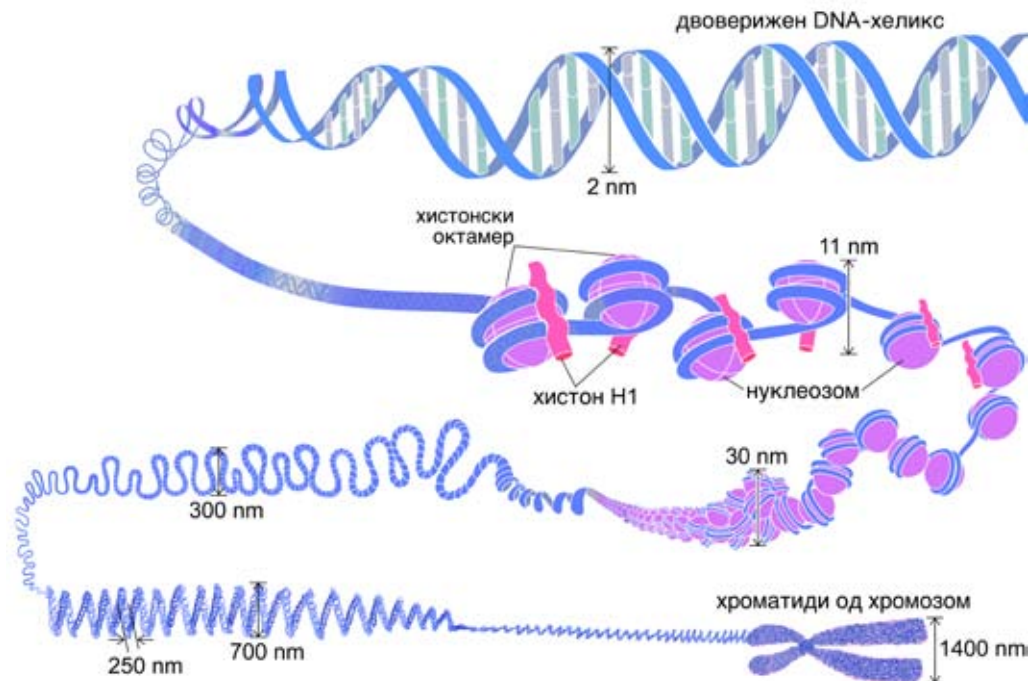
**Слика 7-6:** Формирање на нуклеозомите. **А:** формирање на хистонскиот октамер; **Б:** намотување на двоверижниот DNA-хеликс околу хистонската „макара“. Хистонот H1 го стабилизира DNA-хеликсот намотан околу хистонскиот октамер.

Хистонот H1 е лоциран на местата каде DNA-веригите почнуваат и завршуваат да се намотуваат околу хистонскиот октамер.

Оттаму произлегува дека секој нуклеозом опфаќа околу 200 bp од двоверижната DNA, од кои 144 до 147 bp DNA се замотани околу секое нуклеозомско јдро, од 20 до 22 bp се поврзани со хистонот H1, а останатите 30 до 40 bp се поврзувачка (*linker*) DNA која се наоѓа меѓу соседните нуклеозоми.

Според моделот за структурна организација на еукариотските хромозоми, DNA-молекулите се компактно „спакувани“ со хистоните и други протеини, формирајќи повеќе хиерархиски нивоа на кондензирање (слика 7-7).

Почнувајќи од нуклеозомската нишка, па, сè до создавањето на хроматидите, DNA-молекулите се кондензираат во екстремно мал волумен. Хроматинскиот филамент со дебелина 10-11 nm е составен од двоверижна DNA со нуклеозомски топчиња



**Слика 7-7:** Хиерархиска организација на DNA-молекулите: од нуклеозомски и хроматински нишки, па, сè до хромозоми.

кои се поставени на растојанија од околу 30 базни пара, со што создаваат изглед на „бисери на ѓердан“. Со суперспирализирање на ваквиот нуклеозомски филамент се формира соленоидна структура (**хроматинска нишка** или **влакно**) при што има по 6 до 7 нуклеозоми на секое целосно завртување. Важно е да се има предвид дека 30 nm-хроматински нишки не се простираат непрекинато по должината на целите хроматиди, туку на точно определени места на DNA-молекулот, нековалентно, но, директно се врзани посебни протеини кои се специфични за определени секвенци. Следното ниво на структурна организација се однесува на поврзувањето на хроматинската нишка со протеинските структури кои имаат улога на хромозомски „скелиња“ при што се создаваат карактеристични јамки. Нивната натамошна спирализација овозможува создавање на конечно спакуваната нуклеопротеинска структура на хроматидата. Повисоките ниво на организација се најслабо проучени и се претпоставува дека оваа организација може да варира меѓу различните региони на секој хромозом, како и дека се менува динамично според фазите од клеточниот циклус.

Покрај хистоните и топоизомеразата, посебна класа на протеини кои се инволвирани во одржувањето на кондензираната хромозомска структура се и **протеините SMC** (од англ. *structural maintenance of chromosomes*). За разлика од хистоните, протеините SMC се наоѓаат кај сите организми, од бактериите па сè до луѓето. Два главни типа на SMC-протеини се: **кохезините**, кои, меѓу останатото, имаат важна улога во поврзувањето на сестринските хроматиди веднаш по DNA-репликацијата, и **кондензините**, кои се есенцијални за кондензирањето на хромозомите во текот на клеточната делба. Засега не се доволно познати деталните молекуларни механизми



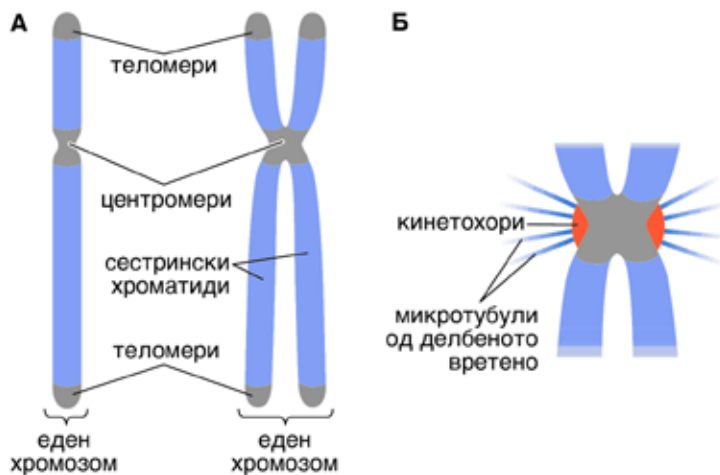
со кои овие протеини ја вршат својата функција.

Кај прокариотите, релативно малиот геном (во споредба со тој кај вишите еукариоти) е содржан во еден циркуларен двоверижен DNA-молекул. Бактериите немаат хистони, па, со тоа немаат ниту нуклеозомска структурна организација. Кај бактериските клетки, геномската DNA е организирана во т.н. **нуклеоид** или **бактериски хромозом**, кој нема правилна форма, како кај еукариотите. Тој е многу подинамична структура, што се должи на покусиот клеточен циклус и далеку поактивниот метаболизам на бактериите.

## 7.4 Хромозоми

Уште на самиот почеток на 20-тиот век, Сатон (Walter Sutton) и Бовери (Theodor Boveri) ја поставиле теоријата дека еукариотските гени се лоцирани на хромозомите и дека Менделовите закони се однесуваат на хромозомското наследување. Според тоа, кај диплоидните организми, секој соматски хромозомски пар е составен од по два хомоложни хромозома, во метафазата составени од по две сестрински хроматиди. Едниот хромозом од парот потекнува од мајката, а другиот од таткото, па, ваквиот тип на сексуална репродукција, во генетиката, се означува и како бипарентално наследување. Од тие причини, секој хромозомски локус кај диплоидните организми содржи по две алели, што е од исклучителна важност за генетиката.

Хромозомите се видливи поединечно само во текот на митозата, кога се високо кондензирани и спакувани околу 10 000 пати покомпактно во однос на интерфазата.



**Слика 7-8:** Основна структура на хромозомите. **А:** на левиот дел од сликата е прикажан еднохроматиден, а на десниот дел, двохроматиден хромозом. На краевите од хроматидите се наоѓаат заштитни теломери. **Б:** двете сестрински хроматиди се споени во регионот на нивните центромери, а на секоја од нив се прикачени кинетохорните микротубули кои ги одвлекуваат хроматидите кон спротивните полови на делбеното вретено во текот на анафазата.

Вертебралните метафазни хроматиди се во форма на микроскопски стапчиња на кои, кај повеќето, се наоѓа стеснување означено како **центромер**, со кој двете сестрински хроматиди се меѓусебно поврзани во еден метафазен хромозом (**слика 7-8**). Центромерот најчесто ја дели хроматидата на два крака. Според положбата на центромерот, хромозомите се класифицирани како метацентрични (кога центромерот е на средината на хроматидата), субметацентрични (кога се наоѓа попериферно), акроцентрични (кога е едниот крак е значително подолг) и телоцентрични (кога центромерот е на самиот крај од хроматидата,

при што отсуствува кус крак).

Најголемиот број прокариоти имаат само по еден циркуларен хромозом, додека еукариотските клетки содржат повеќе од еден линеарен хромозом. Тоа се однесува на најголем број организми, но, постојат и важни исклучоци. Иако најголемиот број од испитаните прокариотски видови имаат по еден циркуларен хромозом, некои бактеријски клетки имаат и по два, три, па, и четири хромозоми. Бактеријата *Agrobacterium tumefaciens*, на пример, содржи 3 циркуларни и еден линеарен хромозом. Сите еукариотски организми содржат по повеќе од еден линеарен хромозом во секоја клетка. Бројот на хромозоми во секоја клетка варира во значителна мерка меѓу организмите, независно од комплексноста на видот или од големината на геномот (**табела 7-1**). Кај ретки исклучоци (во макронуклеусот на протозоата *Tetrahymena*, на пример), достигнува и повеќе илјади хромозоми.

<b>Табела 7-1: Хаплоиден број на хромозомите кај различни организми</b>		
<b>организам</b>	<b>латинско име</b>	<b>хаплоиден број хромозоми (1n)</b>
комарец	<i>Culex pipiens</i>	3
винска мувичка	<i>Drosophila melanogaster</i>	4
градинарски грав	<i>Vicia faba</i>	6
градинарски грашок	<i>Pisum sativum</i>	7
пекарски квасец	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16
зелена алга	<i>Chlamidomonas reinhardii</i>	18
мачка	<i>Felis domestica</i>	19
резус-мајмун	<i>Macaca mulatta</i>	21
човек	<i>Homo sapiens</i>	23
коњ	<i>Equus caballus</i>	32
куче	<i>Canis familiaris</i>	39
крап	<i>Cyprinus carpio</i>	52
водена мувичка	<i>Nymphaea alba</i>	80
змиски јазик (папрат)	<i>Ophioglossum reticulatum</i>	630

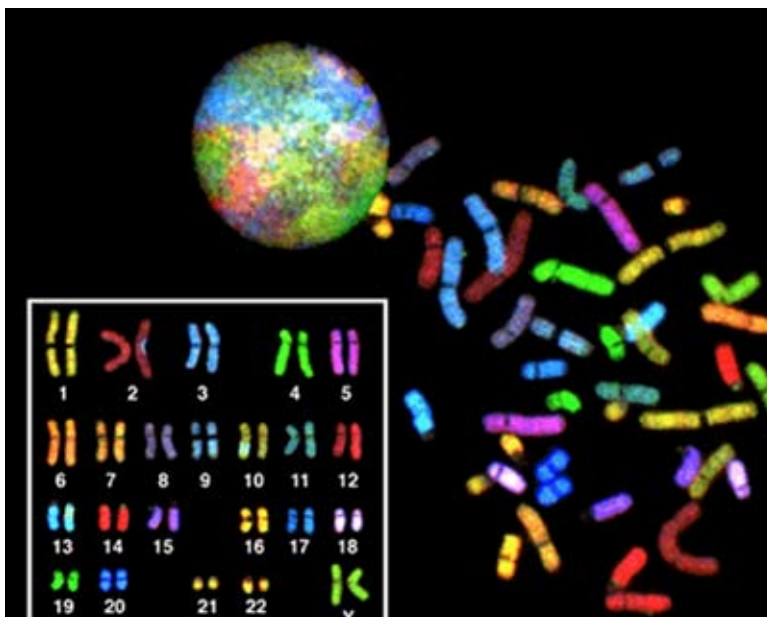
## 7.5 Анализа на хромозомите и кариотип

Хромозомите можат најдобро морфолошки да се анализираат во текот на метафазата, кога се забележливи и разлики во должината и формата меѓу индивидуалните хромозомски парови. Се користат и специјални техники на боење при кои се формираат обоени напречни ленти (*band*-ови) на хромозомските краци за попрецизна и посигурна идентификација на поединечните хромозоми.

Кариотип претставува назив за сетот на хромозоми кои со анализа се аранжирани во хомологни парови според општо прифатена класификација базирана на големината на секој хромозом, положбата на центромерот и специфичниот распоред на лентите. Кариотипот е специфичен за секој вид, а се разликува и за по еден хромозом кај индивидуите со различен пол од ист вид. Нормално, човекот (*Homo sa-*

*piens*) има 22 пара соматски хромозоми (автозоми) и еден пар полови хромозоми (XX кај женските и XY кај машките индивидуи). Кариотипот на машките лица обично се означува како ♂ 46, XY, а на женските ♀ 46, XX.

Рутинската анализа на кариотипот најчесто се врши на лимфоцити издвоени од венската крв или од фибробласти од кожа, како и од туморски клетки. Клетките се култивираат во *in vitro* услови (клеточна култура) со цел најголемиот број од нив да бидат во некоја од фазите на митозата. За разлика од фибробластите и неопластичните (туморски) клетки, лимфоцитите од периферната крв нормално не се делат, па, затоа се третираат со митогено соединение какво што е фитохемаглутининот, растителен протеин кој неспецифично стимулира нивна делба. Подоцна, клетките се третираат со колхицин, токсин кој ја прекинува митозата во метафаза, кога хромозомите се најповолни за морфолошка анализа. Најпосле, се приготвува микроскопски препарат на кој клетките се распрскани со хипотоничен раствор, по што се фиксираат и бојат со посебни техники. Класичната кариолошка анализа се врши со фотографирање на хромозомите со оптички микроскоп и со подредување на исечените хромозоми од фотографијата во кариограм. Во поново време, дигиталната анализа речиси целосно ја има потиснато класичната фотографија. Покрај тоа, во последниве 20-тина години се користи и посебна *in vitro* хибридациска техника означена како



**Слика 7-9:** Микрофотографии на човечкиот кариотип изработен со FISH-техниката со повеќе бои (мултикоролор FISH). На поголемата слика се гледа интерфазно јадро во кое се насираат некои од т.н. лажни бои, но, поради недоволната кондензираност, не се видливи поединечни хромозоми. Десно од јадрото се поединечните хромозоми од друга клетка. На помалата, вклопена слика, видлив е кариотипот добиен со софтверска анализа, идентификација и порамнување на секој хромозом од една клетка фотографирани со оваа техника. Сликата е во јавен домен на интернет и е достапна на [www.wikimedia.org](http://www.wikimedia.org).

мутлиплекс или мултикоролор флуоресцентна *in vitro* хибридациска (M-FISH) (слика 7-9). Се користи смеса од 24 флуоресцентни DNA-сонди, секоја специфична за по еден хромозом, и на микроскоп опремен со епифлуоресцентен модул се врши снимање со чувствителна CCD-дигитална камера. Се користи и посебен софтвер кој ги прикажува поединечните флуоресценции со т.н. лажни бои за секој хромозом, засебно, и овозможува автоматска конструкција на кариограмот.

Меѓу поновите техники е и методот на спектрална кариотипизација (наречен SKY) кај кој се комбинира флуоресцентната микроскопија со Фуриеровата спектроскопи-

---

ја. Накратко, се применува *in situ* хибридизација на метафазните хромозоми со смеса на сонди, слично како и кај FISH техниката и се регистрираат флуоресцентните емисионски спектри во видливото и инфрацрвеното подрачје. Индивидуалните спектрални линии софтверски се конвертираат во комбинации на сина, зелена и црвена боја со што се добиваат лажните бои на секој поединечен хромозом. Оваа софистицирана техника има примена во дијагностиката на структурните хромозомски аберации и во цитогенетиката на канцерот.

Со кариотипска анализа можат да се идентифицираат хромозомски нарушувања (аберации) кои се однесуваат или на бројот на хромозомите (т.н. нумерички аберации) или на нивната структура (структурни аберации).



# РЕПЛИКАЦИЈА И РЕКОМБИНАЦИЈА НА DNA

## Глава 8

**П**ред секоја клеточна делба, DNA-молекулите мораат прецизно да се удвојат (реплицираат) со што се овозможува двете клетки-ќерки, по делбата, да ги поседуваат истите генетските информации, т.е. комплетниот геном. Во текот на еволуцијата се развиле софистицирани механизми и неопходната ензимска машинерија за репликација на DNA-молекулите. Молекуларните аспекти на репликацијата се најдобро проучени кај прокариотски клетки кои, по правило, имаат само по еден циркуларен DNA-молекул. Репликацијата се одвива со многу сличности и во геномот на еукариотските клетки, кој е распределен во повеќе хромозоми, со по еден линеарен DNA-молекул во секој. Но, прецизните механизми на овој процес кај еукариотските клетки се многу покомплексни и послабо проучени.

Уште при постулирањето на својот модел за структурата на DNA-молекулот, Вотсон и Крик претпоставиле дека при одвојувањето на двете комплементарни вериги од двојниот хеликс, секоја од нив може да служи како урнек (образец) за синтеза на нови DNA-вериги (слика 8-1).

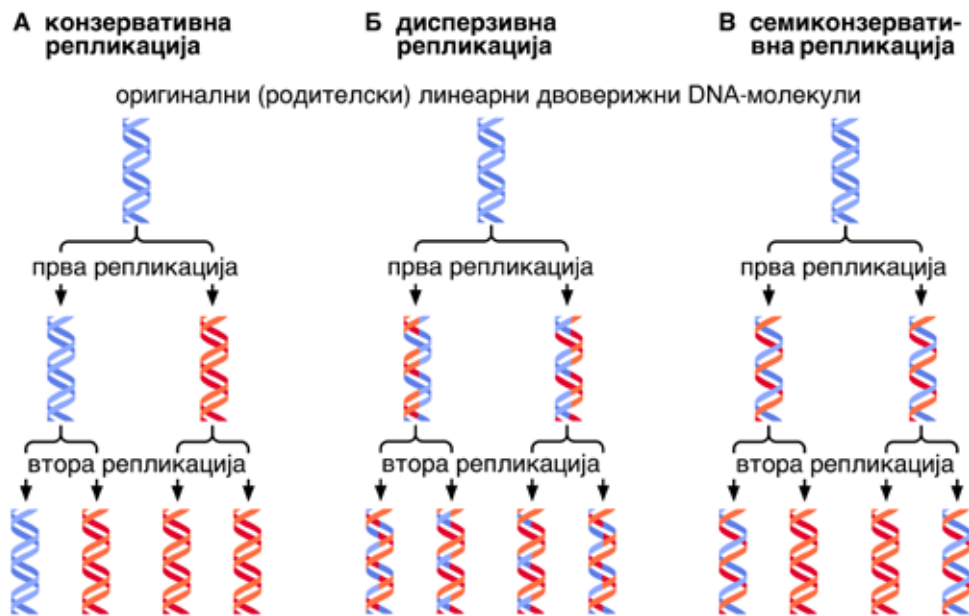
Комплементарноста на базите кои се додаваат при синтезата овозможува формирање на идентични копии од двете оригинални вериги, што резултира со репликација на DNA-молекулот. Во раните 1950-ти години,



**Слика 8-1:** Репликацијата на доверижната DNA според моделот на Вотсон и Крик.



не бил познат деталниот молекуларен механизам на репликацијата, а постоеле три хипотетички модели (слика 8-2).



**Слика 8-2:** Шематски приказ на трите постулирани модели за DNA-репликација.

Според моделот на т.н. **конзервативна** репликација, оригиналната (родителска) двоверижна DNA останува непроменета, а синтетизираната идентична копија е составена од две целосно нови вериги. Кај **дисперзивниот** модел, претпоставено било дека и двете двоверижни DNA-молекули по репликацијата содржат сегменти од оригиналната и од новонастанатата DNA. Кај **семиконзервативниот** модел, секоја од двете двоверижни DNA-молекули по репликацијата е составена од по една оригинална и една новосинтетизирана верига.

## 8.1 Експериментот на Мезелсон и Стал

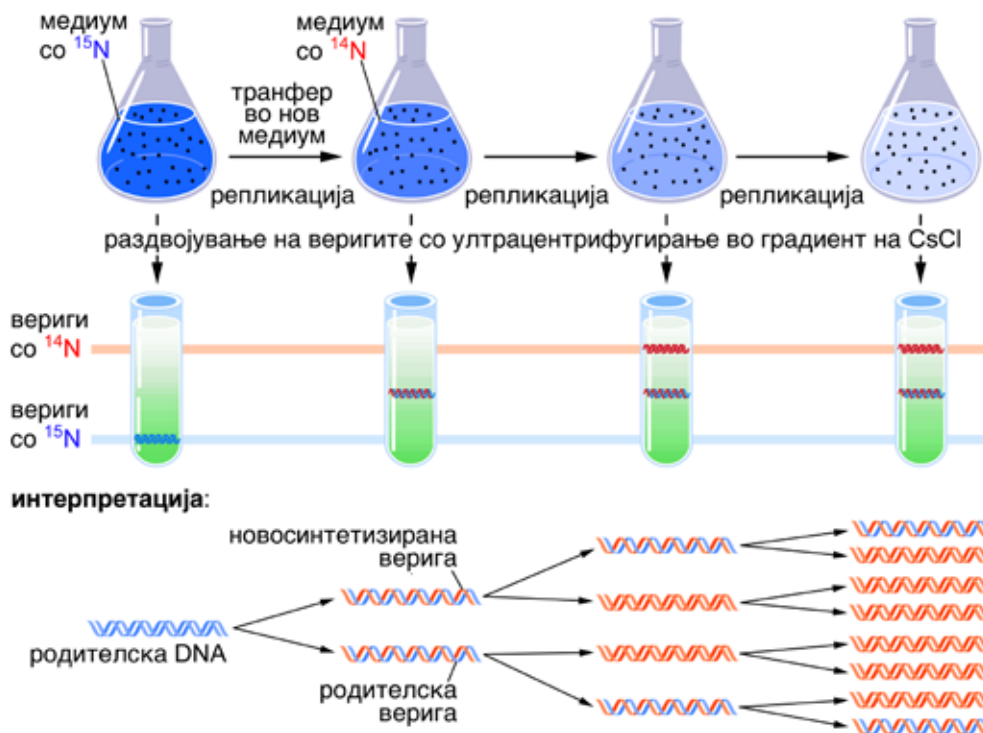
Во трудот објавен во 1958 година, Мезелсон и Стал (Matthew Meselson и Franklin Stahl) елегантно докажале дека репликацијата се одвива според семиконзервативниот модел. Во своите експерименти, тие ги култивирале бактериите *Escherichia coli* (*E. coli*) во хранлив медиум во кој додале амониумови соли со тешкиот изотоп на азот ( $^{15}\text{N}$ ), наместо вообичаениот, лесен изотоп ( $^{14}\text{N}$ ). Во текот на метаболичната активност на бактериите и при нивната делба во текот на неколку генерации, азотните бази со тешките азотни атоми  $^{15}\text{N}$  се инкорпорирале во нивните DNA-молекули. Изолираната DNA од таквите бактерии содржела нуклеотиди со тешкиот изотоп и при ултрацентрифугирање во градиент на цезиум хлорид ( $\text{CsCl}$ ), како потешка, достигнала подолу кон дното на епруветите, во однос на „нормалната“ DNA со лесниот изотоп

на азотот. Со тоа, DNA-молекулите биле раздвојувани дури и при мала разлика во густината, што меѓу другите фактори, зависи и од тоа колку е тежок изотопот кој е инкорпориран во нив (слика 8-3).



**Слика 8-3:** Принцип на раздвојувањето на DNA-молекулите обележани со тешкиот изотоп на азот ( $^{15}\text{N}$ ) и со лесниот изотоп на азот ( $^{14}\text{N}$ ) во експериментот на Мезелсон и Стал.

Бактериските клетки кои биле инкубирани во медиум со тешкиот изотоп на азотот (родителска генерација) имале DNA-вериги кои содржеле нуклеотидни



**Слика 8-4:** Резултати од експериментот на Мезелсон и Стал со кој се докажува дека DNA-репликацијата се одвива според **семиконзервативниот модел**.

бази само со  $^{15}\text{N}$  азот и при ултрацентрифугирањето имале најголема густина, па, достигнале најниско во градиентот на цезиум хлорид. Изолираната DNA од првата генерација на бактерии кои се поделиле во медиумот со лесен азотен изотоп имала помала густина и се урамнотежала на средината од градиентот во центрифугалната епрувета.

При центрифугирањето на DNA-изолатите од втората генерација на бактерии се формирале два „прстена“ во епруветата: едниот со иста густина како од бактерискиот изолат од првата генерација, и втор прстен кој имал најмала густина, па, се наоѓал кон горниот дел од градиентот во епруветата (слика 8-4).

Истражувачите заклучиле дека изолираната DNA од бактериите кои само еднаш се поделиле во медиумот со лесен изотоп на азотот, содржи хибридни вериги, составени од по една „тешка“ и една „лесна“ DNA-верига, па, затоа нивната густина е на средината од градиентот на цезиум хлорид. Ваквиот наод се совпаѓал само со семиконзервативниот модел за репликација.

Со Мезелсон-Сталовиот експеримент било потврдено дека DNA-репликацијата кај *E. coli* се одвива според семиконзервативниот модел. Подоцнежните експерименти потврдиле дека на ист начин DNA-репликацијата се одвива кај сите досега истражени прокариотски и еукариотски организми.

## 8.2 Основен механизам на DNA-репликацијата

Иако семиконзервативниот модел на репликација е универзално застапен кај сите досега испитувани организми, постојат определени, но, важни, разлики во механизмите според кои се одвива репликацијата. Имено, речиси сите прокариоти имаат по еден циркуларен геном (бактериски хромозом) и по еден репликон кој го опфаќа целокупната DNA. Со изразот **репликон** се означува целокупниот DNA-регион кој се реплицира од еден извор. Исклучок се некои археобактерии од родот *Sulfolobus* кои имаат по три репликона. За разлика од нив, кај еукариотските организми, секој линеарен хромозом содржи поголем број репликони, во зависност од должината на DNA-молекулот.

DNA-репликацијата започнува на посебни места во геномската DNA кои се наречени **извори на репликацијата** или *ori* (од англ. *origin* - извор) и проследува дво-

наасочно во двете спротивни насоки (бидирекциски).



**Слика 8-5:** Шематска структура на репликациската виљушка.

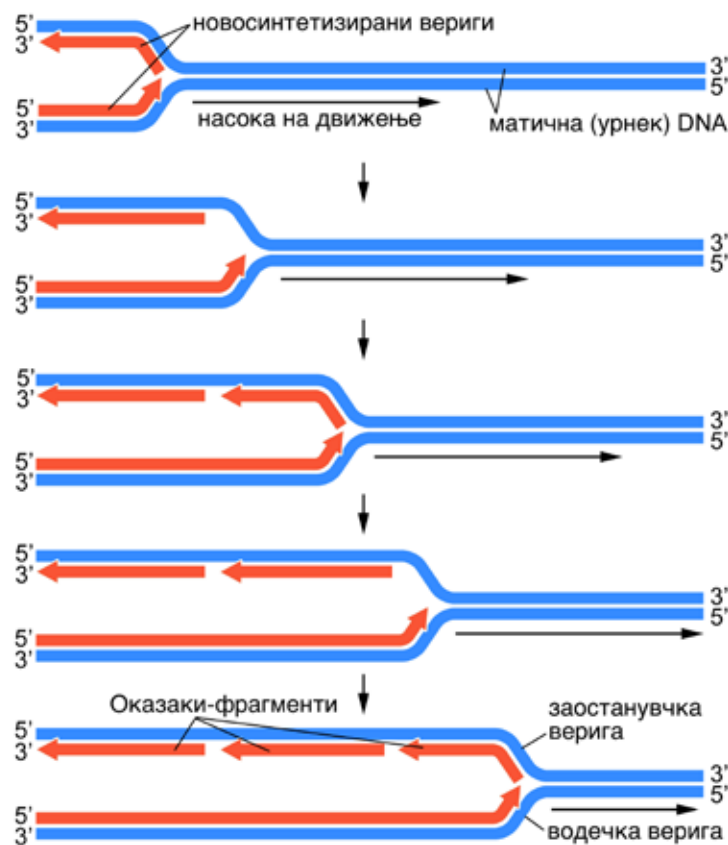
### Репликациски виљушки

Репликацијата се одвива двонаасочно, односно од местото на изворот се формираат **по две** структури во форма на латинската буква **Y** кои се нарекуваат и

**репликациски виљушки** и кои се движат во спротивни насоки (слика 8-5).

Поради тоа што полимеразата може да додава нуклеотиди само во  $5' \rightarrow 3'$  насока, синтезата на едната верига се врши континуирано и паралелно со напредувањето, т.е. движењето, на репликациската виљушка, па, се нарекува **водечка верига**.

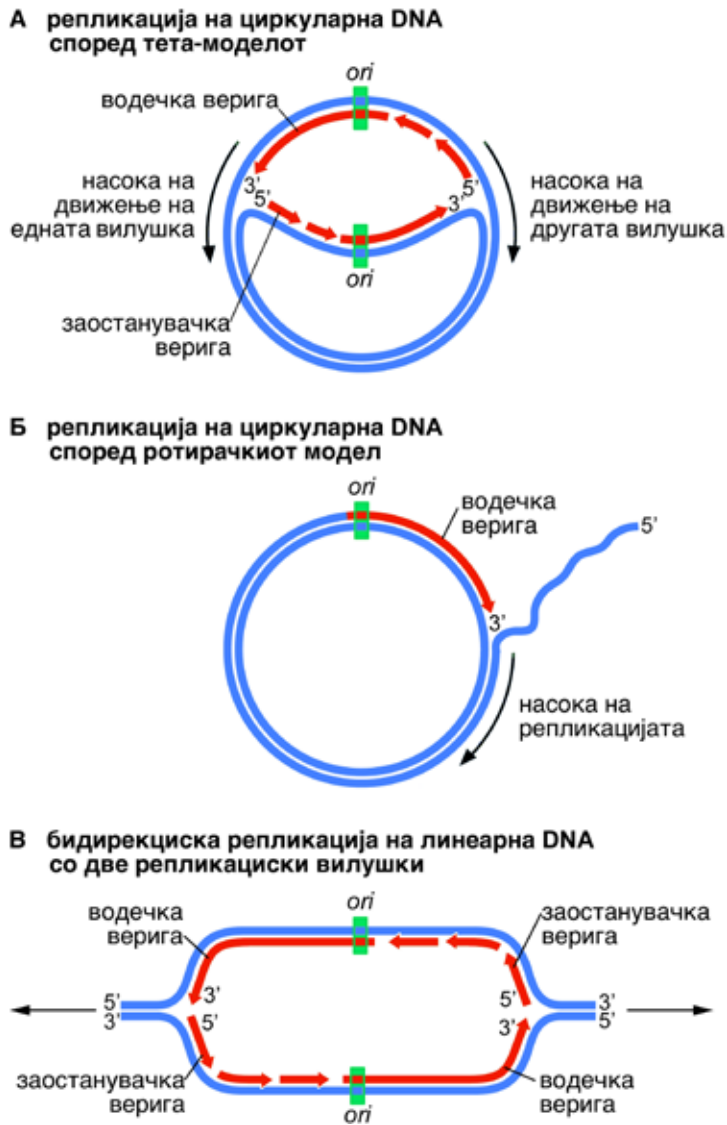
Синтезата на другата верига напредува **дисконтинуирано**, во сегменти, па, се нарекува **заостанувачка верига**. Во чест на Јапонскиот научник Оказаки (Reiji Okazaki) кој прв ги проучил овие DNA-сегменти долги неколку стотици до неколку илјади нуклеотиди, се нарекуваат и Оказаки-фрагменти (слика 8-6).



**Слика 8-6:** Динамика на движењето на репликациската виљушка при синтезата на DNA. Кај едната од двете комплементарни урнек-вериги (матична DNA), синтезата напредува континуирано и оваа новосинтетизирана верига се нарекува водечката. Кај другата урнек-верига, синтезата на новосинтетизирана верига тече дисконтинуирано, па, се нарекува заостанувачка.

### 8.3 Модели на репликација

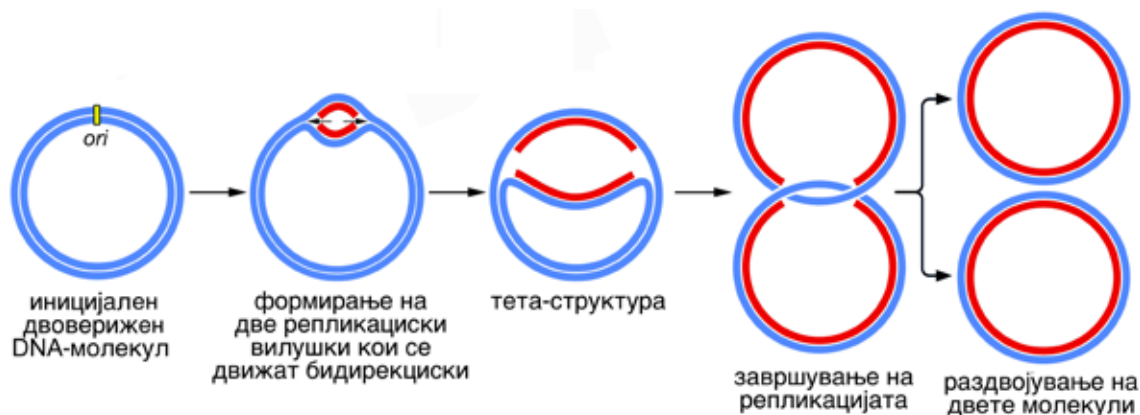
Со оглед на тоа што геномите на најголемиот број бактерии се составени од по еден циркуларен двоверижен DNA-молекул, додека геномите на еукариотските клетки содржат по поголем број линеарни хромозоми, очекувано е дека постојат разлики во молекуларните механизми со кои се реплицираат. Покрај тоа, репликацијата се одвива и кај ентитетите кои не се клеточни, какви што се вирусите и плазмидите, па, неопходно е да се согледаат основните разлики во моделите на репликацијата кај различните DNA-молекули. Заради подобра прегледност, овие три модели се прикажани шематски на **сликата 8-7**.



**Слика 8-7:** Споредба на трите основни механизми на репликација. **A:** Тета-модел на репликација на циркуларните геноми на прокариотските клетки. **Б:** ротирачки модел на репликација кај некои вируси и кај плазмидите. **В:** модел на репликација на линеарните еукариотски хромозоми.

## Тета-модел на репликација

Во циркуларниот геном на прокариотските клетки најчесто има по еден репликациски извор во кој се создаваат две репликациски вилушки кои се движат во спротивните насоки. Со напредување на репликацијата се создава структура која наликува на грчката буква  $\theta$  (тета), па, се нарекува тета-структура (слики 8-7, A и 8-8).



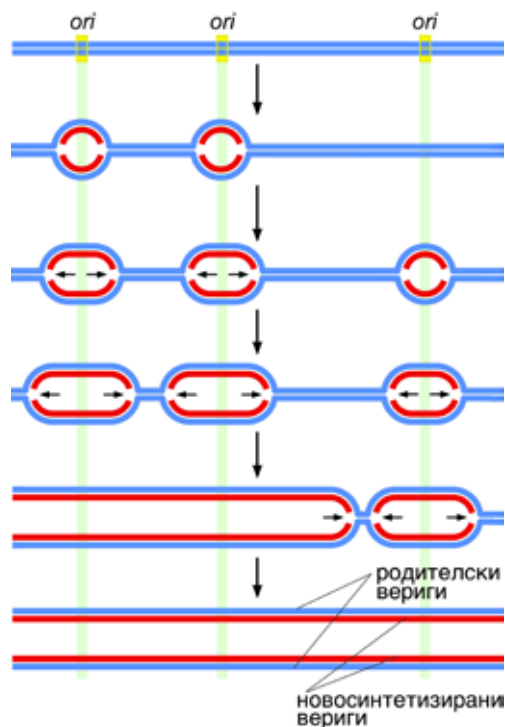
**Слика 8-8:** Шематски приказ на DNA-репликацијата кај циркуларните бактеријски DNA при кој се создава тета-структурата.

### Ротирачки модел на репликација

Репликацијата на геномите на некои вируси, како и на плазмидите се одвива со посебен механизам, наречен и ротирачки модел или репликација на ротирачко тркало (англ. *rolling cycle replication*) (слика 8-7, Б). Повеќе детали за овој модел се дадени во главата 15: Молекуларна генетика на бактериите и вирусите.

### Модел на репликација на линеарните еукариотски хромозоми

За разлика од прокариотските геноми, еукариотските геноми содржат линеарни, а не циркуларни, DNA-молекули кои се далеку подолги и се организирани во повеќе хромозоми. Кај луѓето, геномската DNA содржи повеќе од 6 милијарди базни пара во диплоидниот геном од секоја соматска клетка, распределени во 46 хромозоми, па, на секој од хромозомите се наоѓаат повеќе извори на репликација (слика 8-7, В и 8-9). Тие се раздвоени со интервали од просечно по 100 000 базни пара (скратено: 100 килобазни пара или 100 kb), што овозможува навремено и доволно брзо завршување на целиот процес на репликација.



**Слика 8-9:** Слично како кај прокариотите, DNA-репликацијата се одвива бидирекциски и кај линеарните еукариотски хромозоми, но, на поголем број места истовремено. Почнувајќи од изворот, DNA-полимеразата врши синтеза во две спротивни насоки. Со хоризонтални стрелки се означени правците на движења на репликациските вилушки.



Споредбата на овие три модели е претставена на **табелата 8-1**.

Табела 8-1: Споредба на основните три модели на репликација					
репликациски модел	геном	тек на репликацијата			продукти
		број на репликони	прекини на DNA	насока на движење	
тета-модел	циркуларен	1	нема	бидирекциски	две циркуларни DNA
линеарните еукариотски хромозоми	линеарен	повеќе	нема	бидирекциски	две линеарни DNA
ротирачки модел	циркуларен	1	има	унидирекциски	една циркуларна и една линеарна DNA која може да циркуларизира

Постои и четврт различен модел на репликација на митохондриската DNA, кој е опишан понатаму во главата 16: Геномика.

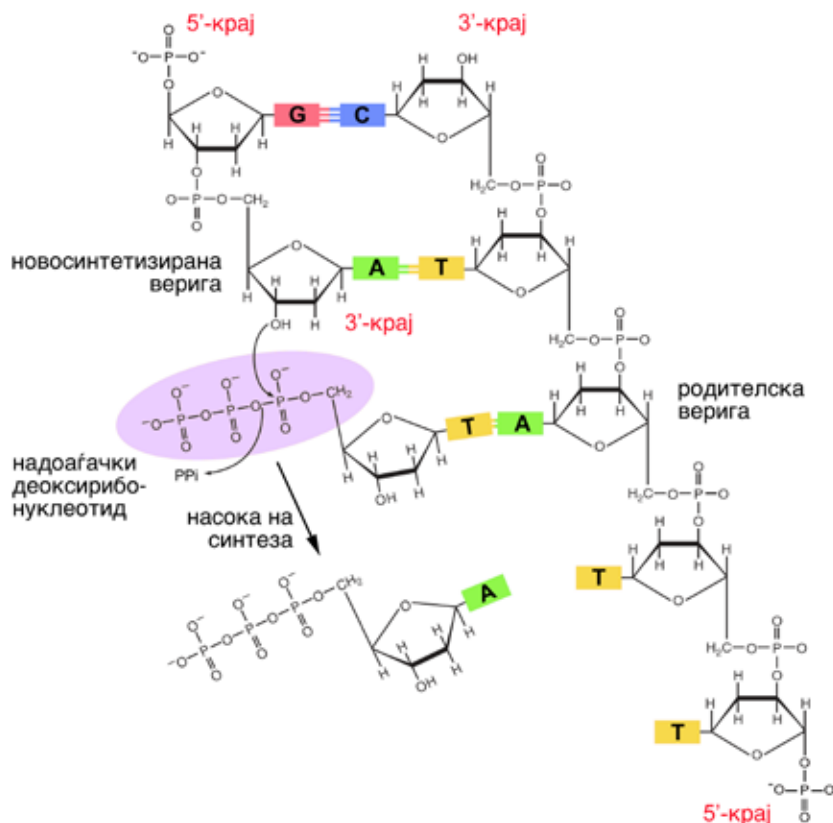
## 8.4 DNA-полимерази

Ензимите кои вршат синтеза на DNA користејќи како урнек едноверижна матична DNA-верига се нарекуваат DNA-полимерази, а во биохемиската литература се означуваат и како: DNA-зависни DNA-полимерази. Оваа класа на ензими содржи повеќе полимерази. Ензимот кој ја врши DNA-репликацијата кај *E. coli* за првпат го изолирал Артур Корнберг (Arthur Kornberg) во 1956 година, по кого е и наречена Корнбергов ензим. За резултатите од овие истражувања, на Корнберг подоцна му е доделена Нобеловата награда. И кај прокариотските и кај еукариотските клетки постојат по неколку типа DNA-полимерази кои се вклучени во процесите на DNA-репликација, како и во репарацијата (поправката) на грешките кои притоа настануваат. Во литературата, DNA-полимеразите се означуваат и со кратенката **Pol**, по која следи соодветната римска бројка (кај прокариотите) или грчка буква (кај еукариотските организми).

Пред воспоставувањето на фосфодиестерската врска, DNA-полимеразата проверува дали доаѓачкиот нуклеотид може да формира водородни врски со нуклеотидот од урнек-веригата. Се претпоставува дека механизмот за проверка е преку формата и димензиите на парот меѓу доаѓачкиот нуклеотид и спротивниот од урнек-веригата. Имено, како што е претходно објаснето, само комплементарните парови имаат димензии кои точно се вклопуваат со активниот центар во ензимот DNA-полимераза. Нуклеотидот кој не е комплементарен во согласност со Вотсон-Криковите правила (A со T и G со C, и обратно) создава пар кој е со премали или со преголеми димензии, па, таквиот нуклеотид се исфрла од ензимот. Брзината на катализираната реакција посредувана со DNA-полимеразата е повеќе од 10000 пати поголема при вградување на комплементарните нуклеотиди, наспроти погрешно спарените. Ова е

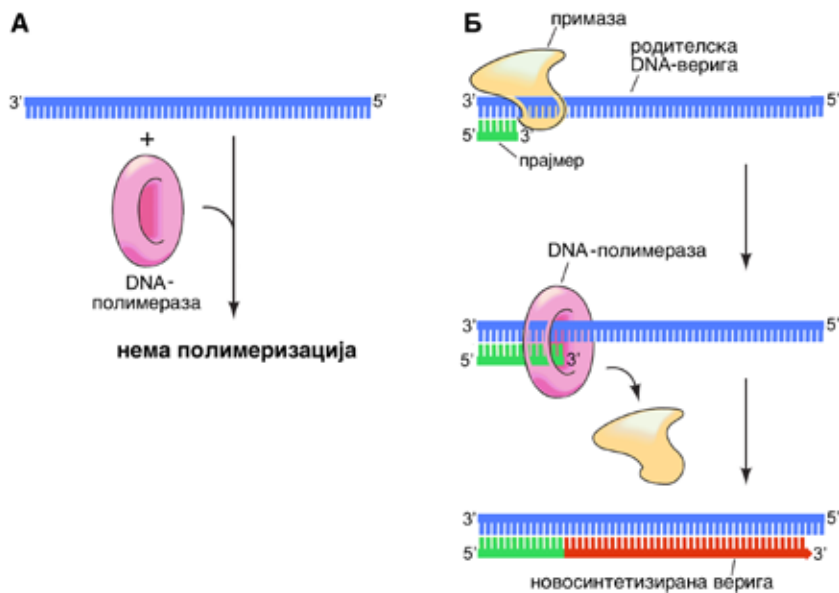
извонреден пример за каталитична селективност, односно способноста на ензимите да имаат драстично повисока брзина на реакцијата само со преферирираниот супстрат, наспроти сличните молекули.

Доколку нуклеотидот е комплементарен со спротивната база од урнек-веригата, DNA-полимеразата катализира воспоставување на ковалентна фосфодиестерска врска. Имено, во активниот центар на ензимот, кислородниот атом од 3'-хидроксилна група (од 3'-крајот на веригата која се синтетизира), врши нуклеофилен напад врз  $\alpha$ -фосфорот од доаѓачкиот деоксирибонуклеотид трифосфат (слика 8-10). Енергијата за создавање на фосфодиестерската врска се користи од самиот нуклеотид кој е во трифосфатна форма, богата со енергија, а при хидролизата се ослободува неоргански пирофосфат.



**Слика 8-10:** Инкорпорирање на нови нуклеотиди со DNA-полимеразата. Заради поголема прегледност, фосфодиестерскиот скелет на двоверижната DNA е прикажан шематски.

Сите досега изолирани DNA-полимерази имаат две важни ограничувања кои се критични за нивната правилна функција (слика 8-11). Прво, синтезата на новите DNA-вериги ја вршат исклучиво од 5' кон 3' крајот (5'→3'). Тоа значи дека комплементарните деоксирибонуклеотиди се додаваат од 3' кон 5' крајот од урнек-веригата, а новосинтетизираната верига расте во 5'→3' насока. Второ, при синтезата, DNA-полимеразите можат да додаваат деоксирибонуклеотиди кои се комплементарни на урнек-веригата само доколку е присутна куса DNA или RNA-секвенца, често пати означена како **прајмер** (иницирачки олигонуклеотид) и која е поврзана со водородни врски со урнек-веригата. Тогаш DNA-полимеразите додаваат нови нуклеотиди на веќе присутната 3'-хидроксилна група од претходниот нуклеотид. Со други зборови, полимеразите не можат да започнат *de novo* синтеза врз урнек-веригата, туку можат



**Слика 8-11:** Ограничувања на активноста на DNA-полимеразата. **А:** полимеризацијата изостанува кога е присутна само урнек-веригата. **Б:** полимеразата ја започнува синтезата само кога на урнек-веригата е врзан DNA или RNA-прајмер, а новосинтезираната верига расте во 5'→3' насока.

само да го „продолжат“ 3' крајот од постојна куса секвенца која е врзана со урнек-веригата. Оттаму и самиот процес на репликација се означува како елонгација или екстензија.

Поради тоа што DNA-полимеразите ги „читаат“ базите од урнек-веригата во насока од 3' кон 5'-крајот, а синтезираат нова комплементарна верига во 5'→3' насока, редоследот на базите кои се додаваат е определен со тој на урнек-веригата.

За одвивање на елонгацијата, неопходно е присуството на трифосфатните форми на сите четири **деоксирибонуклеотиди** (dATP, dTTP, dCTP и dGTP) и тоа во приближно еквимоларни концентрации. Во спротивно, при поголемо намалување на концентрацијата на некој од четирите нуклеотиди, ензимот престанува да врши синтеза и се одвојува од DNA-веригите. Интересно е што DNA-полимеразата има околу 1000 пати повисок афинитет кон деоксирибонуклеотидите иако нивната концентрација во клетките е приближно 10 пати пониска отколку таа на рибонуклеотидите.

За оптимална активност на DNA-полимеразата неопходни се и **дивалентни метални јони** какви што се:  $Mg^{2+}$  или  $Zn^{2+}$ , како и **оптимални услови** (температура, pH и јонска јакост на растворот).

Според типот на реакциите и ензимите кои учествуваат во нив, DNA-репликацијата во клетките на прокариотите и на еукариотите се одвива во 3 фази: иницијација, елонгација и терминација. Важно е да се има предвид дека иста терминологијата на овие три фази се користи и кај процесите на транскрипција и на транслација.

## Прокариотски DNA-полимерази

Првично изолираната **DNA-полимераза I** од *E. coli* не е главниот процесивен ензим, туку има помошна улога при репликацијата, а вклучена е и во репарацијата на оштетената DNA. Во лабораториски услови, со протеолиза на изолираниот ензим може да се добие протеински фрагмент (означен како Клено-фрагмент) кој ја задржува полимеризирачката и лекторската активност.

**DNA-полимеразата II** (наречена и **Din A**) е задолжена за репарирањето на грешките во DNA-молекулите, како и за други функции во текот на репликацијата, а не за директно удвојување.

Кај прокариотските клетки, главниот процесивен ензим кој директно ја врши репликацијата е **DNA-полимеразата III**. Основна карактеристика на овој ензим е полимеризација на DNA веригата чија синтеза е во тек и тоа со додавање енергетски богати, трифосфатни форми на деоксирибонуклеотиди преку воспоставување на фосфодиестерски врски. Во функционирањето на DNA-полимеразата III кај *E. coli* учествуваат најмалку десет типа субединици, некои застапени со по две или повеќе молекули, градејќи комплекс означен како **холоензим DNA-полимераза III**. Изразот холоензим се користи за сите мултипротеински комплекси кај кои активноста на основниот ензим е засилена и помогната со дополнителни акцесорни компоненти. Во лабораториски услови, основна полимеризирачка активност ја покажуваат  $\alpha$ -субединиците од ензимскиот комплекс.

Кај *E. coli* се откриени уште два типа на полимерази: **DNA-полимераза IV** (наречена и **Din B**) и **DNA-полимераза V** кои се вклучени во специфични форми на репарација на оштетена DNA.

Споредбата на функциите на прокариотските DNA-полимерази во текот на репликација се прикажани во **табелата 8-2**.

**Табела 8-2: Споредба на основните прокариотски DNA-полимерази (од *E. coli*)**

полимераза	функции
I	иницирање на DNA-репликацијата и пополнување на празните нуклеотидни места кај Оказак-фрагментите при синтеза на заостанувачката верига
II	DNA-лектура ( <i>proofreading</i> ) и репарација
III	главен процесивен ензим при DNA-репликацијата
IV	DNA-репарација
V	DNA-репарација, транслезиска DNA-синтеза

## Еукариотски DNA-полимерази

При репликацијата на јадрената DNA кај еукариотските клетки, вклучени се најмалку три различни типа DNA-полимерази:  $\alpha$ ,  $\delta$  и  $\epsilon$ , додека репликацијата на митохондриската DNA ја врши посебен ензим: DNA-полимераза  $\gamma$ . Од основните ензими кај еукариотите, присутна е и DNA-полимеразата  $\beta$  која не учествува во репликацијата, туку е задолжена за репарационски функции. Покрај нив, постојат посебни полимерази кои имаат улога во DNA-репарацијата (поправање на грешките) и премостување на оштетените нуклеотиди во DNA-молекулот (т.н. транслезиска репликација). Заради информација, во **табелата 8-3** се прикажани досега познатите DNA-полимерази кај еукариотските клетки.

Табела 8-3: DNA-полимерази кај еукариотските организми

DNA-полимераза	5' → 3' егзо-нуклеазна активност	функции:
<b>α (алфа)</b>	нема	примазна активност при иницирање на DNA-репликацијата и пополнување на празните нуклеотидни места кај Оказаки-фрагментите при синтеза на заостанувачката верига
<b>β (бета)</b>	нема	DNA-репарација и рекомбинација
<b>γ (гама)</b>	има	репликација на митохондриската DNA
<b>δ (делта)</b>	има	репликација на заостанувачката верига при репликацијата на јадрениот геном; DNA-лектура ( <i>proofreading</i> ) и репарација
<b>ε (епсилон)</b>	има	репликација на водечката верига при репликацијата на јадрениот геном; DNA-лектура ( <i>proofreading</i> )
<b>ζ (зета)</b>	нема	транслезиска DNA-синтеза (премостување на тиминските димери)
<b>η (ета)</b>	нема	транслезиска DNA-синтеза (премостување на тиминските димери)
<b>θ (тета)</b>	нема	DNA-репарација
<b>ι (јота)</b>	нема	транслезиска DNA-синтеза (неопходна во текот на мејозата)
<b>κ (капа)</b>	нема	транслезиска DNA-синтеза
<b>λ (ламбда)</b>	нема	DNA-репарација
<b>μ (ми)</b>	нема	DNA репарација
<b>σ (сигма)</b>	нема	возможна улога при репликацијата на јадрениот геном, DNA-репарација, кохезија на сестринската хроматида
<b>ν (ни)</b>	нема	веројатно DNA-репарација и транслезиска DNA-синтеза
<b>Rev1</b>	нема	DNA-репарација (синтеза кај абазичните оштетувања)

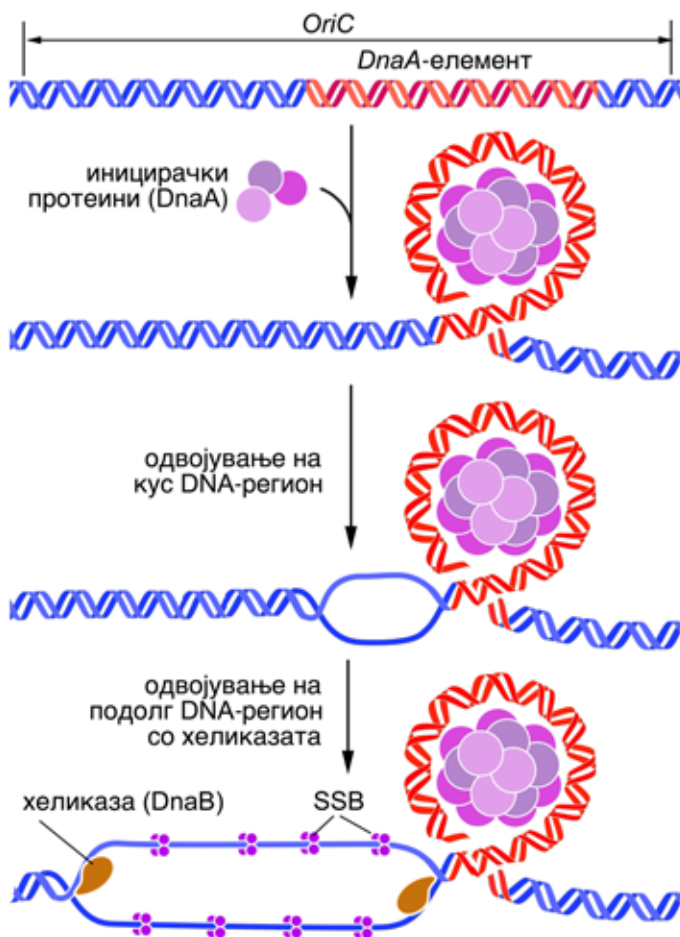
Колку што е досега познато, само DNA-полимеразите кои вршат елонгација (DNA Pol δ, ε) во текот на репликацијата на јадрениот геном, како и митохондриската полимераза γ имаат 3' → 5' егзонуклеазна (лекторска) активност, додека останатите еукариотски полимерази немаат таква активност.

## 8.5 Иницирање на репликацијата

Кај *E. coli* изворот на репликација е означена како *oriC* и ја содржи специфичната DNA-секвенца наречена **DnaA-елемент** кој се повторува неколку пати по должината на *oriC* изворот (слика 8-12).

Со овој елемент се врзуваат **иницирачките протеини**, од кои кај *E. coli* најдобро проучен е протеинот **DnaA**. По врзувањето со овие протеини, двете комплементарни вериги од двоверижниот DNA-хеликс започнуваат да се раздвојуваат преку раскинување на водородните врски и хеликсот почнува локално да се одмотува, во што учествуваат и дополнителни протеини DnaA. Одмотувањето е олеснето и поради тоа што *DnaA*-елементот е богат со А-Т парови, меѓу кои водородните врски полесно се раскинуваат отколку меѓу G-C паровите. Ензимот хеликаза (кој кај *E. coli* се нарекува и протеин **DnaB**) започнува да ги раскинува водородните врски меѓу комплементарни вериги, по што се создава репликациската виљушка. Раздвоените комплементарни вериги од репликациската виљушка мора да се одржат накусо во едновержна состојба за да можат да послужат како урнек и да бидат физички достапни за соодветните ензими. Овие мали протеини специфично и нековалентно се врзуваат со едновержната DNA. Кај бактериите, тоа се протеините **SSB** (од англ. *single strand-binding proteins*) го спречуваат повторното спонтано анилирање. Еквивалент на SSB кај еукариотите е протеинот **RPA** (од англ. *replication protein A*). Набргу потоа се привлекуваат DNA-полимеразата и преостанатите неопходни компоненти, а подоцна, протеините DnaA се отстрануваат.

Фазата на иницирање на репликацијата кај еукариотите е најдобро проучена кај квасните габи и, во основа, е слична како кај *E. coli*. Најголем проблем при ре-



**Слика 8-12:** Иницирање на DNA-репликацијата кај бактерииските клетки. *oriC*: извор на репликацијата кај *E. coli*. **SSB**: протеини кои се врзуваат со едновержна DNA (од англ. *single strand-binding proteins*).

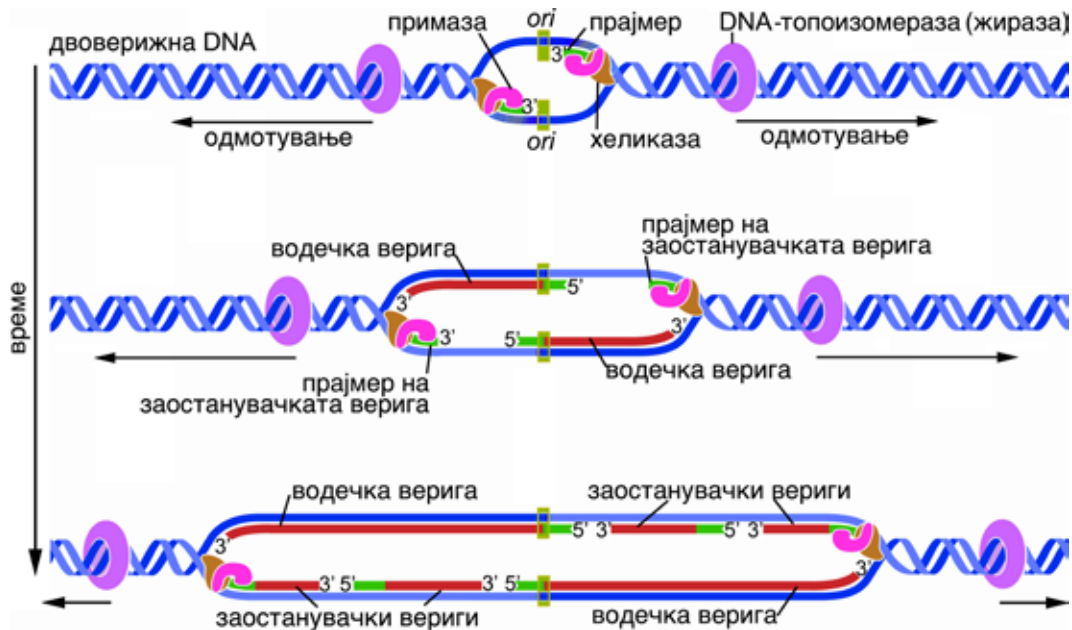


пликацијата на DNA-молекулите во линеарните еукариотски хромозоми е нивната должина. Оттаму, како што е претходно кажано, на еден ист хромозом се наоѓаат голем број извори на репликација. Кај квасните габи, тие извори се нарекуваат **автономно-реплицирачки секвенци (ARS)**, од англ. *autonomously replicating sequences*) содржат карактеристични консензусни DNA-секвенци со должина од 11 базни парови кои се препознаваат од посебни протеини што се врзуваат со нив и овозможуваат привлекување на други протеини и ензими неопходни за DNA-репликацијата. Вакви секвенци не се најдени кај мамалиските организми, па, се претпоставува дека клучни за препознавање на нивните извори се модификациите на хроматинската структура. По ова, кај еукариотите се формира т.н. **комплекс за иницирање на репликацијата (ORC)** од *origin recognition complex*) кој привлекува два протеини: **Cdc6** и **Cdt1**. Натомашниот тек на иницирањето е сличен како кај прокариотите, иако е посложен.

## 8.6 Елонгација на репликацијата

При процесот на елонгација на репликацијата, двојниот хеликс на матична DNA се одмотува преку раскинување на водородните врски меѓу двете комплементарни вериги кои стануваат урнек за синтеза на нови комплементарни вериги (**слика 8-13**).

**Хеликазата** е ензим кој се движи по должината на двоверижниот DNA-хеликс и ги одмотува и раздвојува двете вериги, користејќи ја хемиската енергија од ATP за раскинување на водородните врски. При овој процес, одмотувањето на двоверижниот



**Слика 8-13:** Поедноставен шематски приказ на динамика на елонгацијата при репликацијата на DNA. Според двете комплементарни урнек-вериги (матична DNA), синтезата на водечката верига тече континуирано, додека таа на заостанувачката верига тече дисконтинуирано.

хеликс во реплизомот предизвикува прекумерно извртување на DNA-молекулот кој е на фронтот од репликациската виљушка. Прекумерното извртување се релаксира со помош на DNA-топоизомеразата, која е лоцирана на почетниот дел од реплизомот.

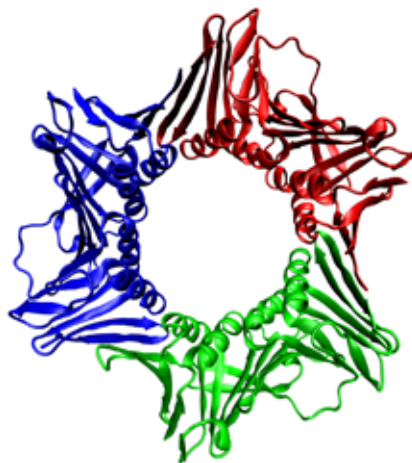
Раздвоените комплементарни вериги накусо се стабилизираат со протеините SSB кај *E. coli* (односно RPA кај еукариотите).

Прајмерите се синтетизираат со посебен комплекс на протеини и ензими наречен **примозом**, во кој најважна улога има **примазата**. Овој ензим синтетизира RNA-олигонуклеотиди со должина од околу 8 до 12 бази кои се комплементарни со урнек-веригата. За водечката верига е потребен само еден прајмер и натамошната синтеза на комплементарната полинуклеотидна (нова) верига тече континуирано, сè до терминацијата на процесот. Кај заостанувачката верига е потребен нов прајмер за синтезата на секој Оказаки-фрагмент засебно. Кај прокариотите, RNA-прајмерот се продолжува и кај водечката и кај заостанувачката верига со ензимската активност на DNA-полимеразата III формирајќи нова DNA-верига која е комплементарна на урнекот. По околу 1000 до 2000 инкорпорирани нуклеотиди, DNA-полимеразата III се одвојува од заостанувачката верига со што прекинува и синтезата на фрагментот. По ова, започнува синтеза на нов Оказаки-фрагмент.

Кај еукариотската репликација, синтезата на секој прајмер ја започнува **DNA-полимеразата  $\alpha$**  (еквивалент на примазата), а потоа, синтезата на водечката верига ја продолжува главниот процесивен ензим **DNA-полимеразата делта (Pol  $\epsilon$ )**, додека заостанувачката верига ја продолжува **DNA-полимеразата епсилон (Pol  $\delta$ )**. Од тоа произлегува дека при репликацијата на заостанувачката верига, наизменично се менуваат DNA-полимеразите  $\alpha$  и  $\delta$ , што се нарекува **полимеразна замена**. Оказаки-фрагментите се помали отколку кај прокариотската репликација и имаат должина од околу 100 до 400 нуклеотиди.

Во репликацијата учествуваат и т.н. **акцесорни протеини** кои овозможуваат координираност на синтезата на водечката и заостанувачката DNA-верига, како и стабилизирање на каталитичните компоненти на реплизомот. Еден од важните акцесорни протеини е т.н. **лизгачка стега** (означена како  $\beta$ -протеин кај бактеријата *E. coli*, а како PCNA кај еукариотите), која како обрач ја опфаќа DNA-веригата и со тоа механички ја обезбедува правилната позиција на DNA-полимеразата III (**слика 8-14**).

Главниот проблем кај репликацијата е што синтезата на новите вериги во репликациската виљушка тече во спротивни насоки кај водечката во однос на заостанувачката верига, што е последица на ограничувањето на DNA-полимеразата да врши синтеза само во 5'→3' правец. Поради тоа, заостанувачката верига формира јамка со што ен-

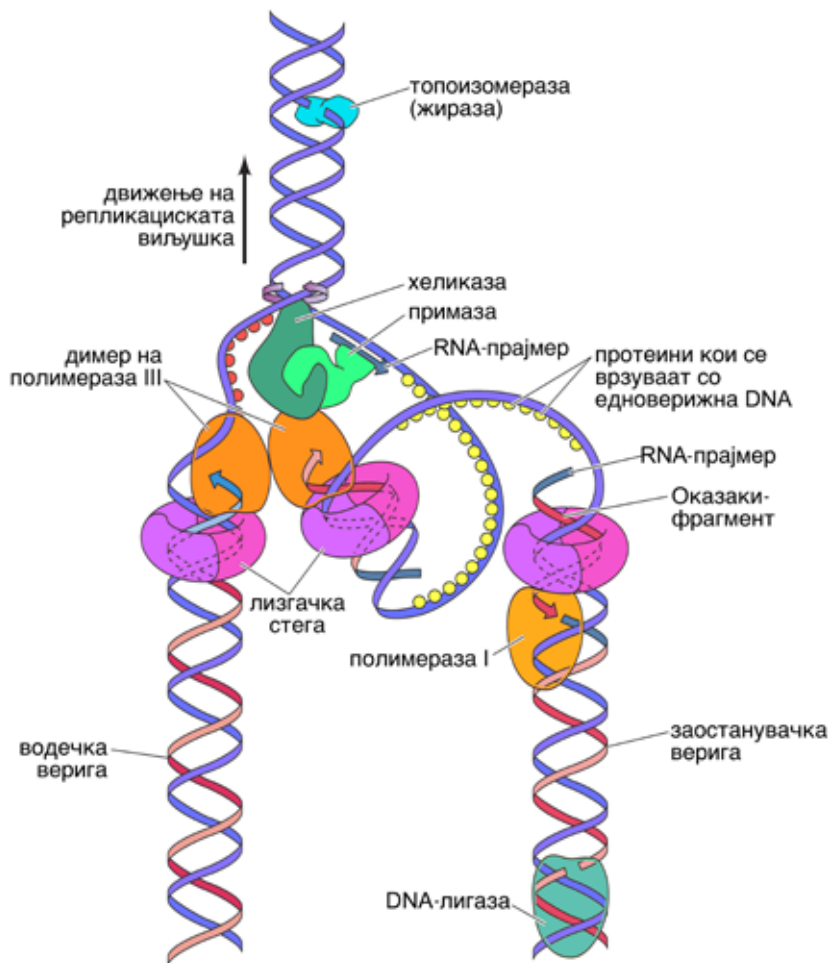


**Слика 8-14:** Молекуларен модел на структурата на човековиот протеин PCNA (од англ. *proliferating cell nuclear antigen*-јадрен антиген од пролиферирачки клетки), кој ја извршува функцијата на лизгачка стега во еукариотските клетки. Прикажаниот модел се однесува на лизгачката стега кој создава тример од три протеински молекули.

зимскиот комплекс кој ја врши репликацијата, може да се движи во иста насока, како што напредува репликациската виљушка.

### Репликом-молекуларна машина за репликација

Репликацијата на DNA се одвива со помош на повеќе ензими и протеини кои формираат посебен комплекс кој делува како молекуларна машина за синтеза на DNA означена и како **репликом** (слика 8-15). Репликомот ја опфаќа и репликациската виљушка, но, е израз кој пореално ја отсликува комплексноста на протеинската машинерија која учествува во репликацијата. Во основа, сите компоненти функционираат оркестрирано и вршат синтеза на нови комплементарни вериги по урнекот на „стариот“ DNA-хеликс.



**Слика 8-15:** Шематска структура на репликомот-молекуларна машина која ја извршува репликацијата со координирана активност на повеќе ензими и протеини.

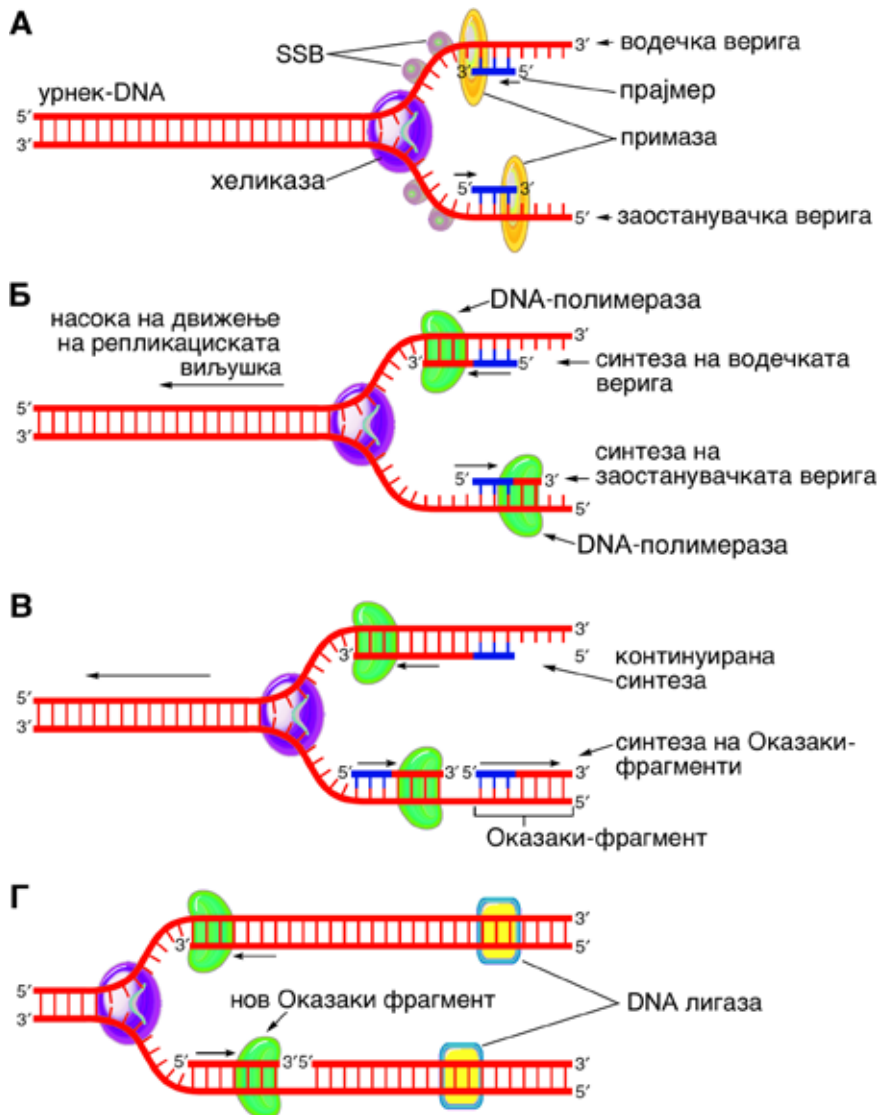
Во **табелата 8 -4** се прикажани најважните компоненти на реплизомот кај *E. coli*.

<b>Табела 8-4: Компоненти на реплизомот кај <i>E. coli</i></b>		
<b>протеин</b>	<b>број на субединици</b>	<b>функција</b>
<b>SSB</b>	4	врзување со едноверижна DNA
<b>хеликаза (DnaB протеин)</b>	6	раздвојување на DNA хеликсот преку раскинување на водородните врски
<b>примаза (DnaG протеин)</b>	1	синтеза на RNA прајмери
<b>DNA полимераза III</b>	17	елонгирање на DNA веригата
<b>DNA полимераза I</b>	1	ексцизија на RNA прајмерите и пополнување на „празнините“ по ексцизијата
<b>DNA лигаза</b>	1	лигација
<b>жираза (DNA топоизомер-аза)</b>	4	одржување на потребното ниво на спирализираност

Во текот на синтезата на заостанувачката верига, DNA-полимеразата I ги отстранува рибонуклеотидите од RNA-прајмерите од Оказаки-фрагментите, кај прокариотите, додека во еукариотските клетки, таа улога ја има ензимот **RNаза H**. Овој ензим ги отстранува сите рибонуклеотиди од прајмерот во Оказаки-фрагментот, освен последниот, кој го отстранува нуклеазата **FEN1** (од англ. *flap endonuclease 1*), во литературата означена и како **MF1**.

Со отстранувањето на RNA-прајмерите привремено настануваат прекини меѓу Оказаки-фрагментите во таа верига. Пополнувањето на „празните“ места го врши DNA-полимеразата I кај прокариотите, а Pol  $\alpha$  кај еукариотските клетки. Ензимот **DNA-лигаза** ковалентно го спојува 3'-крајот од пополнетиот Оказаки-фрагмент со 5'-крајот од следниот Оказаки-фрагмент. Со тоа, лигазата катализира формирање на фосфодиестерски врски меѓу 5'-фосфатната група од едниот фрагмент, со 3'-хидроксилната група од другиот фрагмент. Интересно е што бактериската лигаза го користи коензимот NAD<sup>+</sup> како извор на енергија.

Досега се опишани 13 компоненти на реплизомот кај *E. coli*, а кај квасните габи и кај клетките од цицачите идентифицирани се најмалку 27 компоненти. Шематски, основните чекори на репликацијата се прикажани на **слика 8-16**.



**Слика 8-16:** Шематски приказ на динамиката на DNA-репликацијата. **A:** Формирање на репликациската виљушка и асемблирање на реплизомот. При елонгацијата со DNA-полимеразата III, примазата синтетизира по еден RNA-прајмер за секој нов Оказаки-фрагмент, во интервали. **Б:** Синтезата на DNA кај заостанувачката верига продолжува се додека фрагментот не достигне до претходно додадениот прајмер од следниот Оказаки-фрагмент. На местото на репликациската виљушка повторно се синтетизира нов прајмер со што процесот започнува одново. **В:** RNA-прајмерите се отстрануваат од Оказаки-фрагментите со DNA-полимеразата I и настанатите празнини се пополнуваат со комплементарни нуклеотиди. **Г:** DNA-лигазата ги поврзува пополнетите сегменти. SSB: протеини кои се врзуваат со едноверижна DNA.

## Динамика на репликацијата

Комплексноста на функцијата на реплизомот е условена од потребата од координација на DNA-синтезата меѓу водечката и заостанувачката верига. Кај *E. coli*, координираната активност на двете молекули на полимеразата III е олеснета со нивното физичко поврзување во веќе споменатиот мултипротеински холоензим. Меѓу преостанатите компоненти, холоензимот полимеразата III содржи три ензими: по две молекули на основната полимеразата III и еден т.н.  **$\gamma$ -комплекс**. Овој комплекс е составен од лизгачката стега, **поставувачот на лизгачката стега** (наречен  **$\gamma$ -протеин** кај *E. coli*, а RFC кај еукариотите) и две молекули на  **$\tau$ -протеинот** (се чита тау) кој ги поврзува двете молекули на полимеразата III (**слика 8-17, А**). Во реплизомот, едниот молекул на полимеразата III врши синтеза на водечката верига, а вториот на заостанувачката. Се претпоставува дека репликацијата кај **прокариотските клетки** се одвива низ следниве чекори:

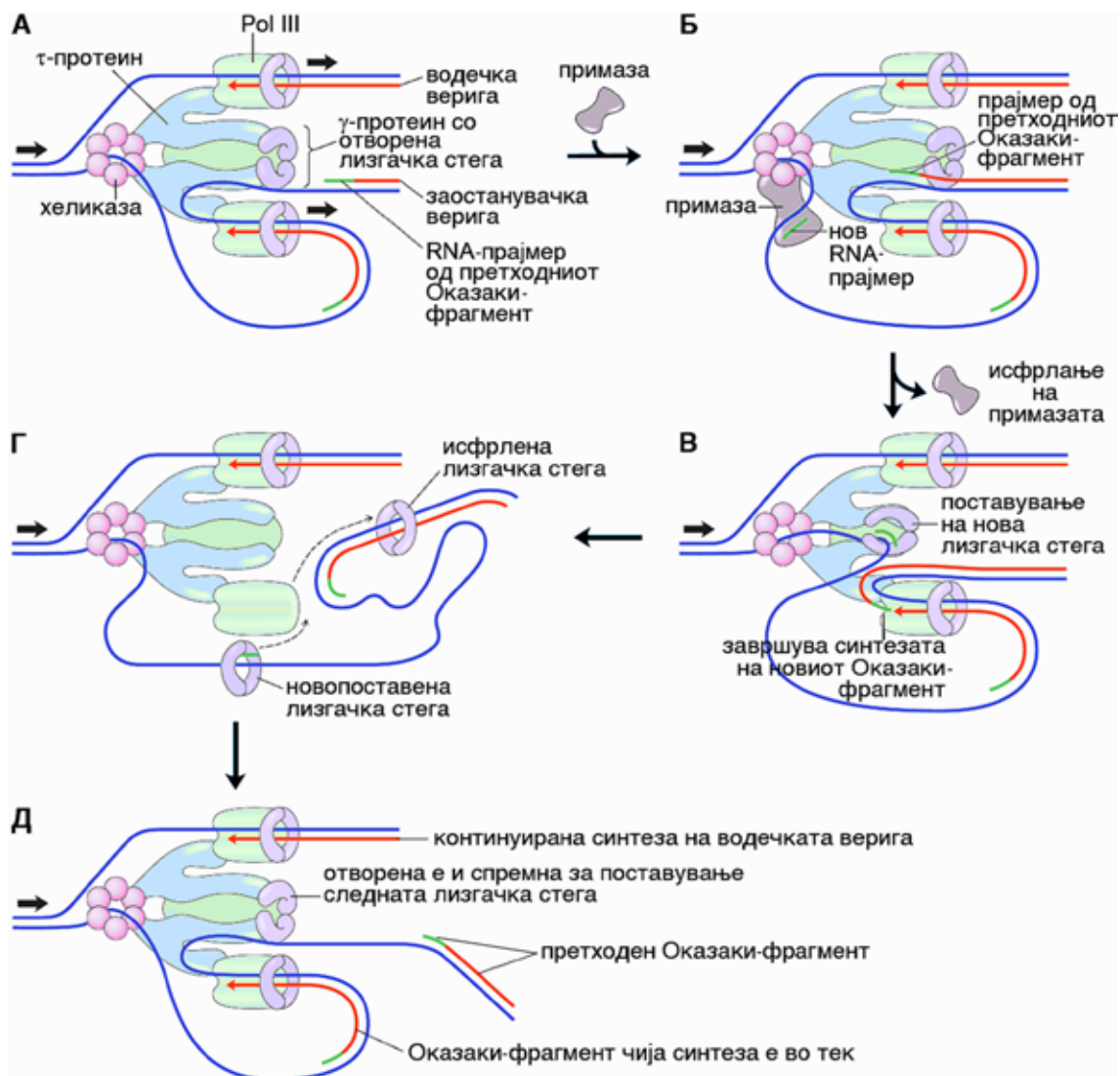
1. хеликазата ги раздвојува двете вериги од DNA-хеликсот со кои веднаш се врзуваат со протеините SSB. Примазата синтетизира RNA-прајмери врз секоја од двете родителски урнек-вериги. Синтезата на водечката верига тече континуирано, додека на заостанувачката верига тече дисконтинуирано. Двата димери на ензимот полимеразата III се поставени паралелно еден до друг со иста ориентација, а синтезата на новите вериги тече во 5'→3' насока. Со оглед на спротивните ориентации на урнек-веригите, единствен начин синтезата на заостанувачката верига да се одвива во соодветната насока е да формира јамка во реплизомот;
2. врз секоја од двете едноверижни родителски урнеци се поставува по една лизгачка стега. Поставувачот на лизгачката стега е посебен протеин со АТФ-азна активност кој најпрво се врзува со АТФ, ја отвора прстеновидната лизгачка стега и ја поставува врз DNA-хеликсот. По хидролизата на АТФ, поставувачот се одвојува, а лизгачката стега се затвора и го опфаќа DNA-молекулот како кружен обрач. Потоа, лизгачката стега правилно ги поставува двете веригите со секоја од двете молекули на полимеразата III поврзани со  $\tau$ -протеинот во холоензимскиот комплекс (**слика 8-17, А**). Освен тоа, експериментално е докажано дека контактот на стегата со DNA-полимеразата во реплизомот предизвикува драматично зголемување на ензимската активност;
3. секој нов Оказаки-фрагмент започнува со повторна синтеза на RNA прајмер на заостанувачката верига (**слика 8-17, Б**);
4. примазата се отстранува од реплизомот, а кога синтезата на Оказаки-фрагментот е завршена, се поставува нова лизгачка стега (**слика 8-17, В**);
5. по довршување на секој Оказаки-фрагмент, целата јамка на заостанувачката верига се отпушта од холоензимскиот комплекс (**слика 8-17, Г**);
6. новопоставената лизгачка стега ја поставува ослободената заостанувачка верига на полимеразата III од комплексот по што ензимот врши екстензија на прајмерот синтетизирајќи нов Оказаки-фрагмент (**слика 8-17, Д**);
7. полимеразата I ги отстранува RNA-прајмерите и ги заменува со деоксирибонуклеотиди, а DNA-лигазата ги воспоставува фосфодиестерските врски.

Овие чекори се повторуваат сè додека холоензимскиот комплекс не се одвои од родителскиот DNA-хеликс, односно додека не заврши репликацијата на тој репликон. Во текот на тоа време, синтезата на водечката верига се одвива континуирано.



Поради формата на реплизомот според опишаната динамика на репликацијата, овој модел се нарекува и тромбонски. Постојат спротивставени мислења околу тоа дали реплизомот и динамиката на репликацијата се слични и во еукариотските клетки. Некои автори сугерираат дека активноста на двете главни полимерази не е така координирана и кај еукариотите, па, дури и дека кај нив нема такви реплизомски машинерии. Сепак, во литературата доминираат претпоставките дека репликацијата на еукариотските геноми се врши со слични реплизоми и со слична динамика како и кај прокариотите.

Наспроти широко распространетиот модел на DNA-репликација кај *E. coli*



**Слика 8-17:** Шематски приказ на најважните чекори (А - Д) на DNA-репликацијата според моделот за координирана репликација на водечката и заостанувачката верига со димерот на DNA-полимеразата III и придружните протеини.

кај кој реплизомот се движи по должината на DNA-молекулот, во последниве години почнува да преовладува хипотезата за т.н. репликациска фабрика. Според оваа претпоставка заснована на определени експериментални податоци, реплизомот е статичен, а DNA-молекулот се вовлекува во него, слично како што филмската трака се вовлекува и излегува од кино-проекторот.

## 8.7 Регулација на суперспиралноста во текот на репликацијата

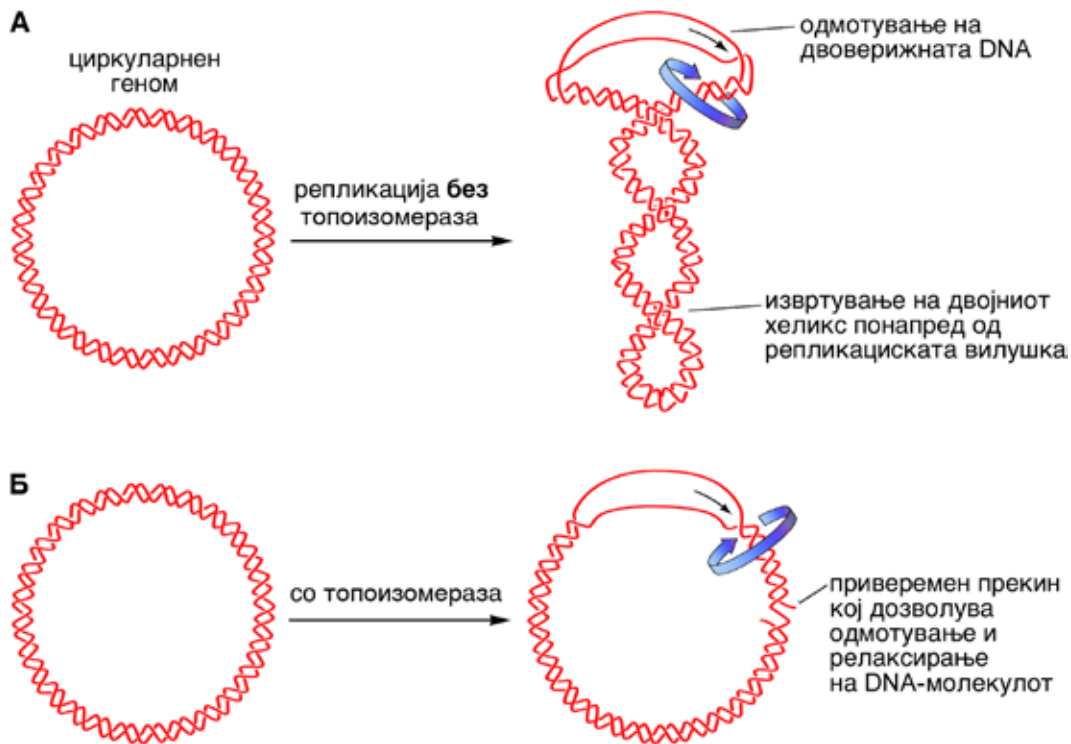
Движењето на реплизомот по должината на двоверижната DNA предизвикува појава на региони со суперспиралност и извртувања во едната насока, а одвиткување и негативна спирализираност во спротивната насока, па, истите мораат да бидат доведени до степенот на нормална спирализираност за да не ја попречуваат механички репликацијата.

Како што е веќе спомнато, локалната топологија на DNA-молекулите ја регулираат посебни ензими означени како топоизомеразите. За остварување на функцијата, овие ензими поседуваат три типа на активности: **нуклеазна активност** (привремено ги раскинуваат фосфодиестерските врски во едната или во двете вериги од двојниот DNA-хеликс), вршат промена на степенот на извртување (одмотување или замотување на DNA-хеликсот) и **лигазна активност** (повторно воспоставување на фосфодиестерските врски во DNA-веригите).

Според механизмот на дејствување, топоизомеразите се поделени на **два типа (класи)**:

- DNA-топоизомеразата од **типот I** ја намалува суперспиралноста со предизвикување привремен **прекин само на едната верига** по што дозволува одмотување на преплетената DNA, и по релаксирањето, повторно ја воспоставува фосфодиестерската врска. Овој тип на ензими немаат потреба од користење на ATP за својата активност, туку, веројатно, ја користат торзионата енергија ослободена со релаксирањето на суперспирализираната DNA. Покрај тоа, се смета дека привремено ја складираат енергијата ослободена од прекилот на фосфодиестерската врска, а потоа таа енергија ја искористуваат за својата лигазна активност. Кај *E. coli*, топоизомеразите од тип I вршат релаксирање на негативните суперспирали (т.е. DNA-хеликсите кои имаат помал број извртувања отколку при релаксирана состојба). Наспроти тоа, овој тип ензими кај еукариотските клетки врши релаксирање и на негативните и на позитивните суперспирални DNA-молекули (т.е. тие кои имаат различен број извртувања отколку при релаксирана состојба).
- DNA-топоизомеразата од **типот II** предизвикува привремен двоверижан прекин на DNA-хеликсот, врши промена на степенот на спирализираност и го лигира прекилот. Овој тип ензими ја трошат енергија преку хидролиза на ATP и можат да релаксираат како негативна така и позитивна суперспиралност на DNA-молекулите во сите типови на клетки (прокариотски и еукариотски). Бактерискиот ензим **DNA-жираза** е форма на топоизомераза од тип II, која ја одржува суперспирализацијата на бактериската DNA во текот на репликацијата (**слика 8-18**).

Освен функционалната поделба на два типа на топоизомеразите, овие ензими имаат конкретни имиња, но, проблематична е нивната понова номенклатура кај која се користат римски броеви, што може да делува збунувачки. (**табела 8-5**). Имено, DNA-топоизомеразите I, III и V се класифицирани под типот I, додека DNA-жиразата, како и топоизомеразите II, IV и VI се од типот II.



**Слика 8-18:** Суперспирализација и релаксирање на бактериската DNA при репликацијата. **А:** Поради бидирекциското движење на двете репликациски вилушки, без топоизомеразна активност, доаѓа до суперспиралност на DNA-хеликсот при репликација на циркуларниот бактериски геном. **Б:** со активност на DNA-жиразата ензимски се релаксираат суперспиралните региони на DNA-хеликсот во текот на репликацијата.

**Табела 8-5: Класификација на топоизомеразите**

тип	суптип	прес. на DNA	хидролиза на ATP	зависност од метални јони	прокариоти	еукариоти
I	IA	едно.	-	+	топоизомераза I топоизомераза III	топоизомераза III
	IB	едно.	-	-	/	топоизомераза I
	IC	едно.	-	+(?)	топоизомераза V (кај археите)	/
II	IIA	двов.	+	+	DNA жираза топоизомераза IV	топоизомераза II
	IIВ	двов.	+	+	топоизомераза VI (кај археите)	топоизомераза VI (кај некои виши растенија)

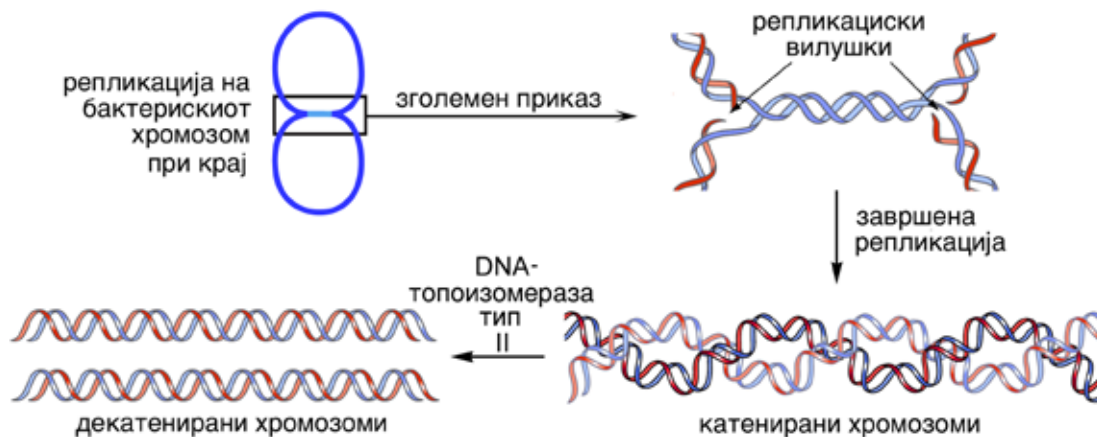
**Кратенки:** едно. - едноверижна DNA; двов. - двоверижна DNA

Виталната улога на топоизомеразите за репликацијата и животот на клетката може да се илустрира и со фактот што инхибиторите на еукариотската топоизомераза I каков што е **топотеканот**, на пример, или на топоизомеразата II (**етопозид**, на пример), се користат како моќни цитостатици при хемотерапијата на некои форми на рак кај луѓето. Покрај тоа, терапевтските антибиотици од класата **хинолони** (ципрофлоксацин, на пример) се силни инхибитори на бактериската DNA-жираза и се користат во медицината за лекување на бактериските инфекции.

## 8.8 Терминирање на DNA-репликацијата

Прекилот на репликацијата е еднакво важен како и нејзината иницијација. Кај бактериските клетки (каква што е *E. coli*) кои содржат циркуларни геноми, ако иницирањето на репликацијата се одвива бидирекциски од еден извор, терминацијата ќе се случи на половина круг од изворот. Терминацијата е активен процес и се случува на специфични DNA-секвенци означени како **терминирачки секвенци** кои се места за врзување со посебни протеини, каков што е **протеинот Tus** кај бактериите. Процесот на терминирање на репликацијата кај еукариотите е многу помалку проучен.

Завршувањето на репликацијата на циркуларните геноми кај прокариотите резултира со два тополошки преплетени (**катенирани**) DNA-молекули (**слика 8-19**). За нивно раздвојување (декатенација), потребна е ензимска активност на посебна форма на DNA-топоизомераза од типот II.



**Слика 8-19:** Декатенација на преплетените циркуларни DNA-молекули со DNA-топоизомераза од типот II при завршувањето на репликацијата на бактерискиот хромозом.

## 8.9 Брзина и прецизност на репликацијата

DNA-полимеразите имаат различна брзина на синтеза која е највисока кај прокариотската полимеразата III со просечна брзина до 1000 инкорпорирани нуклеотиди во секунда, додека еукариотските полимеразии се значително побавни: вградуваат по околу 50 нуклеотиди во секунда. Поради тоа, како и поради многу покомплексниот геном, при DNA-репликацијата во секоја еукариотска клетка истовремено се активни илјадници реплизоми.

Покрај тоа, полимеразите се разликуваат и по **процесивноста**, особина карактеристична за ензимите кои дејствуваат врз полимерни супстрати какви што се нуклеинските киселини. Кај DNA-полимеразата, процесивноста се однесува на бројот на нуклеотидите кои се инкорпорираат при синтезата на новите вериги пред ензимот да се одвои од веригата. Понатаму, синтезата ја продолжува истиот или друг молекул на ензимот.

Правилната репликација на DNA-молекулите, а со тоа и на целиот геном, е клучна за преживувањето на клетката или целиот организам. Репликациските грешки, доколку останат непоправени, можат да доведат до разни типови на мутации кои предизвикуваат промени, заболувања или смрт на организмот, за што повеќе ќе е стане збор понатаму. Грешките кои можат да се случат во текот на репликацијата се минимизирани со високата прецизност на ензимот и на целиот процес на репликација, како и со посебни механизми на репарација на погрешно спарените бази или погрешно вметнатите нуклеотиди.

Сепак, треба да се има предвид дека геномите не се статични и покрај високата прецизност на DNA-репликацијата. Грешките при репликацијата можат да предизвикаат генетски мутации, а повеќе детали за нив се дадени понатаму во главата 14: Генски мутации и нивна поправка.

Во однос на точноста на процесот, DNA-полимеразата ја синтетизира новата верига на секоја од матичните (урнек) вериги со точно инкорпорирање на соодветна комплементарна база, во согласност со Вотсон-Криковите правила (A со T и G со C). DNA-полимеразите не се апсолутно совршени ензими, па, при репликацијата кај *E. coli*, грешките се случуваат статистички еднаш на секои  $10^4$  до  $10^5$  додадени нуклеотиди. Но, по терминирањето на репликацијата, мутациските стапки се во опсег од само еден погрешно спарен нуклеотид на секои  $10^9$  до  $10^{10}$  додадени нуклеотиди. Причините за ваквата точност барем делумно се должат на тоа што и DNA-полимеразата I и полимеразата III имаат т.н. 3' кон 5' егзонуклеазна активност. Оваа ензимска функција овозможува своевидна „лектура“ на новосинтетизираните вериги, кои се споредуваат со матичните (урнек) вериги, и сите несогласувања, односно погрешно спарени нуклеотиди се отстрануваат.

Заради поедноставно објаснување, лекторската 3'→5' егзонуклеазна функција на DNA-полимеразите може сликовито да се спореди со пишувањето на тастатурата на персоналниот компјутер. Имено, ако при внесувањето на текст во соодветен компјутерски програм се напише погрешна буква на почетокот од некој збор, откога ќе биде забележана грешката, со притискање на копчето „Backspace“, тогаш сите букви се бришат наназад (од десно кон лево), сè додека не се избрише и погрешната буква, по што може да се продолжи со пишувањето. По аналогија, слично функционира и 3'→5' егзонуклеазната лектура на DNA-полимеразите. Споредбата на лек-

торските активности, како и на брзината и процесивноста на основните три типа на DNA-полимерази кај *E. coli* се прикажани во **табелата 8-6**.

**Табела 8-6: Карактеристики на DNA-полимеразите кај *E. coli***

карактеристика:	DNA полимераза:		
	I	II	III
3' → 5' егзонуклеазна (лекторска) активност	има	има	има
5' → 3' егзонуклеазна активност	има	нема	нема
брзина на полимеризација (нуклеотиди/секунда)	16 - 20	40	250 - 1 000
процесивност (број на инкорпорирани нуклеотиди пред одвојување на полимеразата од урнек-веригата)	3 - 200	1 500	>500 000

## 8.10 Специфики на DNA-репликацијата кај еукариотите

Иако репликацијата на DNA се одвива слично и кај прокариотите и кај еукариотите, сепак, далеку поголемата комплексност на еукариотските клетки е придружена и со определени разлики во однос на овој процес. Во претходниот текст се опишани повеќе разлики во DNA-репликацијата меѓу прокариотите и еукариотите. Споредбата на поважните ензими и протеински компоненти во реплизомите кај прокариотските и кај еукариотските клетки, како и нивната терминологија, се прикажани во **табелата 8-7**.

Како што е веќе наведено, DNA-молекулите во еукариотските клетки се многукратно подолги отколку во прокариотските. Освен тоа, DNA-молекулите кај еукариотите се поврзани со хистони и други протеини кои овозможуваат структурна организација на нуклеозомите во хроматински нишки од кои се градени хроматидите.

Заради одржување на правилниот број на DNA-молекули и на хромозоми во клетките, репликацијата мора да започне и да заврши синхронизирано со сите фази на клеточниот циклус. Кај еукариотските клетки, репликацијата на геномската DNA мора да биде координирана со клеточната делба пред делбата на клетката, со цел од секој хромозом да се добијат по две идентични хроматиди. Правилното координирање и временскиот распоред на овој процес се остварува со повеќе молекуларни механизми. Прецизното регулирање на клеточниот циклус и делбата на клетката е поопширно објаснето понатаму.

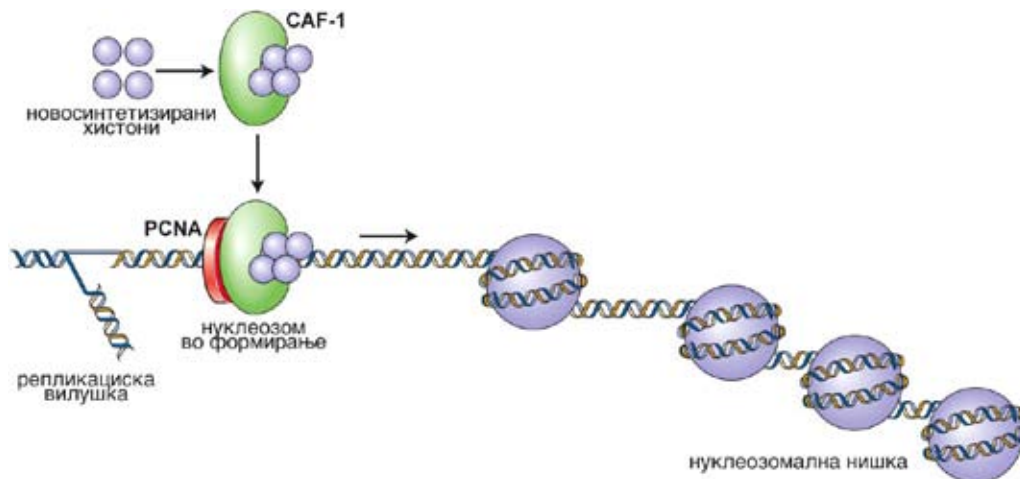


**Табела 8-7: Споредба на ензимите и протеините кои учествуваат во репликацијата на DNA кај прокариотите и кај еукариотите**

компонента или функција	прокариоти ( <i>E. coli</i> )	еукариоти (цицачи)
препознавање и врзување со изворот на репликација	DnaA протеин	ORC
регулирање на суперспиралноста	DNA жираза / топоизомераза I	топоизомераза II
хеликаза (одвивање на двоверижна DNA)	DnaB протеин	Mcm комплекс
примаза (синтеза на куси RNA-прајмери)	DnaG протеин	комплекс на Pol $\alpha$ и примаза
отстранување на RNA-прајмерите од секој Оказаки-фрагмент	Pol I	RNаза H и FEN1 (MF1) ? Pol $\epsilon$
пополнување на празните нуклеотидни места кај Оказаки-фрагментите при синтеза на заостанувачката верига	Pol I	Pol $\alpha$
главен процесивен ензим	Pol III	Pol $\delta$ Pol $\epsilon$
започнување на синтезата на новата верига по прајмерот	Pol III	Pol $\alpha$
лизгачка стега	$\beta$ -протеин	PCNA
поставувач на лизгачката стега	$\gamma$ -комплекс	RFC
протеини кои се врзуваат со едноверижна DNA	SSB	RPA

**Ознаки:** **SSB** (од англ. *single strand-binding*) - протеини кои се врзуваат со едноверижна DNA кај прокариотите. **RPA** (од англ. *replication protein A*): репликациски протеин *A* - протеини кои се врзуваат со едноверижна DNA кај еукариотите. **RFC** (од англ. *replication factor C*): репликациски фактор *C* - поставувач на лизгачката стега. **ORC** (од англ. *origin recognition complex*): комплекс на протеини кои го препознаваат и се врзуваат со изворот на репликација во еукариотските хромозоми. **PCNA** (од англ. *proliferating cell nuclear antigen*): јадрен антиген од пролиферирачки клетки - функционален еквивалент на лизгачка стега во еукариотските клетки.

Во текот на репликацијата, нуклеозомските протеини мораат привремено да се одвојат од DNA-молекулите, а по репликацијата, повторно и правилно да се поврзат со DNA-молекулите-ќерки во соодветните нивоа на структурна организација. Во текот на репликацијата, хистонските протеини од постојните нуклеозоми, како и новосинтетизираните хистони, се распределуваат по принципот на случајност во нуклеозомите кои се формираат на DNA-веригите-ќерки. Протеинот **CAF-1** (од англ. *chromatin assembly factor 1* - **фактор за асемблирање на хроматинот**) се врзува со хистоните и ги доведува до PCNA протеинот во реплизомот каде што се асемблираат во нови нуклеозоми (**слика 8-20**).



**Слика 8-20:** Асемблирање на нуклеозомите во текот на DNA-репликацијата. Заради поедноставување, прикажано е асемблирањето на нуклеозомите само на едната од двете реплицирани DNA-молекули. Протеинот PCNA е еукариотски еквивалент на лизгачката стега.

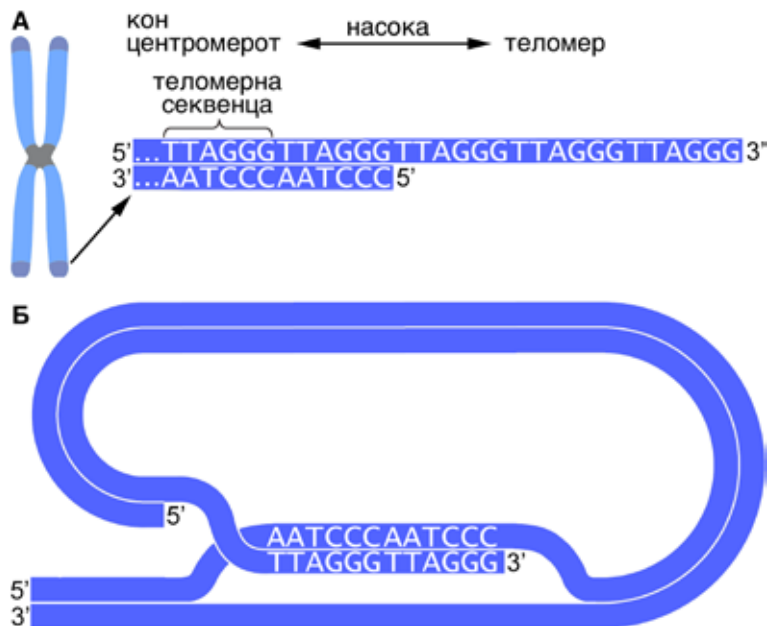
Репликацијата на митохондриската и хлоропластната DNA се разликуваат од досега опишаните модели за репликација на бактерискиот циркуларен и од еукариотскиот јадрен линеарен геном, па, се подетално опишани понатаму во главата 16: Геномика.

### 8.11 Теломери и теломераза

Како што е претходно напоменато, на секој од краевите од краците на еукариотските хромозоми се наоѓаат специјализирани хетерохроматински структури наречени **теломери** (кованица од старогрчките зборови: *télos* - крај и *méros* - корен) кои делуваат како заштитни капи. Тие го одржуваат интегритетот на хромозомите спречувајќи го прекумерното скусување на хромозомските краеве како неизбежен процес при секоја делба на клетката, а спречуваат и меѓусебна фузија (слепување) на хромозомските краеве.

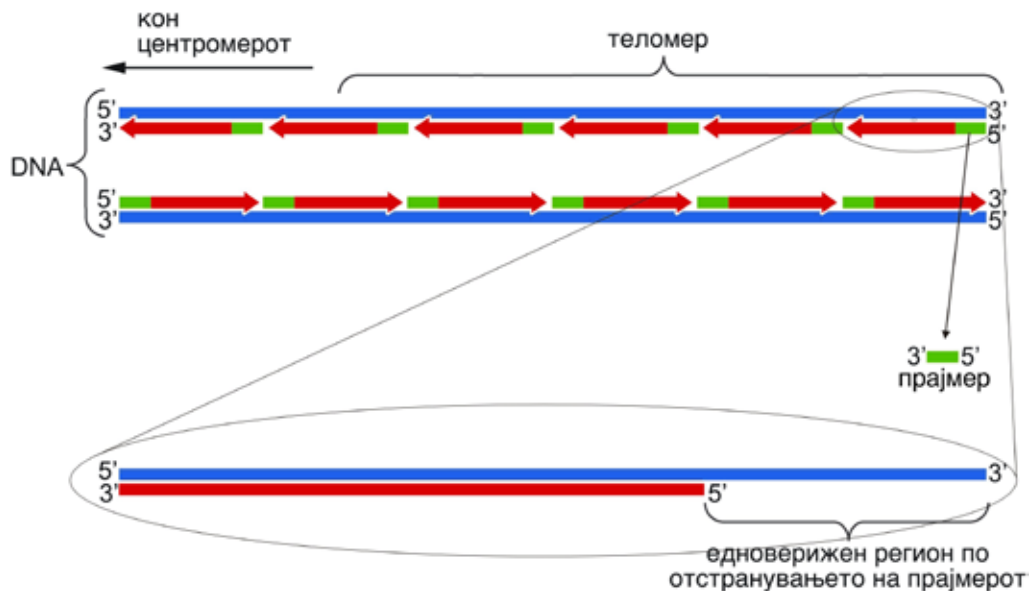
Имено, DNA-молекулите во самиот крај од теломерите содржат поголем број повторувања (репетиции) на една иста некодирачката секвенца, која кај речиси сите вертебрални и некои растителни организми е: 5'-TTAGGG-3'. Овие **теломерни секвенци** кај луѓето се повторуваат од стотици до илјадници пати една по друга. Едната верига од двоверижниот хеликс (таа чиј 3'-крај е ориентиран кон крајот од теломерот) е богата со гуанински нуклеотиди и ја надминува должината на другата, комплементарна верига (богата со цитозински нуклеотиди) создавајќи едновержна **3'-протрузија** која стрчи (слика 8-21).

Кај теломерите на цицачите, оваа 3'-протрузија има должина од 50 до 500 нуклеотиди и со неа се врзуваат посебни протеини кои допринесуваат кон заштитата на теломерите од деградација, а воедно спречуваат слепување на краевите на хромозомите. Кај цицачите, посебен мултипротеинскиот комплекс наречен „**протеин-засолниште**“ (англ. *shelterin*) се врзува со теломерите со што им дава форма, стру-



**Слика 8-21:** Карактеристични репетитивни DNA-секвенци во теломерните краевина на еукариотските хромозоми. **А:** Приказ на дел од повторувачката теломерна секвенца 5'-TTAGGG-3' и 3'-протрузијата која стрчи. **Б:** Создавање на т-јамката во теломерите на цицачите со што се спречува несаканата репарација на краевите од двоверижната DNA.

ктурно ги стабилизира и ги заштитува. Имено, овој протеински комплекс спречува двата слободни краја од DNA-молекулот да бидат ненамерно репарирани како да се двоверижен прекин. Овој механизам за поправка на двоверижните прекини инаку е објаснет подетално понатаму во главата 14: Генски мутации и нивната поправка. Во клетките на цицачите, едноверижната 3'-протрузија може да се свитка и да потисне дел од соседниот комплементарен регион од двоверижниот DNA-хеликс создавајќи карактеристична структура наречена **теломерна** или **т-јамка**, кој исто така го заштитува крајот на теломерите.



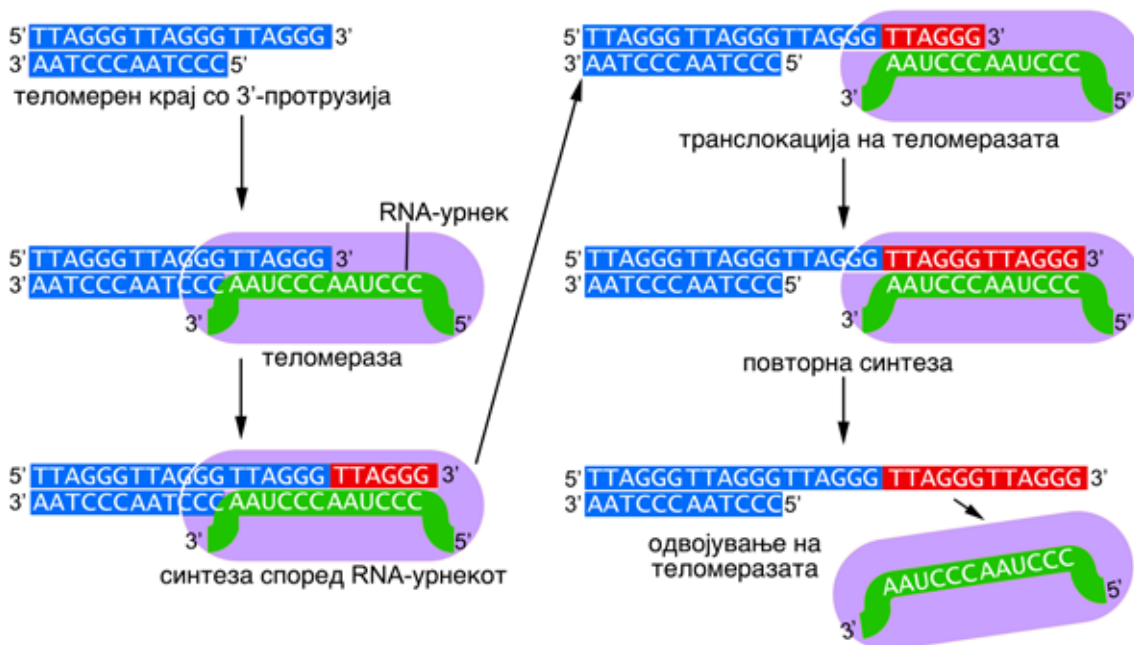
**Слика 8-22:** Репликациски проблем кај краевите од хромозомите. Со секоја последователна делба, едната сестринска хроматида се скусува прогресивно.

Интересно е што должината на теломерните секвенци варираат меѓу различните хромозом и меѓу различните клетка, што укажува дека секој теломер е динамична структура која активно расте и се скусува.

Феноменот означен како **репликациски проблем** се јавува при репликацијата на самите краеве од линеарните хромозоми кај еукариотските клетки. Веднаш по репликацијата, на 3'-крајот од двоверижната DNA на крајот од сестринските хроматиди останува кусиот рибонуклеотиден прајмер, кој не може да се надомести со деоксирибонуклеотиди и се разградува, оставајќи едноверижан регион (**слика 8-22**).

Причина за тоа е што кога синтезата на заостанувачката верига доаѓа до завршниот дел од теломерот, недостасува DNA-верига која треба да обезбеди урнек за синтеза на комплементарната верига. Како последица од тоа не се пополнува празнината меѓу последниот Оказаки-фрагмент и самиот крај на хроматидната нишка. Поради тоа, теломерите на секој хромозом прогресивно се скусуваат со секоја клеточна делба. Пресметано е дека со секој циклус на клеточна делба се губат приближно 50 до 100 базни парови од DNA-молекулите на самите краеве од хромозомските краци. Скусувањето на теломерите е безопасно сè додека не почнат да се губат важни генетски информации кои кодираат протеини или се регулаторни делови од гените.

Заради преживување на клетките кои интензивно се делат во текот на целиот живот на организмите (на пример, хематопоезиските клетки и тие на слузокожата на гастроинтестиналниот тракт кај вертебралните), еволуирал посебен клеточен механизам за заштита на должината на теломерите. **Теломеразата** е специфичен ензимски комплекс на рибонуклеопротеини кој, користејќи интринсичен (сопствен) RNA-молекул како урнек и **реверзно-транскриптазна активност**, ги продолжува и ги



**Слика 8-23:** Активност на теломеразата со која се решава репликацискиот проблем во некои клетки.

одржува теломерите на хромозомите додавајќи (слика 8-23). Кај њрбетниците, RNA-урнекот има секвенца: 5'-CCCUAA-3' и е комплементарна на теломерната репетитивна секвенца: 5'-TTTAGGG-3'.

Таквото продолжување на теломерните краеве овозможува „жртвување“ на додадената бесмислена секвенца, со што се спречува губењето на битните делови од хромозомскиот крај и се зголемува бројот на делби кои може да ги изврши клетката.

## 8.12 Генетски рекомбинации

DNA молекулите не се целосно статични структури, туку бавно, но, константно се менуваат, што е од клучно значење за генетскиот диверзитет на организмите и за еволуцијата, воопшто. Еден од механизмите за менување на DNA-секвенцата се однесува на рекомпонирањето на генетските информации по должината на еден ист DNA-молекул или меѓу две молекули, што вклучува повеќе различни процеси кои се означуваат како генетски рекомбинации. Рекомбинациите доведуваат до промена на геномите со што се обезбедува генетски диверзитет и евентуална еволуциската предност. Со тоа се овозможува елиминирање на неповолните мутации од геномот, како и одржување на оние мутации кои доведуваат до поуспешно приспособување кон селективниот притисок.

Генетските рекомбинации може да се класифицираат во три основни групи: хомологна генетска рекомбинација, рекомбинацијата специфична за позиција и DNA-транспозиција. Последниот тип е обработен во главата 16: Геномика. Покрај овие три основни типа, постојат и повеќе невообичаени генетски рекомбинации за кои сè уште не се утврдени прецизните молекуларни механизми, ниту пак функционалното значење за геномот.

### Хомологна (општа) генетска рекомбинација

Овој тип на рекомбинација ги вклучува размените на генетските информации меѓу две DNA-молекули или два сегмента од еден ист DNA-молекул, кај кои постои подолг регион на речиси идентична (хомологна) секвенца. По завршувањето на вавката рекомбинација, двете молекули содржат смеса од почетните секвенци. Сепак, при хомологна рекомбинација се задржува основниот редослед на гените во тој дел од хромозомите, со што се обезбедува одржување на функционалноста на генските продукти.

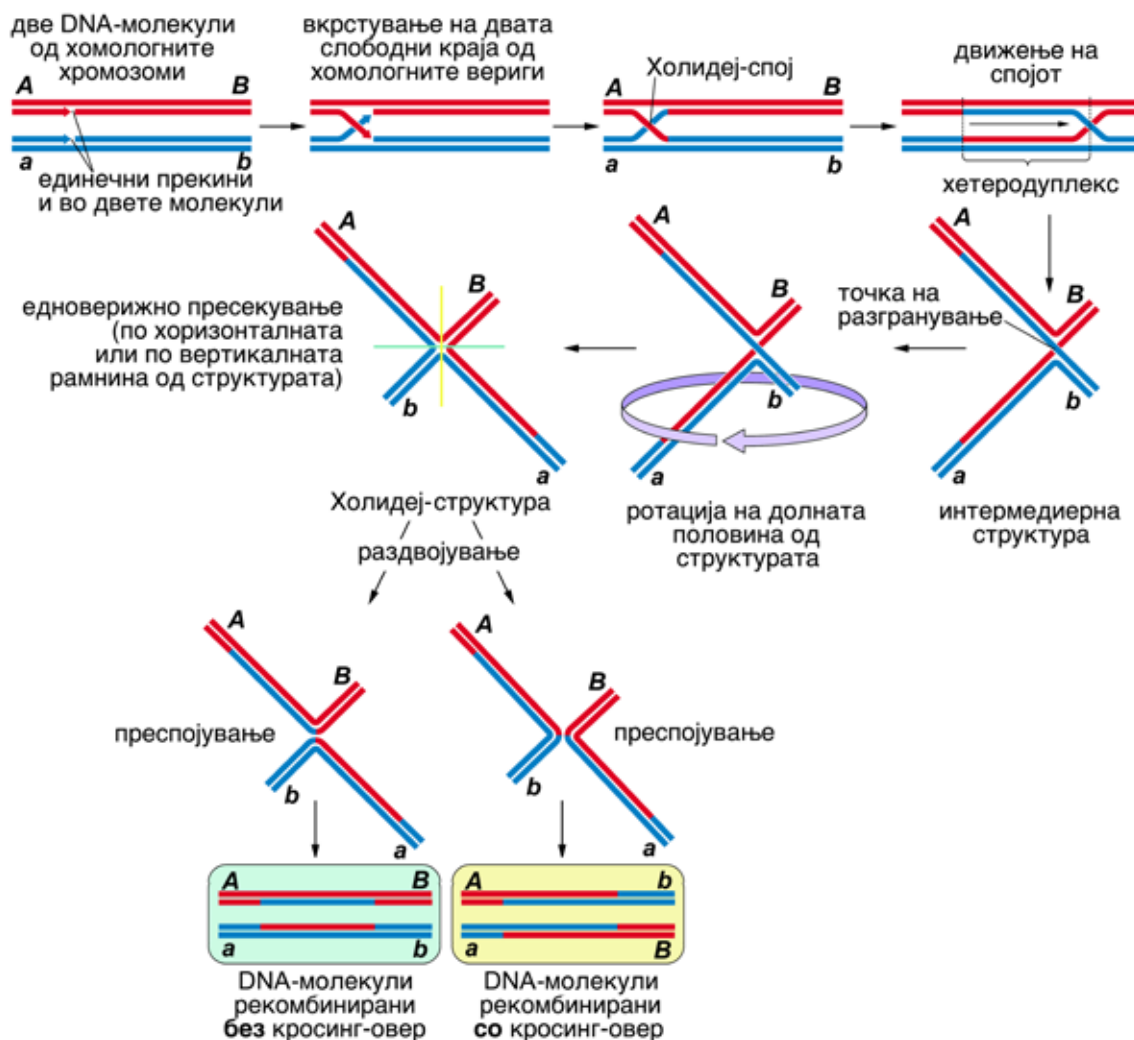
Иако прокариотите немаат диплоидни хромозоми, сепак и кај нив може да се одвива хомологна генетска рекомбинација, но, овој процес има улога исклучиво при поправката (репарацијата) на грешките и оштетувањата во DNA-молекулите.

Кај еукариотите, хомологната рекомбинација е најчеста при мејотската делба, а помалку е застапена кај репликацијата на DNA и кај клеточната делба. При мејозата, оваа рекомбинација се означува и како кросинг-овер, поради реципрочната измена на секвенците меѓу DNA-молекули од двете парентални (несестрински) хроматиди: едната по потекло од таткото, а другата од мајката. Кросинг-оверот е

претходно споменат во контекст на мејотската делба, а во натамошниот текст ќе бидат прикажани поважните молекуларни аспекти на рекомбинациските процеси.

Досега се предложени повеќе механизми за хомологна рекомбинација меѓу две DNA-молекули од еукариотските хромозоми, од кои историски прв и најмногу проучен е моделот предложен во 1964 година од Роберт Холидеј (Robert Holliday), по кого е и наречен.

Според **Холидеј-моделот**, најпрво настанува прецизно порамнување на двата хомологни хромозома (едниот по потекло од машкиот родител, а другиот од женскиот) (слика 8-24).



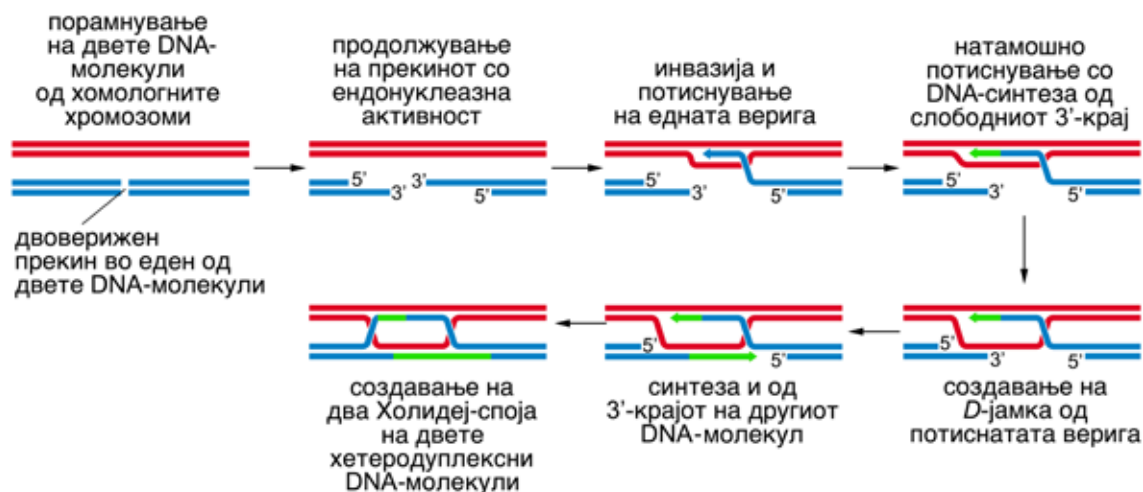
**Слика 8-24:** Модел на хомологна рекомбинација според Холидеј. Процесот започнува со едноверижни прекини во секоја од двете двоверижни DNA-молекули од хомологните хромозоми. Создавањето на вкрстениот Холидеј-спој, неговото движење по должината на двете DNA-молекули, како и нивното раздвојување, резултираат со создавање на два типа на рекомбинанти: со и без извршен кросинг-овер.



Потоа, ендонуклеазата предизвикува едноверижни прекини на исто место од DNA-молекулите во секој од двата хомологни хромозома. Тоа овозможува слободните краеве од едната верига да се поврзат со слободните краеве од другата парентална верига. Поврзувањето се врши ензимски со DNA-лигаза, запазувајќи ја насоката на врските ( $5' \rightarrow 3'$ ). Со тоа настануваат хибридни DNA-молекули кои се нарекуваат **хетеродуплекси**. Ваквото вкрстено разменување на веригите од двата парентални DNA хеликси, според авторот на моделот, се означува како **Холидеј-спој**. Интересно е што положбата на спојот се менува по должината на DNA-молекулите (т.н. миграција на спојот), со што се продолжува хетеродуплексната DNA при рекомбинацијата. Како што се гледна на приложената слика, доколку хетеродуплексните се прикажат положени на рамнина, ротацијата на долната половина од рамнината за  $180^\circ$  предизвикува создавање на карактеристична **Холидеј-структура**.

Во литературата може да се сретне и алтернативното име:  $\chi$  (се чита: хи)-структура, поради тоа што потсетува на оваа старогрчка буква. На доволно големо растојание од првиот прекин, настанува уште по еден едноверижан прекин на исто место и кај двата парентални DNA-хеликси. По поврзувањето со лигазата, рекомбинираните двоверижни DNA-молекули од Холидеј-спојот се раздвојуваат (т.н. резолуција), со што настануваат реципрочно рекомбинирани молекули (дуплекси). За самото раздвојување е неопходен ензимот **ресолваза**.

Главниот недостаток на оригиналниот модел според Холидеј е што статистичката веројатност за истовремено прекинување на двата хомологни DNA-хеликса токму на исто место е многу мала. Далеку поверојатно е прекините да настануваат на различни позиции. Модификацијата на овој модел на хомологна рекомбинација е предложена од страна на Мезелсон и Рединг (Meselson и Radding) во 1975, при што е претпоставено дека рекомбинацијата започнува со двоверижан прекин во една од DNA-молекулите, а не со два прекина, како што е според оригиналниот модел.



**Слика 8-25:** Модел на општа рекомбинација според кој процесот е инициран со двоверижни прекини во едната од двата хомологни DNA-хеликса. И кај оваа шема, со бројките 1 и 2, како и со нијанси на сина боја е означен DNA-хеликсот кој потекнува од едниот родител, а со 3 и 4 и со нијанси на црвена боја хеликсот кој потекнува од другиот родител.

Според моделот со двоверижен прекин, хомологната рекомбинација започнува со прекин на двете вериги кај едната од двете хомологни парентални DNA-молекули (**слика 8-25**). Прекилот настанува со ендонуклеазна активност, додека егзонуклеазите ги разградуваат 5'-краевите на местото на прекилот, создавајќи едноверижни 3'-краеви кои стрчат. Слободниот 3'-крај од едниот парентален DNA-молекул се вовлекува (сликовито: врши инвазија) во другата хомологната парентална DNA, постепено дислоцирајќи ја комплементарната верига. Притоа се создава структура означена како **D-јамка** (од англ. *displacement*: дислокација).

Другиот слободен 3'-крај од истата паренталниот DNA-молекул се елонгира преку синтеза посредувана со DNA-полимераза. Резолуцијата на Холидеј-структурите создава хетеродуплексни рекомбинирани DNA-молекули. За разлика од оригиналниот модел според кој се создаваат куси или испрекинати хетеродуплексни молекули, според поновиот модел, хетеродуплексната DNA ја опфаќа должината на целиот регион кој се рекомбинира. Постојат податоци дека молекуларните механизми со кои се одвива генетската рекомбинација варираат меѓу различните видови организми, па, дури и меѓу различните алели.

### Рекомбинација специфична за позиција

Овој тип на рекомбинација се случува само меѓу точно определени DNA-секвенци од две молекули кај кои, освен во тој кус регион, не постои меѓусебна хомологност.

Посебен тип на рекомбинација се случува кога кусите мобилни (подвижни) DNA-сегменти, наречени транспозони или „скокачки“ гени, се преместуваат од една во друга локација во геномот. Овие DNA-секвенци можат да се копираат себе си или да се издвојат од геномот и да се вметнуваат на друго место во геномот. Нобеловиот лауреат МекКлинток (Barbara McClintock) ги открила мобилните гени многу порано пред да биде проучена и нивната молекуларна природа.

Причините за генетските рекомбинации варираат колку што се различни и нивните механизми. Рекомбинациите имаат улога во специјализираните системи за DNA-репарација, посебните активности при DNA-репликацијата, регулирањето на експресијата на некои гени, при раздвојувањето на хромозомите при клеточната делба кај еукариотите, одржувањето на генетскиот диверзитет и во имплементирањето на програмирани генски реаранжмани при ембрионскиот развој.

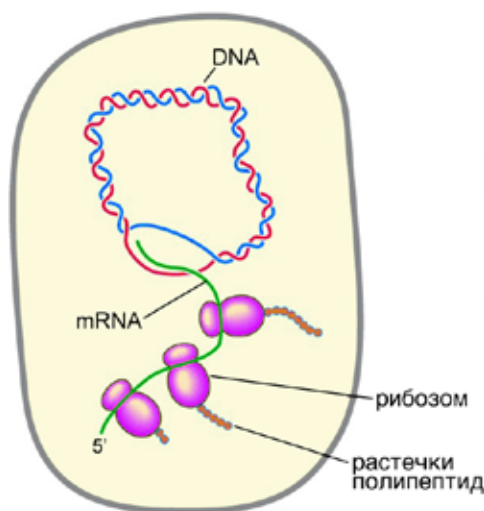


# ТРАНСКРИПЦИЈА - СИНТЕЗА НА RNA

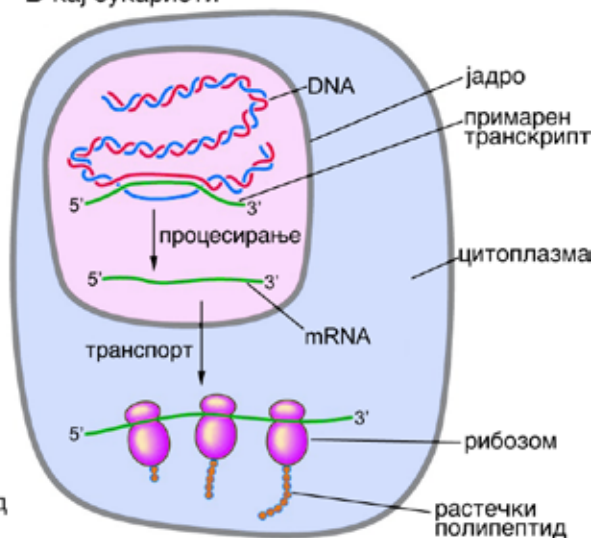
## Глава 9

**В**о геномската DNA кај секој организам се чуваат информациите кои ги кодираат сите генски продукти (протеини и функционални RNA-молекули) кои можат да се синтетизираат во организмот. Покрај кодирањето, DNA-секвенцата содржи и информации кои определуваат при кои услови и сигнали, во кои клетки и во кој квантитет треба да биде синтетизиран соодветниот продукт. Но, тие информации се статично вклопени во DNA-секвенцата на геномот. За нивна експресија, неопходни се интермедиерни молекули кои можат да ја препишат информацијата од секој поединечен ген, користејќи ја соодветната DNA-секвенца како урнек. Таквата

**А** кај прокариоти



**Б** кај еукариоти



**Слика 9-1:** Основни разлики на транскрипција и транслација меѓу прокариотите и еукариотите. Овие два процеса меѓусебно се одвоени и далеку покомплексни кај еукариотските клетки.

улога во клетките ја имаат RNA-молекулите, а нивната синтеза според DNA-урнекот се нарекува **транскрипција**. Покрај посредување на информациите од гените до протеинските продукти, некои RNA-молекули се и крајни, функционални продукти.

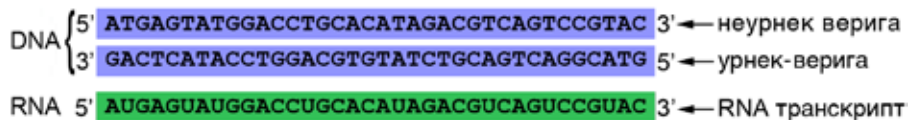
Преносот на информациите зачувани во геномската DNA преку интермедиерните RNA-молекули, па, сè до рибозомите, каде што според тие информации се врши синтеза на полипептидите (протеините) од аминокиселини, се разликува меѓу прокариотските и еукариотските клетки (**слика 9-1**).

Кај прокариотите, информациите препишани во RNA-молекулите веднаш се преведуваат во полипептидни вериги со процесот на транслацијата. Кај еукариотите, транскриптите најпрво се процесираат во **зрели mRNA**-молекули, а дури потоа се транспортираат низ јадрените пори, по што транслацијата се врши во рибозомите кои се наоѓаат во цитоплазмата.

Треба да се запомни дека поимот генски продукт најчесто се користи за протеините кодирани од соодветен ген, но, под генски продукти се подразбираат и функционалните RNA-молекули, какви што се: рибозомските, транспортните, snRNA и други.

## 9.1 Транскрипцијата е ензимска синтеза на RNA според DNA-урнек

Ензимската синтеза на RNA според урнекот на DNA се базира врз принципот на комплементарност на базите. Во текот на овој процес, двете вериги од двоверижната DNA се раздвојуваат и **една** од нив има улога на **урнек** (образец, англ. *template*) за синтеза на RNA-„пораката“. Тоа значи дека транскрипцијата е асиметрична во однос веригите од двојниот DNA-хеликс. Секвенцата (редоследот) на рибонуклеотидите во RNA-молекулот е комплементарна со едната верига од двојниот DNA-хеликс од која е извршена самата транскрипција. Поради тоа, DNA веригата која се транскрибира во RNA-молекул се означува како **урнек-верига (образец)**, а во литературата се обележува и како + (**плус**) **верига** (англ. *sense strand*). Секвенцата на RNA-транскриптит е комплементарна со секвенцата на урнек-веригата од DNA-молекулот. Спротивната DNA-верига обично се означува како „**неурнек**“ (**анти-урнек**) или - (**минус**) **верига** (англ. *antisense strand*) за дадениот ген (**слика 9-2**).



**Слика 9-2:** Споредување на комплементарноста на базите кај урнек-веригата и, комплементарната на неа, неурнек-верига од двоверижната DNA, како и на транскрибираната RNA-секвенца (mRNA).

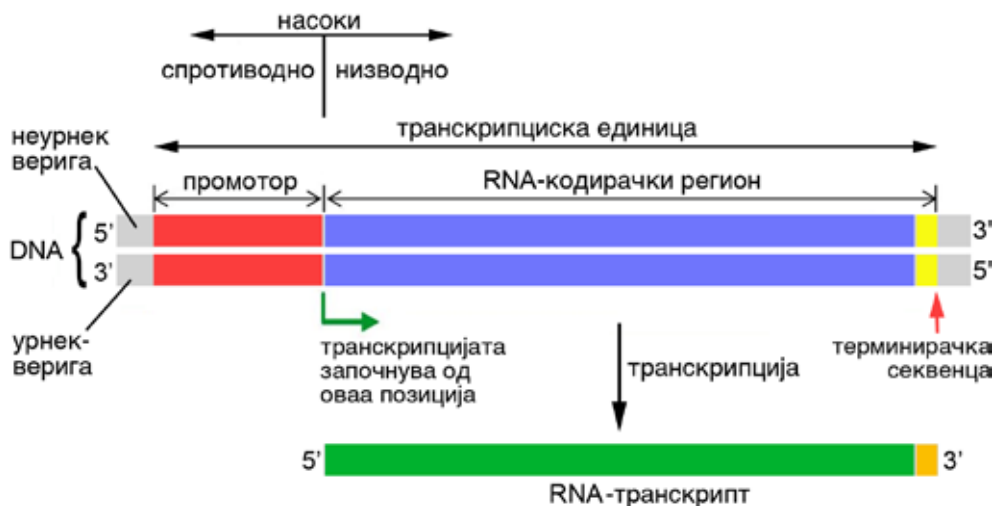
Во литературата, неурнек-веригата од DNA-молекулот се нарекува и **кодирачка верига**. Иако ваквата терминологија може да делува конфузно, причината за тоа е што секвенцата на RNA-транскриптит е идентична со онаа на кодирачката DNA-ве-

рига, освен што на местото на тиминот, се наоѓа урацил. Од тие причини, на шемите и сликите обично се прикажуваат секвенците токму од оваа верига. Исклучок се некои вируси чиј геном е составен од RNA, наместо DNA-молекули. Кај нив синтезата на RNA се врши според **RNA-урнек**. Изразот „кодирачка верига“ не треба да се меша со кодирачка секвенца, т.е. со DNA-секвенцата која кодира протеински или функционален RNA-продукт.

Важно е да се има предвид дека, освен DNA-регионот кој директно ги кодира аминокиселините од протеинскиот продукт, генот ги вклучува и секвенците за иницирање, регулирање и терминирање на транскрипцијата. Иако определени региони од генот не се транскрибираат, тие сепак учествуваат во започнувањето и регулацијата на транскрипцијата.

Од критична важност за иницирањето на транскрипцијата имаат DNA-секвенците наречени **промотори**, без кои овој процес не може да се одвива ниту кај прокариотите, ниту кај еукариотите. Оттаму, генот може да се дефинира како целокупна DNA-секвенца која кодира конечен протеински или функционален RNA-продукт. Тоа значи дека гените ги вклучуваат сите DNA-секвенци кои се неопходни за синтеза на протеините, но, и за функционалните RNA-молекули, какви што се рибозомските и трансфер RNA-молекулите, на пример. Повеќе детали за молекуларната анатомија на генот се дадени во главата 16: Геномика.

Регионот од DNA-молекулот кој го опфаќа промоторот, како и самата кодирачка секвенца која директно се транскрибира во RNA-молекул се означува како **транскрипциска единица** (слика 9-3).



**Слика 9-3:** Структура на транскрипциската единица која го опфаќа промоторот и RNA-кодирачкиот регион од DNA-секвенцата на генот. RNA-транскриптот е продукт на синтезата според урнек DNA-веригата. Означени се поважните компоненти, како и насоката во однос на првиот нуклеотид од кој започнува транскрипцијата.

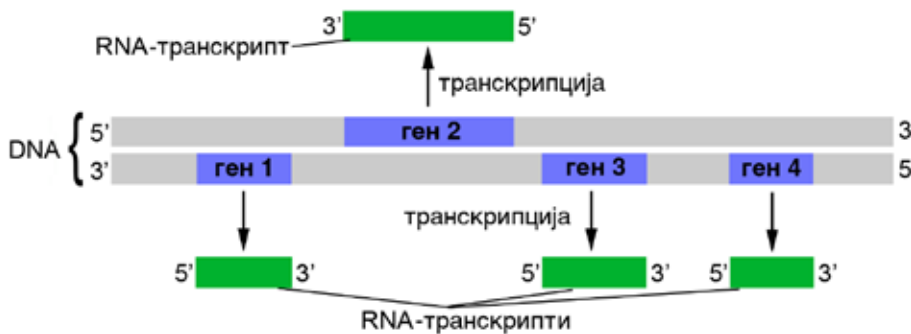


## 9.2 Примарни транскрипти и mRNA

Кај прокариотските клетки, RNA-транскриптот е еквивалентен на mRNA и веднаш е подготвен за синтеза на протеини во рибозомите според информациите кои ги пренесува. Всушност, кај бактериите, транслацијата почнува додека уште трае транскрипцијата на истиот mRNA-молекул. Како што е понатаму објаснето, RNA-транскриптот кај еукариотите мора да се процесира пред да биде експортиран од јадрото до рибозомите кои ја вршат транслацијата. Имено, првично синтетизираните еукариотски RNA-молекули се означуваат како **примарни транскрипти**, а често и како **незрели, прекурзорни** или **пред-mRNA**-молекули.

Важно е што mRNA-молекулот е подолг отколку што е неговата кодирачка секвенца, односно и 5'- и 3'-крајот содржат и секвенци кои не кодираат аминокиселини при транслацијата, што е објаснето во следната глава: **Транслација**.

Транскрипцијата на еден ист ген секогаш се врши од истата верига од двојниот хеликс, но, на ниво на целата хроматида, и двете вериги се користат за транскрипција. Некој ген се транскрибира од едната, а некој од другата DNA-верига од двоверижниот DNA-хеликс (**слика 9-4**). Тоа значи дека едната верига од двоверижната DNA може да биде урнек-верига за еден, а кодирачка („неурнек“) верига за друг ген.



**Слика 9-4:** И двете вериги од двојниот DNA-хеликс можат да бидат урнек за транскрипција кај различни за различни гени сместени во DNA-молекулот. „Читањето“ на DNA-урнекот е во 3'→5' насока, а на транскрипцијата секогаш е во 5'→3' насока.

## 9.3 Споредба на транскрипцијата со DNA-репликацијата

Транскрипцијата има определени сличности со DNA-репликацијата, пред сè, поради фактот што и во двата процеса новата верига се синтетизира според урнек на постојната, следејќи ги Вотсон-Криковите правила за комплементарност на базите, што обезбедува точно умножување или препишување на информациите. И транскрипцијата и репликацијата, се одвиваат во три фази: иницијација, елонгација и терминација, при што се запазува поларноста (5'→3' насока).

Од друга страна, транскрипцијата на RNA се **разликува** од DNA-репликација-

та во неколку клучни аспекти:

- при RNA-синтезата се користат **рибонуклеотиди**, наместо деоксирибонуклеотиди;
- наместо тимин, кај RNA-молекулот се наоѓа базата **урацил**;
- **не се потребни прајмери** за синтеза на RNA-веригата од DNA-урнекот при фазата на елонгација (екстензија, продолжување);
- **се транскрибира само мал дел од геномот**, кај цицачите помалку од 5% од геномската DNA, за разлика од репликацијата, при која се удвојува целокупната клеточна DNA;
- **кај прокариотите не се врши „лекторска“ проверка** на точноста на синтезата, како при DNA-репликацијата. Со тоа се генерираат повеќе грешки отколку при DNA-репликацијата, меѓутоа тие грешки не се пренесуваат на следните генерации. Повеќето гени се транскрибираат повеќе пати едно по друго, па, неколку погрешни RNA-транскрипти не предизвикуваат посериозни штетни последици.

Транскрипцијата е најдобро проучена кај прокариотите, но, самиот процес на RNA-синтеза е сличен и кај еукариотите, иако кај нив е посложен и се врши со нешто поинакви ензими и регулаторни молекули.

## 9.4 Прокариотска RNA-полимераза

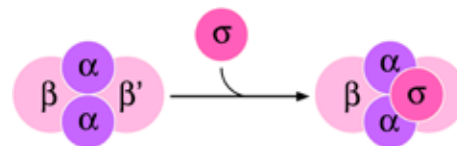
Транскрипцијата се врши со посебни ензими кои се означуваат како **RNA-полимерази** или **DNA-зависни RNA-полимерази**, кои вршат полимеризација на рибонуклеотиди (RNA-синтеза) по урнек на нуклеотидна секвенца од DNA верига.

Кај бактериските клетки, основниот ензим RNA-полимераза (понекаде означен и со кратенката **RNAP**) е составен од пет субединици: по две идентични  $\alpha$ , и по една  $\beta$ ,  $\beta'$  и  $\omega$  субединица. RNA-полимеразата е металоензим кој содржи две молекули на цинк. Во холоензимот RNA-полимераза вклучена е и посебна субединица наречена **сигма ( $\sigma$ ) фактор** (слика 9-5). Се претпоставува дека каталитичната активност се должи на  $\beta$ -субединицата.

Холоензимот RNA-полимераза го опфаќа а бактерискиот DNA-хеликс и се движи по неговата должина, скенирајќи ја нуклеотидната секвенца сè додека не го препознае промоторот.

Сигма-факторот посредува во препознавањето и врзувањето на ензимот со соодветниот промотор во урнек DNA-веригата. Како и повеќето бактерии, *E. coli* има неколку типа на сигма-фактори. Се претпоставува дека најважна улога има сигма-факторот со молекулска маса 70000 (70 килодалтони, kDa), по што е и наречена  $\sigma^{70}$  субединица.

При синтезата, RNA-полимеразниот комплекс ги вградува рибонуклеотид трифосфатите во RNA-транскриптот по принципот на Вотсон-Криковата комплементарност на базите (A со U, G со C и обратно) меѓу нуклеотидите од DNA-урнекот и рибонуклеотидите кои се вградуваат. Притоа се создаваат двоверижни хибриди



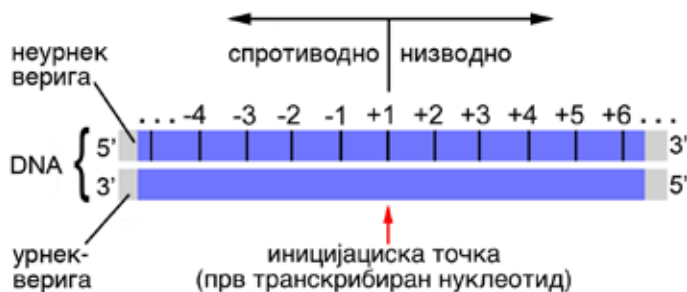
**Слика 9-5:** Шематска структура на бактериската RNA-полимераза.

меѓу DNA и RNA. Енергијата за создавање на фосфодиестерски врски меѓу новододаните рибонуклеотиди се обезбедува од високоенергетските трифосфатни форми на рибонуклеотиди. Со секој нов додаден соодветен рибонуклеотид, се ослободува по еден молекул на неоргански пирофосфат.

## 9.5 Промотори

Во лабораториски (*in vitro*) услови во бесклеточен раствор, изолираната RNA-полимераза без сигма-факторот може да врши транскрипција на која било DNA-верига и тоа со случајно иницирање од кој било нуклеотид. За разлика од тоа, RNA-полимеразите во интактните клетки можат да транскрибираат само откако се врзани со посебни DNA-секвенци, означени како промотори. Промоторот е секвенца од DNA урнек-веригата со која се врзува RNA-полимеразата и преостанатите протеини кои се неопходни за ензимска синтеза на RNA-транскриптот. Дури по тоа може да се иницира транскрипцијата и тоа почнувајќи од определена нуклеотидна позиција (иницијациска точка). Ензимската синтеза на транскриптот продолжува со додавање на нови нуклеотиди (елонгација), сè додека не достигне до секвенцата за запирање (терминирачка секвенца). Промоторите се важни за регулацијата на транскрипцијата и определуваат која од двете DNA-вериги ќе се транскрибираат и во која насока. Секвенците на самите промотори не се транскрибираат.

Поради тоа што нуклеотидните секвенци на неурнек (кодирачката) верига и mRNA-транскриптот се идентични (освен замената на U за T кај RNA), вообичаено



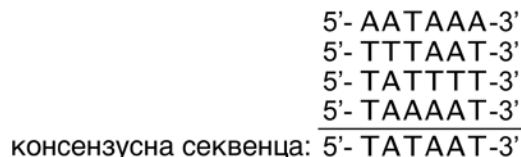
**Слика 9-6:** Означување на броевите на нуклеотидните позиции според иницијациското место при што не се користи нулата. Броевите се означени само на неурнек, кодирачката) верига која е комплементарна и антипаралелна на урнек-веригата од која, всушност, се врши транскрипцијата. Знаците (+) и (-) пред броевите означуваат дали соодветниот нуклеотид се наоѓа пред или по иницијациската точка (+1) од која започнува транскрипцијата на mRNA.

е да се прикажат токму секвенците на неурнек веригата. Првиот транскрибиран нуклеотид се означува како **иницијациски** или +1 и последователно, сите следни нуклеотиди (во 3'-насока или низводно) од дадената транскрипциска единица се нумерираат со позитивни броеви. Обратно, нуклеотидите пред (во 5'-насока, спротиводно) од првиот транскрибиран нуклеотид се означуваат со негативни броеви (**слика 9-6**).

Секвенционирањето на промоторите од голем број испитувани организми покажало дека постојат изразени сличности во дел од секвенците.

Доколку секвенците на промоторите од повеќе гени се споредат со порамнување на нуклеотидите како при споредување на буквите од реченици, можат да се забележат низи на нуклеотиди кои се исти (константни) кај различни гени или организми, па, се нарекуваат **конзервирани секвенци**. Овој израз, кој мошне често се користи во

еволуциската биологија, правилно укажува токму на еволуциската причина за конзервираноста на промоторните секвенци кај различни организми. Покрај тоа, постојат и секвенци кои не се идентични, туку при порамнувањето, дел од нуклеотидите се наоѓаат статистички значително почесто на определена позиција, па, таквите низи на нуклеотиди се нарекуваат **консензусни секвенци**. На пример, консензусната секвенца е најдена според најчестиот нуклеотид од секоја позиција во четирите прикажани секвенци:



Во поголемиот број гени кај *E. coli*, промоторите содржат специфични консензусни секвенци (слика 9-7).

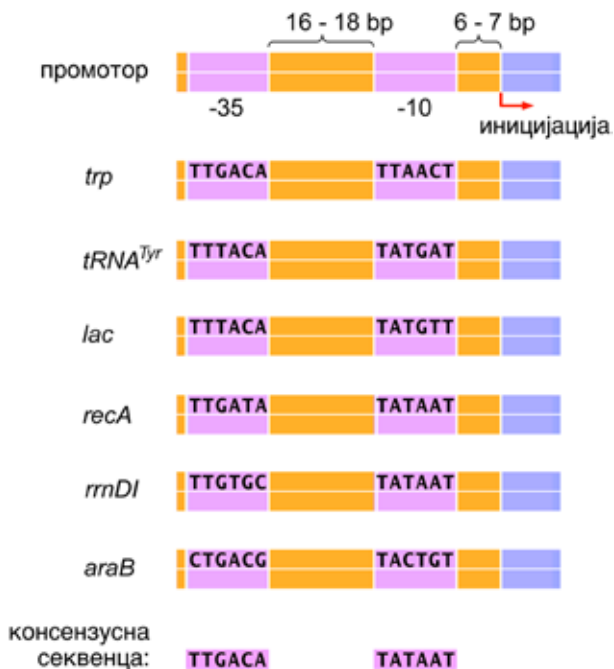
Кај *E. coli*, едната секвенца (TATAAT) се наоѓа 6 до 7 нуклеотиди спротиводно (во 5'-насока) од првиот транскрибиран нуклеотид и се означува како „**ТАТА-елемент**“ (на англ. *TATA box*), или поретко како „**-10 регион**“ или **Прибнова секвенца**, во чест на истражувачот Прибно (David Pribnow) кој прв ја открил.

Заради поедноставување, на сликите се прикажани само секвенците на неурнек (кодирачките) вериги. Се подразбира дека секвенцата на урнек-веригата е комплементарна и антипаралелна, па, двоверижната DNA ќе ја има следнава нуклеотидна секвенца:

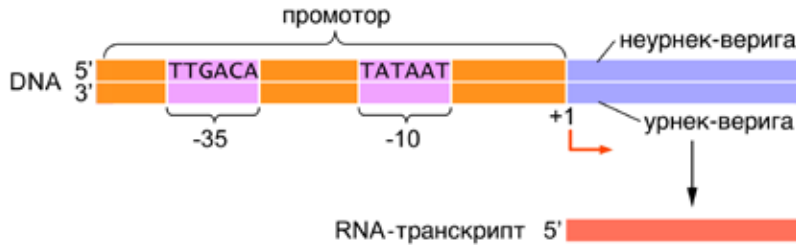


Втората секвенца е лоцирана на 35 нуклеотиди спротиводно (кон 5'-насока) од првиот транскрибиран нуклеотид, па, оттаму често се означува како **-35 регион** (слика 9-8). Се смета дека RNA-полимеразата ја препознава оваа секвенца и потоа се врзува со неа.

Кај некои, т.н. високо ефикасни бактериски промотори, какви што се тие кај гените за рибозомските RNA-молекули, се наоѓа и трет регион означен како **спротиводен елемент** (UP од англ. *upstream* - спротиводно) лоциран околу позицијата -50.



**Слика 9-7:** Порамнување на нуклеотидните секвенци на промоторните региони од неколку гени кај *E. coli*.



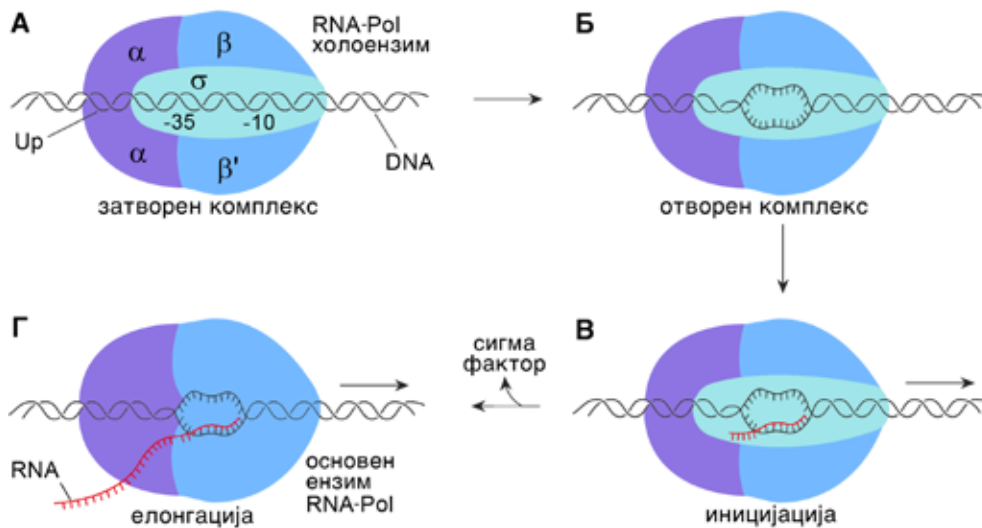
**Слика 9-8:** Распоред на промоторните консензусни региони спротиводно (во 5'-насока) од кодирачката DNA-секвенца кај *E. coli*.

Другите секвенци во RNA-транскриптот се објаснети понатаму во текстот, во контекст на процесите при кои учествуваат.

Промоторите делуваат регулаторно врз експресијата на соодветниот ген. Таканаречените силни промотори предизвикуваат чести иницирања на транскрипцијата (на секои 2 секунди кај некои бактерии). Транскрипцијата кај послабите промотори се иницира на секои десетина минути. Врзувањето на RNA-полимеразата со промоторот е првиот клучен чекор во транскрипцијата кај прокариотите.

## 9.6 Иницирање на транскрипцијата кај *E. coli*

Оваа фаза започнува кога сигма ( $\sigma$ ) факторот ги препознава и се врзува со -35 и со -10 регионите од промоторот, го привлекува и правилно го поставува холоензимот RNA-полимераза на стартната позиција (слика 9-9, А).



**Слика 9-9:** Иницирање на транскрипцијата кај прокариотите. **А:** Врзување на RNA-полимераза холоензимот со двоверижната DNA. Попрецизно, сигма факторот ги препознава и се врзува со -35 и -10 регионите од промоторот. Таквата структура при која холоензимот е врзан со, сè уште, двоверижниот DNA-хеликс, се нарекува затворен комплекс. **Б:** Раздвојување на комплементарните вериги од DNA-хеликсот (отворен комплекс). **В:** Иницирање на транскрипцијата со синтеза на кус RNA-транскрипт, по што следува одвојување на сигма факторот и создавање стабилен троен комплекс (ензим, DNA и RNA). **Г:** Елонгација на транскрипцијата при што продолжува синтезата на RNA-транскриптот според принципот на комплементарност на базите од DNA-урнекот и рибонуклеотидите кои се вградуваат.

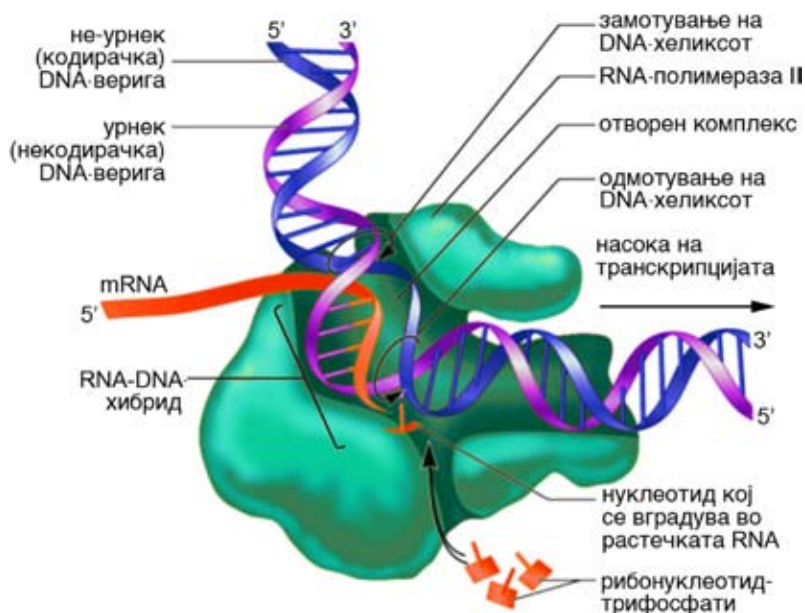
Сигма факторот има улога и во раздвојувањето на двете комплементарни вериги од двоверижната DNA, со што RNA-полимеразата може да воспостави тесен контакт со урнек-веригата. Следниот чекор при иницирањето на транскрипцијата е локалното раздвојување на двете DNA-вериги во должина од околу 14 базни парови со што почнува да се создава структура која, поради изгледот, се нарекува **транскрипциско меурче (слика 9-9, Б)**.

Веднаш по ова, сигма субединицата се одвојува и започнува транскрипцијата (слика 9-9, В). Првите десетина рибонуклеотиди се вградуваат во RNA-транскриптит доста неефективно, но, потоа брзината на ензимската синтеза драматично се зголемува. Притоа ензимот е стабилно врзан со урнек DNA-веригата и со RNA-транскриптитот кој расте поради што се нарекува и троен комплекс. Со тоа започнува следната фаза на транскрипцијата: елонгација (слика 9-9, Г).

## 9.7 Елонгација на транскрипцијата кај *E. coli*

Транскрипциското меурче се движи по должината на DNA-молекулот со константна брзина при која се додаваат просечно околу 50 рибонуклеотиди во секунда, оставајќи го RNA-транскрипт кој расте да виси од него. Во текот на елонгација, хибридниот DNA-RNA хеликс ротира при додавањето на секој рибонуклеотид, со што 5'-крајот од RNA-молекулот во текот на синтезата останува во каталитичното место на холоензимот. За спречување на прекумерното извртување на DNA-хеликсот, при транскрипцијата учествува и DNA-топоизомеразата, со слична улога како и при DNA-репликацијата.

Шематската структура на транскрипциското меурче и активната на RNA-полимеразата кај *E. coli* се прикажани на **сликата 9-10**.



**Слика 9-10:** Транскрипциско меурче и елонгација на транскрипцијата со RNA-полимераза.



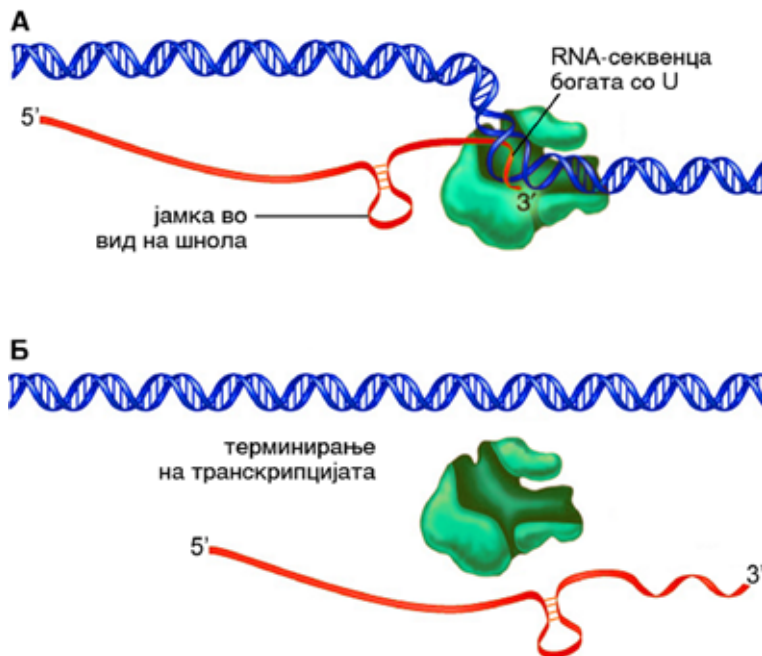
## 9.8 Терминацијата на транскрипцијата кај *E. coli*

Елонгацијата на транскриптот тече сè додека RNA-полимеразата не ја транскрибира и **терминирачката (стоп) секвенца** од DNA-урнекот. Транскриптите од тие терминирачки секвенци содржат специфични инвертирани палиндроми кои, поради самокомплементарноста, создаваат јамки во вид на шноли (**слика 9-11**).



**Слика 9-11:** Создавање структура на јамка во вид на шнола во терминациското место за RNA-полимеразата кај бактериите поради постоење на инвертирана палиндромска секвенца.

Самиот процес на запирањето (терминацијата) на транскрипцијата може да се одвива на два начина: со или без учество и на посебен **Ро-протеин** (старогрчки:  $\rho$ ; англ. **Rho-protein**).



**Слика 9-12:** Терминирање на транскрипцијата кај прокариотите со Ро-независна (интринсична) терминација. **А:** Формирање јамка во вид на шнола со што се забавува синтезата. **Б:** Паузирањето овозможува одвојување на регионот од РНА-транскриптот богат со U-остатоци од поли-А-секвенцата од урнек DNA-веригата и доведува до терминација.

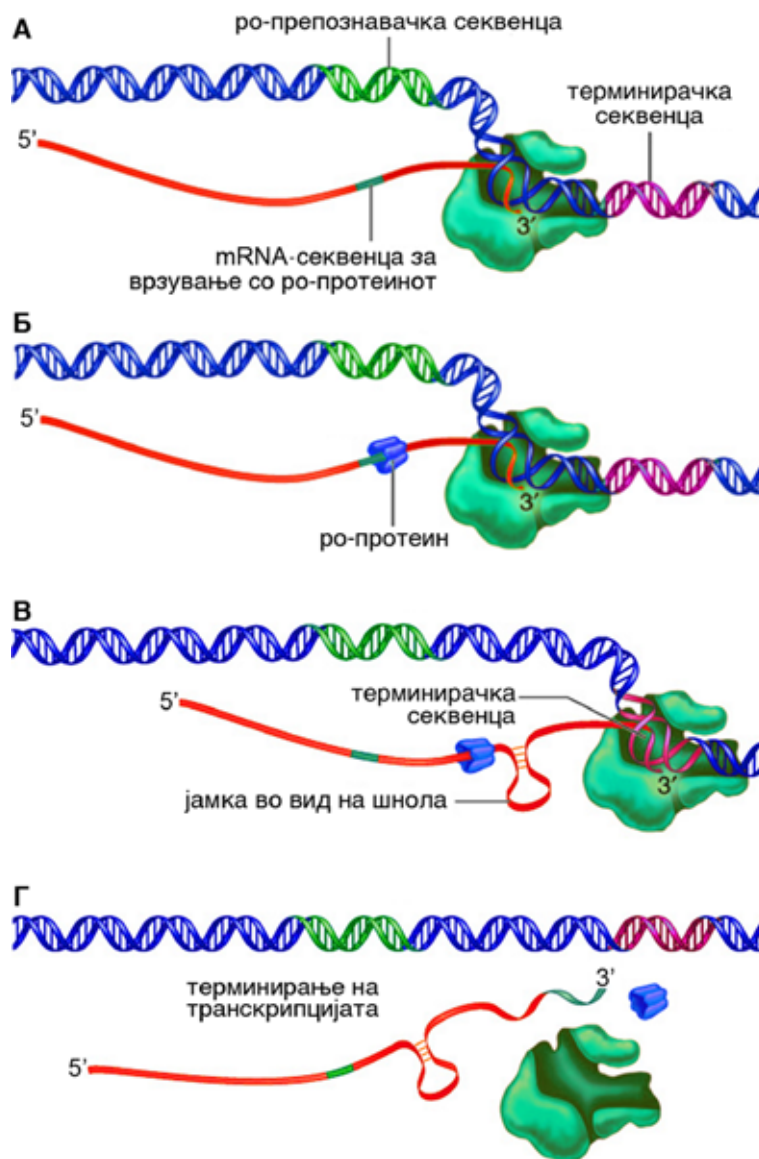
## Интринсична или Ро-независна терминација

Кај овој механизам постојат посебни интронски терминациски (стоп) секвенци кои се палиндромски и предизвикуваат спонтано да се создаде јамка во вид на шнола на 3'-крајот од RNA-молекулот (слика 9-12).

Овој тип терминација е независен од Ро-протеинот и е најчеста форма на терминација на транскрипцијата кај *E. coli*. Терминациското место во урнек DNA-веригата е секвенца богата со аденински остатоци. При спонтаното создавање на јамка во вид на шнола, RNA-полимеразата брзо забавува со синтезата. Поради тоа што меѓу урацилните остатоци од RNA-транскриптот и комплементарните аденински остатоци од DNA-урнекот постојат само по две водородни врски, фаворизирано е одвојувањето на mRNA од урнек DNA-веригата и од ензимот со што запира транскрипцијата.

## Ро-зависна терминација

Кај овој механизам Ро-протеинот се врзува со RNA-транскриптот. Овој протеин има форма на обрч и е хексамер составен од шест идентични субединици кои можат директно да се врзат со RNA-молекулот. Ро-про-

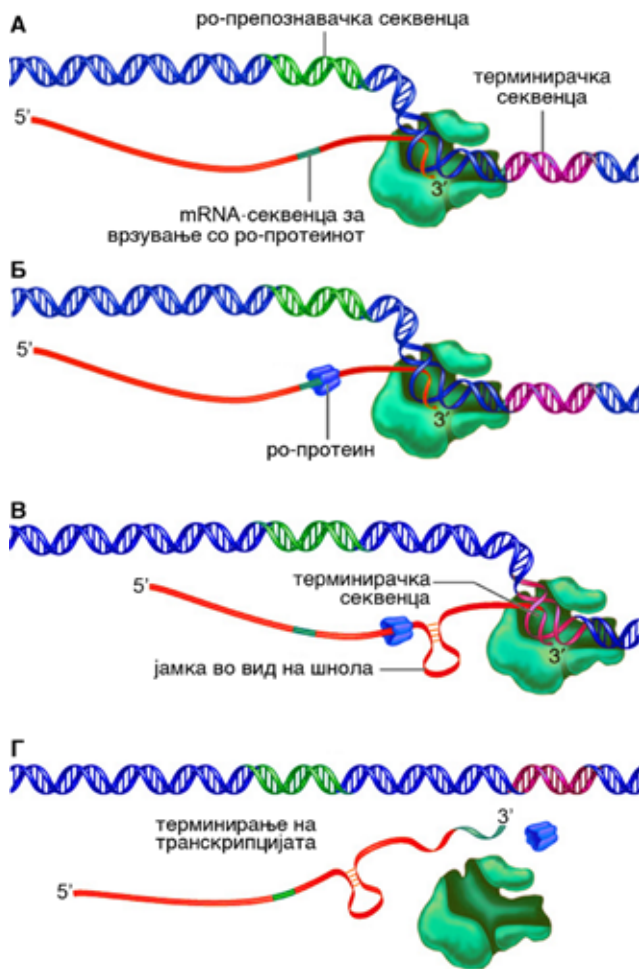


**Слика 9-13:** Терминирање на транскрипцијата кај прокариотите. **А:** RNA-полимеразата се доближува до терминирачката секвенца. **Б:** Ро-протеинот се врзува со посебна секвенца која ја препознава во mRNA-молекулот чија синтеза е при крајот. **В:** RNA-транскриптот со врзаниот Ро-протеин создава јамка во вид на шнола. **Г:** Кога ќе се допре до RNA-полимеразата, Ро-протеинот го одвојува mRNA молекулот од DNA-урнекот и од ензимот со што и запира транскрипцијата.

теинот поседува АТФ-азна активност со која врши хидролиза на АТФ и со тоа обезбедува енергија за одвојување на RNA-транскриптот од RNA-полимеразата (слика 9-13). Тоа се случува кога RNA-полимеразата паузира кај посебни секвенци наречени *rut*-места (од англ. *rho utilisation*, ро-искористливи места). Откога RNA-транскриптот ќе биде врзан со Ро-протеинот се предизвикува создавања јамка во вид на шнола што ја забавува RNA-синтеза и набргу предизвикува прекин на натамошната транскрипција.

Постојат експериментални податоци кои укажуваат на тоа дека процесот на запирање на транскрипцијата веројатно е посложен отколку што досега се знаеше. Се смета дека развоените вериги од DNA-молекулот кои се ослободиле од транскрипциското меурче наново формираат двоверижен хеликс.

## 9.9 Прецизност на транскрипцијата



**Слика 9-14:** Општ приказ на процесот на транскрипција кој се одвива во три главни фази. Прикажани се поважните компоненти.

При RNA-транскрипцијата кај бактериите најверојатно отсутствува софистицирана лекторска проверка на евентуалните грешки при додавањето на рибонуклеотидите. Причината за тоа е отсутството на доволно еволуциски притисок. Имено, за разлика од репликацијата, каде што дури и само еден погрешен (мутиран) нуклеотид се пренесува врз следните генерации клетки (и организми, доколку се случи во геномот на половите клетки), грешките при транскрипцијата немаат такви последици. RNA-транскриптите имаат кус век на траење во клетките, па, ретките случајно мутирани mRNA-молекули бргу се заменуваат со новосинтетизирани. Покрај тоа, при транскрипцијата на повеќето гени се синтетизираат голем број копии на mRNA, па, еден од нив со мутација доведува до синтеза само на занемарливо количество мутирани протеински молекули. Се чини дека, од еволуциски аспект, брзината на RNA-транскрипцијата е поважна отколку перфектната синтеза. Општиот преглед на транскрипцијата кај прокариотите шематски е прикажан на **слика 9-14**.

## 9.10 Транскрипција кај еукариотите

Кај еукариотските клетки, транскрипцијата се одвива, како и кај прокариотите, во три главни фази: иницијација, елонгација и терминација, но, со неколку важни **разлики** кои се последица на следниве причини:

1. Значително поголемите еукариотски геноми содржат многу поголем број гени кои треба да бидат транскрибирани, но, исто така содржат и многу повеќе е некодирачка DNA (која воопшто не кодира протеински ниту функционални RNA-продукти), со што гените се оддалечени еден од друг многу повеќе отколку кај прокариотите.
2. Во еукариотските клетки постојат три различни RNA-полимерази, специјализирани за транскрипција на одвоени класи гени.
3. Кај еукариотите и кај царството *Archaea*, освен секвенцата на промоторот, за врзување на RNA-полимеразата со промоторот и за регулирање на транскрипцијата, неопходни се и протеини означени како транскрипциски фактори.
4. За разлика од прокариотите, јадрената мембрана во еукариотските клетки претставува бариера која физички ги одвојува транскрипцијата од транслацијата.
5. RNA-транскриптите мораат значително да се обработат пред да созреат во mRNA молекули и дури тогаш се транспортираат од јадрото во цитоплазмата, каде што во рибозомите се врши процесот на транслација.
6. Геномската DNA кај еукариотите е организирана во хроматински структури, кои го блокираат пристапот до ензимите и транскрипциските фактори, додека кај прокариотите е речиси „гола“ и со тоа е лесно достапна за RNA-полимеразите. Во еукариотските клетки, хроматинот еволуирал во софистициран контролен механизам за регулирање на генската експресија.
7. Транскрипцијата кај еукариотските клетки подлежи на лекторска корекција, барем кај протеин-кодирачките гени. Иако не е толку ефективна како кај репликацијата, оваа корекција го значително го намалува погрешното додавање на рибонуклеотиди во RNA-транскриптите, во споредба со прокариотската транскрипција.

Во натамошниот текст ќе бидат појаснети само поважните механизми и компоненти кои се специфични за еукариотската транскрипција.

### Еукариотски RNA-полимерази

Прокариотските клетки содржат само еден тип RNA-полимераза, додека кај еукариотските се наоѓаат три типа на RNA-полимерази кои се, структурно и функционално, многу покомплексни отколку соодветните ензими кај прокариотите. Секоја од еукариотските RNA-полимерази е задолжена за транскрипција на различни типови гени. **RNA-полимеразата I** е локализирана во нуклеолусот и врши транскрипција на гените за rRNA молекулот (освен за 5S rRNA), додека **RNA-полимеразата II** ги транскрибира сите протеин-кодирачки гени, па, поради тоа нејзините транскрипти се исклучиво незрели mRNA-молекули. Интересно е што аминокиселинската секвенца на некои од субединиците на RNA-полимеразата II се еволуциски конзерви-

рани од квасните габи, па, сè до човекот. Оваа RNA-полимераза поседува лекторска 3'→5' егзонуклеазна (*proofreading*) активност. **RNA-полимеразата III** е задолжена за транскрипција на малите функционални RNA-молекули (какви што се оние за tRNA; некои snRNA и 5S rRNA). Споредбата на трите типа еукариотски RNA-полимерази е прикажана на **табелата 9-1**.

**Табела 9-1: Споредба на основните еукариотски RNA-полимерази**

RNA Pol	функција	продукти	локација	чувствителност кон $\alpha$ -аманитин
I	транскрипција на гените за 28S, 18S и 5.8S rRNA	rRNA	нуклеолус	нечувствителна
II	транскрипција на сите протеин-кодирачки гени (синтеза на mRNA)	mRNA	нуклеоплазма	високо чувствителна
III	транскрипција на гените за транспортните RNA, snRNA и 5S rRNA	rRNA, tRNA и snRNA	нуклеоплазма	умерено чувствителна

Во експериментални цели, важни се и разликите во чувствителноста на еукариотските RNA-полимерази кон пептидниот токсин  **$\alpha$ -аманитин** изолиран од отровна печурка (**слика 9-15**).



**Слика 9-15:** Отровната печурка зелена губавка (*Amanita phalloides*). Оваа печурка содржи аманитин кој е силен инхибитор на еукариотската RNA-полимераза II.

Еукариотската RNA-полимераза II поседува „лекторска“ т.е. 3'→5' егзонуклеазна (англ. *proofreading*) активност која обезбедува поголема точност на транскрипцијата отколку кај прокариотите. Сепак, таквата активност е неспоредливо помалку ефективна отколку при DNA-репликацијата, па, грешките при транскрипцијата се случуваат просечно на секои  $10^4$  нуклеотиди. Слично како при репликацијата на DNA, оваа активност се одвива така што при синтезата, RNA-полимеразата повремено се враќа наназад (во 3'→5' насока) и проверува дали вградените рибонуклеотиди се комплементарни со деоксирибонуклеотидите од DNA урнек-веригата (A со U, G со C, и обратно). При наоѓање на погрешно спарени рибонуклеотиди, RNA-

полимеразата ги отстранува со својата егзонуклеазна хидролитичка активност и на нивно место инкорпорира нови правилно спарени рибонуклеотиди.

Некои автори сметаат дека класификацијата на еукариотските RNA-полимерази треба да се прошири со приклучување на посебна **RNA-полимераза IV** која ги синтетизира малите интерферирачки RNA-молекули (siRNA) кај растенијата. Овие функционални RNA-молекули се објаснети поопширно понатаму во текстот. Синтезата на siRNA-молекулите вклучени во инактивацијата на гените преку создавање на



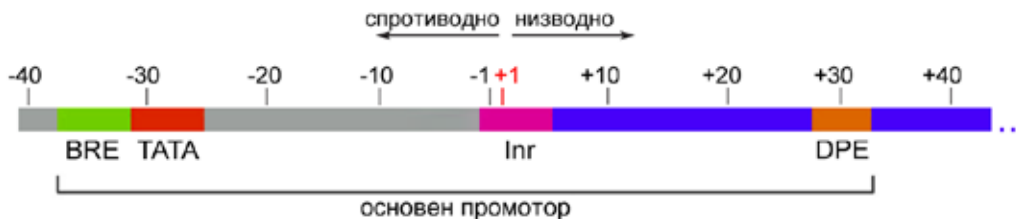
хетерохроматин кај растенијата, според некои автори, ја врши посебна **RNA-полимераза V**. Се смета дека транскрипцијата на гените во геномите на митохондриите и хлоропластите ја вршат специјализирани RNA-полимерази: **митохондриската** и **хлоропластната RNA-полимераза**, соодветно.

## Основен регулаторен елемент

Транскрипцијата се одвива на сличен начин и кај прокариотските и кај еукариотските клетки, но, значително се разликуваат молекуларните компоненти (ензимите и протеините) кои ја извршуваат. Покрај тоа што еукариотите поседуваат три различни RNA-полимерази, иницирањето на транскрипцијата кај нив е зависно од присуството на поголем број комплексни протеински молекули. Еукариотските гени се неактивни сè додека посебни протеини не се врзат со т.н. регулаторни DNA-секвенци во промоторот.

Регулаторните секвенци на гените кај повеќеклеточните еукариотски организми се класифицирани во повеќе типа промотори според положбата во однос на иницирачката секвенца како и според функционалноста. Овде ќе биде објаснета структурата на т.н. основен промотор, додека другите регулаторни секвенци се опишани понатаму во контекст на регулацијата на генската експресија.

**Основниот промотор** кај вишите еукариоти е неопходен за транскрипција со RNA-полимеразата II и се состои од четири типа на регулаторни елементи: BRE, TATA, Inr и DPE (слика 9-16).



**Слика 9-16:** Структура на основниот промотор на гените кај повеќеклеточните еукариоти. Означени се позициите на четирите основни промоторни елементи во однос на местото на иницирање на транскрипцијата. Почетниот дел од кодирачката секвенца на генот е прикажан со сина боја.

**BRE-елементот** (од англ. *TFIIIB recognition element*: елемент кој го препознава TFIIIB) е лоциран спротиводно од иницирачкиот нуклеотид и со него се врзува транскрипцискиот фактор TFIIIB. Еукариотскиот **TATA-елемент**, всушност, има нуклеотидна секвенца: 5'-ТАТАААА-3', а во литературата се означува и како **Голдберг-Хогнесова** (Goldberg-Hogness) или само Хогнесова секвенца. Лоциран е околу 30 базни пара (-30) спротиводно (кон 5'-крајот) од местото на започнување на транскрипцијата. Се претпоставува дека оваа DNA-секвенца помага во локалното раздвојување на двете вериги од двојниот DNA-хеликс, со што ја прави едната од нив (урнек-веригата) достапна за транскрипциската машинерија. **Inr-елементот** (од англ. *initiator*: иницијатор) се наоѓа околу местото на иницирање на транскрипцијата, а **DPE-елементот** (од



англ. *downstream promoter element*: низводен промоторен елемент) е лоциран 30-ина нуклеотида низводно (во 3'-насока).

Основните промотори за транскрипција на гените со RNA-полимеразата II кај вишите еукариоти содржат само по два или три од наведените четири елементи. Со овие DNA-регулаторни секвенци се врзуваат соодветни протеини наречени **транскрипциски фактори** што е неопходен процес за започнување на транскрипцијата.

## Општи транскрипциски фактори

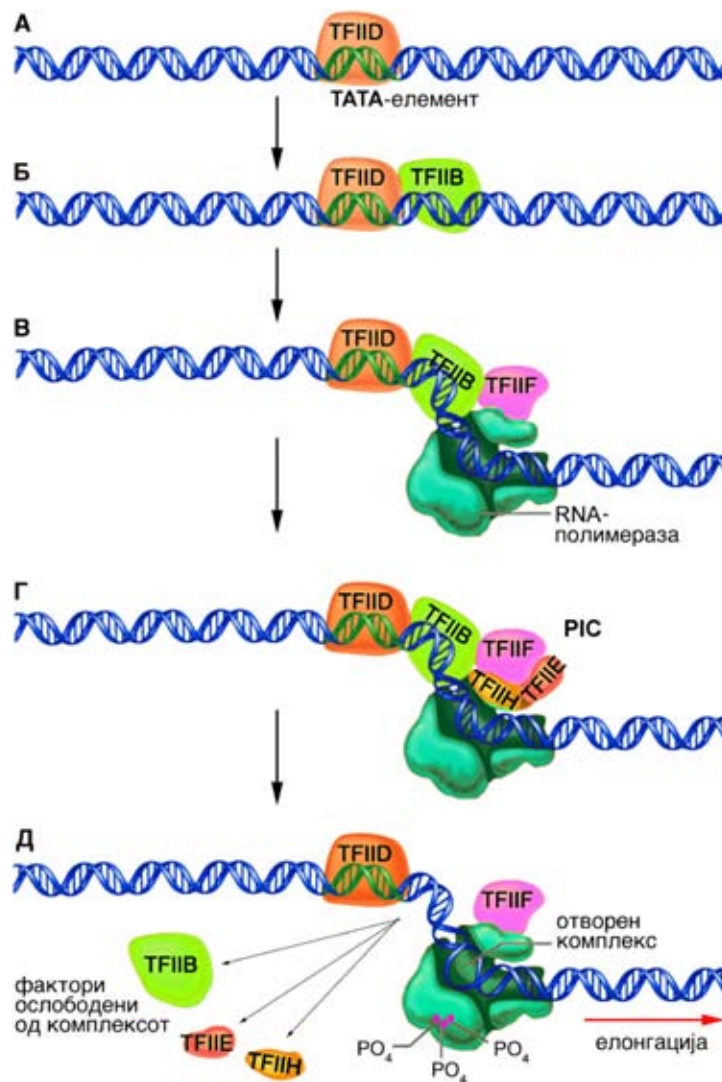
Како што е претходно објаснето, кај прокариотските клетки, сигма-факторот и RNA-полимераза холоензимот го создаваат прединицијациониот комплекс кој го препознава промоторот и се врзува со него. Но, еукариотската RNA-полимераза не можат сама да го препознае промоторот ниту да се врзе со DNA-хеликсот, туку таквата улога ја извршуваат повеќе протеини наречени **општи транскрипциски фактори**: TFIID, TFIIA, TFIIB, TFIIF, TFIIЕ и TFIIN. Нивните ознаки се комбинација од: кратенката за транскрипциски фактор (TF), по што следува римскиот број на RNA-полимеразата со која создаваат комплекс (во овој случај, RNA-полимеразата II), и на крајот латинската буква доделена според хронологијата на откривањето (A, B, C итн.). По својата природа, овие фактори се протеински молекули, а некои од нив се молекуларни комплекси составени од повеќе субединици.

Овие фактори најпрво се врзуваат со соодветните промотори и со тоа ја привлекуваат и правилно ја поставуваат RNA-полимеразата II за започнување на транскрипцијата. Од наведените шест транскрипциски фактори, само **TFIID** е способен за препознавање и врзување со TATA-промоторната DNA-секвенца на еукариотските гени. Овој мултимерен комплекс го содржи TATA-врзувачкиот протеин **TBP** (од англ. *TATA-binding protein*) и повеќе придружни протеински молекули. Интересно е што речиси половината од еукариотските гени, воопшто, немаат TATA-елементи во своите промотори, иако и кај тие гени TBP се врзува со други секвенци од основниот промотор (со Inr, на пример).

Откога комплексот TFIID ќе се врзе со промоторот, започнуваат низа чекори во текот на кои се привлекуваат и се врзуваат и преостанатите пет транскрипциски фактори, и тоа по следниов редослед: TFIIA, TFIIB, TFIIF поврзан со RNA-полимеразата II, TFIIЕ и на крајот TFIIN. Со тоа станува целосен еукариотскиот **прединицијациони комплекс (PIC, од англ. pre-initiation complex)** (слика 9-17).

Факторот TFIIN има две функции. Неговата АТР-зависна хеликазна активност предизвикува раздвојување на двете вериги од DNA-хеликсот, што е неопходно за започнување на транскрипцијата (слично на преминот од затворен во отворен комплекс, опишан при транскрипцијата кај *E. coli*). Покрај тоа, факторот TFIIN врши фосфорилирање на самата полимераза, што претставува последен чекор за конечно ослободување на RNA-полимеразата II од промоторот и започнувањето на синтезата на RNA-транскриптот кај еукариотите.

Покрај опишаните општи транскрипциски фактори, при транскрипцијата на повеќето гени кај вишите еукариотски организми учествуваат и транскрипциски фактори кои се специфични за ткивото, уште поголем број регулаторни DNA-елементи и протеини, и посложени механизми за нивна интеракција, објаснети во главата 11: Регулација на генската експресија.



**Слика 9-17:** Иницирање на транскрипција кај еукариотите. Прикажани се само општите транскрипциски фактори кои со RNA-полимеразата II го создаваат прединицирачкиот комплекс (PIC). Со симболите за фосфатна група е означено фосфорилирањето на големата субединица од полимеразата. Врзувањето на овие протеини со DNA хеликсот предизвикува негово превиткување.

## Други специфичности на еукариотската транскрипција

Во еукариотските клетки постојат и повеќе **фактори на елонгација** и **процесирачки фактори**, кои се неопходни за непречено, координирано и целосно одвивање на елонгацијата при RNA синтезата.

Терминирањето на транскрипцијата кај еукариотите е зависно и од додавањето на полиаденилатна опашка на 3'-крајот од RNA-транскриптот, што е објаснето во натамошниот текст.

Покрај тоа, транскрипцијата на гените за рибозомската и за транспортните RNA-молекули кои ги вршат полимеразите I и III се под контрола на сосем различни промотори и транскрипциски фактори, освен TBP факторот кој, исто така учествува и во нивното иницирање и регулација на транскрипцијата.

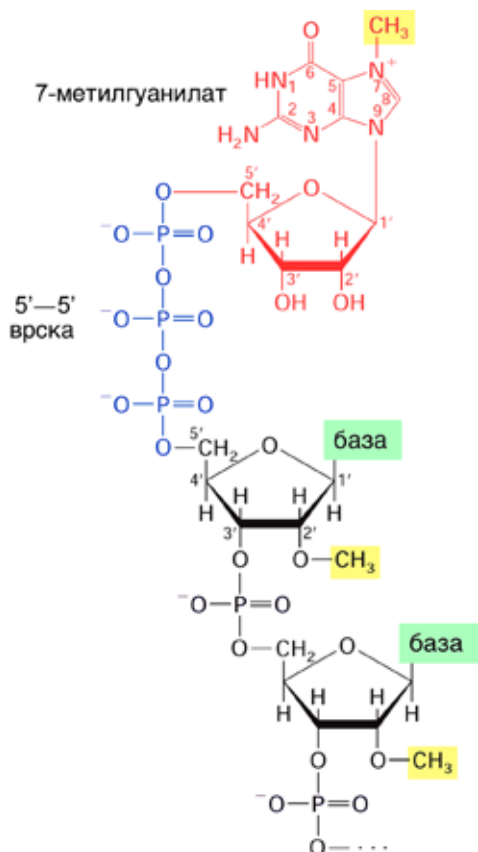
Транскрипцијата е строго контролиран процес и кај прокариотите и кај еукариотите. Соодветното временско усогласување на транскрипцијата и регулирањето на нивоата на генска експресија на одделните гени се есенцијални за скоро сите клеточни процеси.

### 9.11 Процесирање на 5'- и 3'-краевите на примарниот транскрипт од протеин-кодирачките гени

За разлика од прокариотската транскрипција, при која настанува mRNA подготвена веднаш да биде користена како урнек за транслација во протеински производи, кај еукариотите се синтетизираат RNA-молекули кои мораат дополнително да се обработат пред да станат употребливи во процесот на транслација. Таквото процесирање опфаќа неколку крупни промени кои се вршат во јадрото и кои резултираат со создавање на **зрела mRNA** која може да се користи за транслација. Покрај тоа, хемиски се модифицираат и двата краја (5' и 3') на незрелата mRNA.

#### Додавање 7-метилгуанозинска капа на 5'-крајот

Кај еукариотите, на 5'-крајот од примарниот транскрипт се додава модифициран нуклеотид кој, сликовито, дејствува како заштитна капа. Овој нуклеотид е 7-метилгуанозин (слика 9-18) и е поврзан со првиот нуклеотид од примарниот транскрипт преку невообичаена 5'-5' трифосфатна врска.



Додавањето на 5'-капата се случува набргу по иницирањето на транскрипцијата и се одвива низ три ензимски реакции. Во текот на првата, ензимот RNA трифосфатаза ја отстранува 5'-фосфатната група од примарниот транскрипт. Втората реакција е катализирана со гуанилил трансферазата која ја врзува 5'-фосфатната група од гуанозин трифосфатот (GTP), создавајќи ја 5'-5' трифосфатната врска. Третата ензимска реакција е метилирањето на 7-N атомот од новододадениот гуанин со ензимот **метил-трансфераза**. Интересно е што додавањето на 7-метилгуанозинот се случува уште додека трае транскрипцијата, односно додека

**Слика 9-18:** Метилгуанозинска капа на 5'-крајот од примарниот RNA-транскрипт чие процесирање е во тек. 7-метилгуанозинот е поврзан со 5'-фосфатната група на првиот нуклеотид преку карактеристична 5'→5' трифосфатна врска. Покрај тоа, метилрани се и 2'-ОН групите на првите два нуклеотида од незрелиот mRNA-молекул.

должината на RNA-транскриптот е околу 20-40 нуклеотиди.

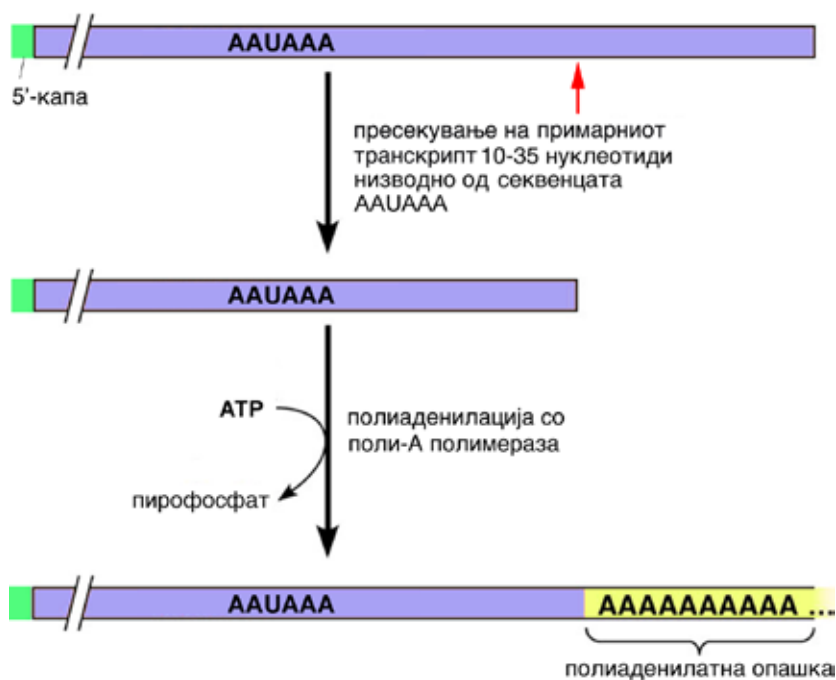
Покрај додавањето на 5'-капата, се метилираат и групите 2'-ОН на рибозите од првите два-три нуклеотида на 5'-крајот на примарниот транскрипт.

Се смета дека ваквата модификација овозможува рибозот да ги препознае почетоците на mRNA-молекулите, но, и дека ги заштитува од деградација со **рибонуклеазите** кои се изобилно присутни во цитоплазмата.

### Додавање полиаденилатна (поли-А) опашка на 3'-крајот

Следниот процес е додавањето на полиаденилатна опашка на 3'-крајот од еукариотскиот примарен транскрипт и е тесно поврзан со терминирањето на транскрипцијата. Кога RNA-полимеразата II е при крајот од транскрипцијата на генот, во примарниот транскрипт е препишана секвенцата: 5'-AAUAAA-3' која има улога на **сигнал за полиаденилација** и ги привлекува соодветните протеини и ензими кои се неопходни за овој процес. Тие го отсекуваат крајниот 3' сегмент од транскриптот и тоа на растојание од околу 10 до 35 нуклеотиди низводно од оваа секвенца (**слика 9-19**). На овој крај, ензимот **поли-А-полимераза** додава полирибонуклеотидна верига составена од околу 100 до 300 аденински остатоци. Оттаму и изразот поли-А-опашка. Овој ензим синтезата ја врши слично на RNA-полимеразата, користејќи АТФ како прекурзори, но, без каков било урнек. Со тоа, 3'-крајот од RNA-транскриптот добива полиаденилатна опашка. Се смета дека оваа модификација помага во експортирањето на mRNA молекулот од јадрото во цитоплазмата. Покрај тоа, се претпоставува дека ја зголемува и стабилноста на транскриптот, штитејќи ги кодираните информации на 3'-крајот од егзонуклеазна деградација. Токму оваа полиаденилатна опашка е карактеристична за транскрипцијата на протеин-кодирачките гени со RNA-полимеразата II и се користи во лабораториските постапки за високо селективно издвојување на mRNA од сложена смеса на други DNA, RNA-молекули и протеини.

Со текот на времето, 3'-полиаденилатната опашка од mRNA-молекулот прогресивно се скусува поради ензимската хидролиза со 3'-егзонуклеазите кои се обемно присутни во

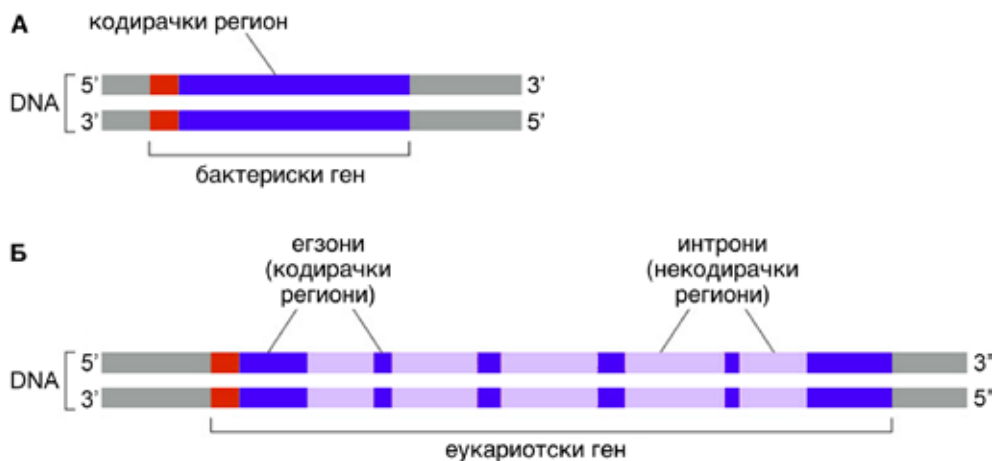


**Слика 9-19:** Полиаденилација на примарниот транскрипт.

цитоплазмата на клетките. Оттаму и се верува дека полиаденилатните опашки имаат заштитна улога продолжувајќи го времето во текот на кое рибонуклеазите ќе достигнат до кодирачките секвенци, а со тоа го продолжуваат полуживотот на mRNA.

## 9.12 RNA сплајсинг - преспојување на примарниот RNA-транскрипт

За разлика од прокариотските гени, кодирачкиот DNA-регион од најголемиот број гени кај еукариотите е испрекинат со повеќе некодирачки региони. Кодирачките региони се означени како **егзони** и директно кодираат аминокиселински остатоци во протеинските продукти. Тие се раздвоени со некодирачки, интервенирачки секвенци (или скратено - **интрони**) кои се препишуваат во mRNA при транскрипцијата, но, не кодираат аминокиселини, па, не се користат за транслација во протеински продукти (слика 9-20).

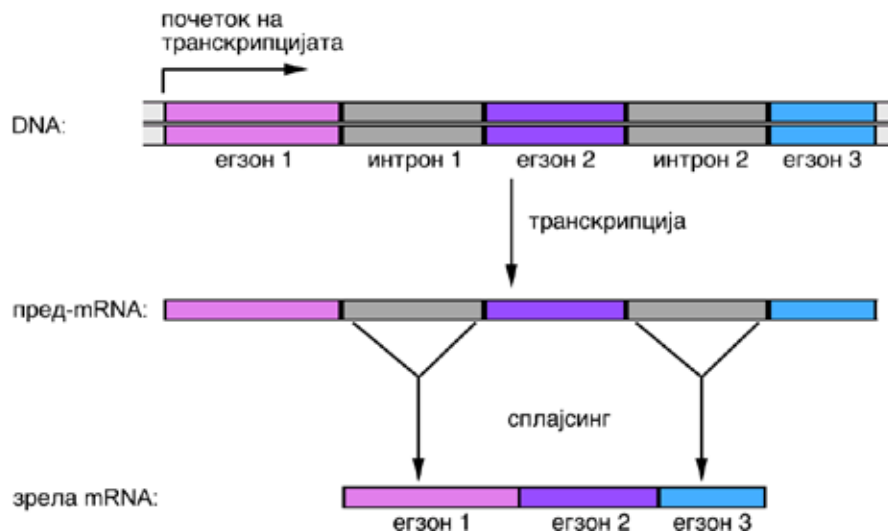


**Слика 9-20:** Разлики во генските DNA-секвенци кај прокариотските и кај еукариотските организми. **А:** Гените во бактериските геноми се непрекинати DNA-секвенци кои се составени од промотор (означен со црвена боја) и кодирачки регион кој ги содржи информациите за аминокиселинскиот редослед на полипептидот. **Б:** Во еукариотските хромозоми, најголемиот број гени се составени од региони (егзони) кои директно кодираат аминокиселини кои се раздвоени со некодирачки региони (интрони). Со сива боја е означена преостанатата некодирачка DNA-секвенца бочно од гените.

Бројот и должината на интроните во гените е различна и варира во широк опсег, како меѓу разните гени, така и меѓу организмите. Повеќе детали за егзоните и интроните се дадени во главата 16: Геномика.

Со оглед на тоа што при транскрипцијата се препишува целата транскрибирачка секвенца од DNA-урнекот, интроните мораат да се отстранат од

примарниот транскрипт. Процесот со кој се прави тоа се нарекува **преспојување** или **сплајсинг** (од англ. *splicing*: преспојување). Процесот на преспојување на егзоните може сликвито да се спореди со режисерското отсекување на непожелните делови од филмска лента и спојување на соодветните краеве со што се обезбедува континуиран тек на филмот. Кај гените кои содржат интрони, процесот на сплајсинг е неопходен чекор во создавањето на зрела mRNA (слика 9-21).



**Слика 9-21:** Преспојување на RNA-транскриптот преку отстранување на интроните и спојување на егзоните во континуирана mRNA. Со отстранување на интроните (означени со сива боја), егзоните се спојуваат во непрекината линеарна низа.

По отстранувањето на интроните, егзонските региони се поврзуваат во континуирана верига, која е целосно колонеарна со полипептидот кој го кодира. Покрај тоа, должината на зрелите прекроени mRNA-молекули е многу помала отколку на примарниот транскрипт. Тоа е и причината што порано се сметало дека mRNA во јадрото се посебна класа на RNA-молекули и биле опфатени со, веќе опсолетниот израз, **хетерогени јадрени mRNA-молекули (hnRNA)**, од англ. *heterogenous nuclear RNA*). Сега се знае дека тоа се, всушност, примарните транскрипти кои се „заробени“ во јадрото.

Со преспојувањето, а претходно и со модификациите на 5'- и на 3'-краевите од примарниот транскрипт, настанува зрела, функционална mRNA која е подготвена за транспорт во цитоплазмата и за транслација во рибозомите. По процесирањето во јадрото, зрелата mRNA излегува низ јадрените пори во кои постои посебен рецептор способен да ја препознае зрелата mRNA или протеинот кој е врзан со неа. Непроцесираните или нецелосно процесирани пред-mRNA молекули остануваат во јадрото.



## Механизми на RNA сплајсингот

Во самиот примарен RNA-транскрипт, границата меѓу егзоните и интроните содржи карактеристични нуклеотидни секвенци кои го определуваат местото за преспојување. Граничниот, 5'-крај од секој интрон се нарекува **5'-точка** (или **секвенца**) **за сплајсинг**, а спротивниот 3'-крај: **3'-точка за сплајсинг**. Во постарата литература, овие места се означуваат и како донорно и акцепторно место, соодветно. Околу овие точки се наоѓаат карактеристични консензусни секвенци на нуклеотиди, па, кај, речиси, сите интрони, првите два нуклеотида од 5'-крајот имаат секвенца GU, а AG на спротивниот, 3'-крај (т.н. **AG-GU правило**). Овие секвенци се критични за процесот на преспојување. Голема важност кај преспојувањето има и посебна, трета секвенца во интронот, наречена **точка** (или **секвенца**) **на раздвојување** што содржи само еден нуклеотид кој е лоциран приближно 18 до 40 бази спротиводно од 3'-крајот на интронот (слика 9-22).



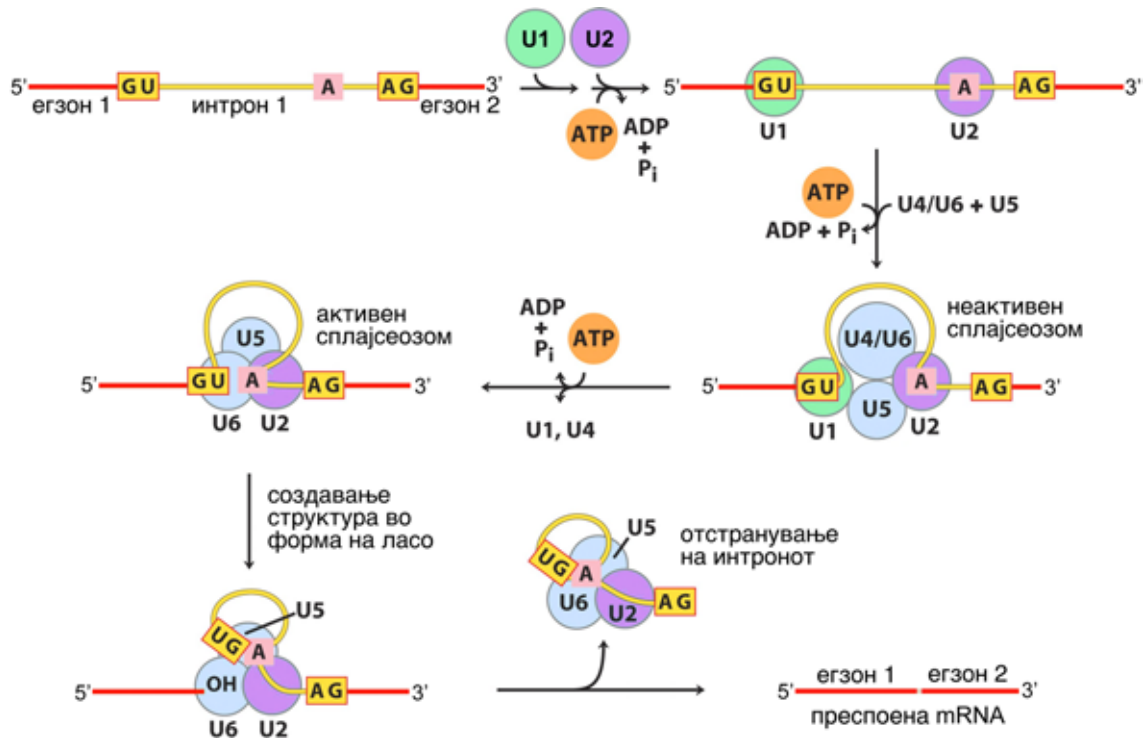
**Слика 9-22:** Гранични региони меѓу егзоните и интроните и точката за раздвојување во примарниот транскрипт (незрелата mRNA).

Интроните се отстрануваат од примарниот транскрипт уште додека трае транскрипцијата и откако е додадена 7-метилгуанозинската капа на 5'-крајот од примарниот RNA-транскрипт (незрела mRNA). Постојат два основни типа на преспојување: посредувано со сплајсеозом и со т.н. самопреспојување.

## Преспојување со сплајсеозом

Најраспространет начин на отстранување на интроните се спроведува со помош на сложени супрамолекуларни структури наречени **сплајсеозом**. Според некои автори, сложеноста на овие структури оправдува да се наречат молекуларни машини (израз кој се користи и за други сложени комплекси, какви што се рибозомите или реплизомот, на пример). Сплајсеозомите се составени од комплекси од snRNA здружени со протеини кои се означени како мали јадрени рибонуклеопротеини (**snRNP**, од англ. *small nuclear ribonucleoproteins*, кратенката обично се изговара: „снурп“). Досега се познати пет типа snRNP-молекули (U1, U2, U4, U5 и U6) кои учествуваат во градбата на сплајсеозомските комплекси. Секој сплајсеозом содржи по околу 300 субединици. Интересно е што нуклеотидна секвенца на snRNA-молекулите, како и аминокиселинската секвенца на протеините кои учествуваат во комплексите snRNP, е еволуциски високо конзервирана кај еукариотските организми, од едноклеточните квасци, па, сè до вертебралите.

Клучната улога на сплајсеозомот е извршување на низа координирани интеракции меѓу секвенцата на незрелата mRNA со snRNA молекулите и сплајсеозомските протеини, а овие интеракции се должат на специфичното интермолекуларно препознавање меѓу комплементарните бази.



**Слика 9-23:** Преспојување со сплајсеозом: супрамолекуларен комплекс за преспојување на примарниот mRNA-транскрипт. Ензимските реакции предизвикуваат преспојување на mRNA со што двата егзона се спојуваат, а се одвојува интронот во форма на ласо.

Процесот на преспојување на пред-mRNA со сплајсеозом се одвива низ повеќе чекори (слика 9-23). Молекулот на U1 snRNA содржи секвенца која е комплементарна со таа околу 5'-точката за сплајсинг од интронот, па, се врзува со истата. На сличен начин, но, со енергија ослободена со хидролиза на ATP, молекулот на U2 snRNA се врзува со регионот околу точката за раздвојување (која содржи аденински нуклеотид). Хидролизата на ATP обезбедува енергија за врзување и на преостанатите snRNA молекули (U4, U5 и U6) и уште 50-тина протеини со чија помош интронскиот DNA регион се превиткува и се создава супрамолекуларна структура на неактивен сплајсеозом. Понатаму, со внатрешно прераспределување на компонентите, при кое повторно се троши ATP, од неактивниот сплајсеозом се ослободуваат U1 и на молекулите U4 snRNA, додека U6 snRNA се врзуваат со двете точки за сплајсинг од интронот. Со овој чекор се создава активниот сплајсеозом со чија каталитична активност се отстранува интронскиот регион, а ковалентно се врзуваат 3'-крајот од првиот и 5'-крајот од вториот егзон. Овој процес се повторува кај секој од присутните интрони во mRNA-молекулот, доколку ги има повеќе.

Молекуларниот механизам на сплајсеозомското преспојување вклучува две последователни **трансеστεрификациски реакции** кои создаваат нови фосфодиестерски врски на местото од претходните, а притоа се одржува енергетската рамнотежа. Во извесна смисла, овие две реакции се слични со прекилот на DNA-веригите и повторното поврзување на фосфодиестерските врски што го вршат топоизомеразите во текот на релаксирањето на суперспиралноста.

Во текот на првата трансеστεрификациска реакција, 2'-хидроксилената група од аденинскиот остаток од точката на развојување во интронот врши нуклеофилан напад врз фосфатната група од нуклеотидот кај 5'-точката за сплајсинг. Притоа, меѓу 3'-хидроксилената група од гуанозинот и нуклеотидот кај 5'-точката за сплајсинг од интронот се создава вообичаената 3'-5'-фосфодиестерска врска.

Во текот на втората трансеστεрификациска реакција, ослободената 3'-хидроксилената група од првиот егзон станува нуклеофил при што врши напад врз фосфатната група од нуклеотидот кај 3'-точката за сплајсинг од интронот. Резултат од овие две реакции е прецизно отстранување на интронот кој создава структура во форма на ласо, а двата егзона се преспојуваат во континуирана верига.

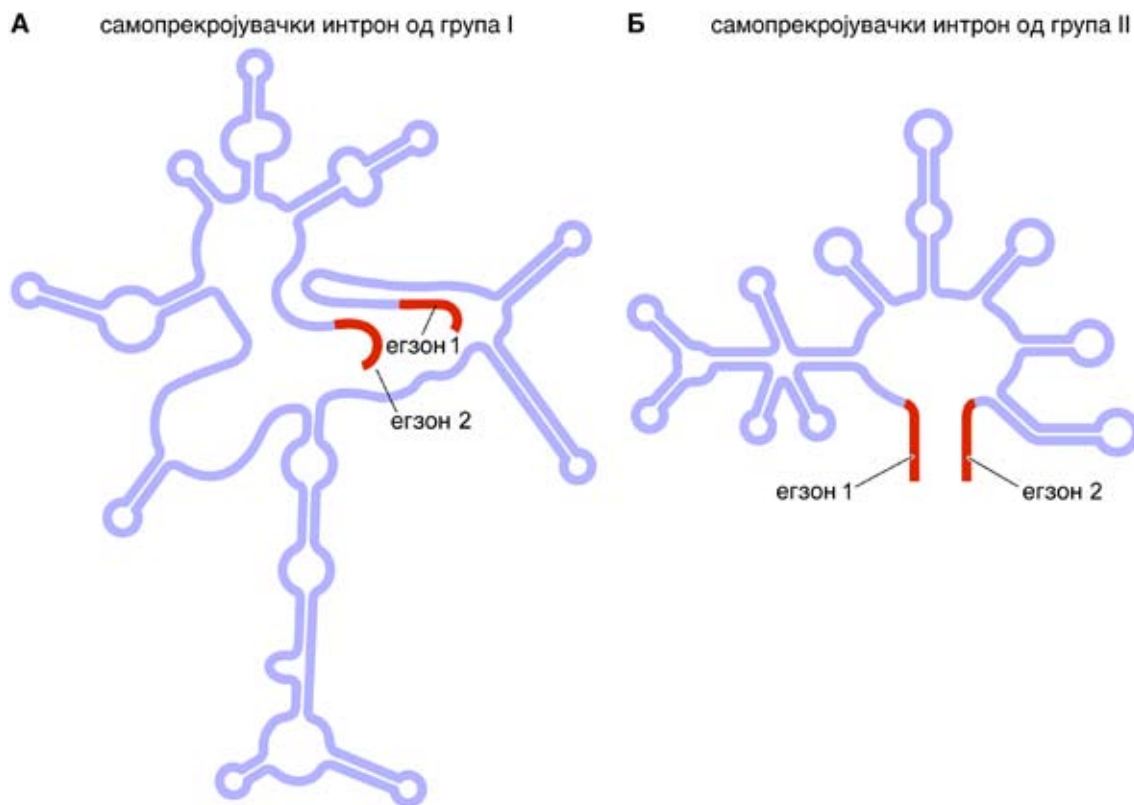
## Самопреспојување

Феноменот на самопреспојување за првпат е откриен во 1982 година кај циљатната протозоа *Tetrahymena*. Имено, при проучувањето на механизмите на преспојувањето кај овој организам при *in vitro* експерименти, забележано е дека тоа се извршува и без протеински компоненти. Таквиот феномен се должи на каталитичната активност на самата RNA-интронска секвенца која делува како рибозим (RNA-ензим). Оттаму, овие интрони се нарекуваат **самопреспојувачки интрони**, а подоцна се пронајдени и кај други еукариотски организми, па, дури и кај некои прокариоти. Според механизмот, постојат две групи самопреспојувачки интрони. **Групата I** се наоѓа во примарните транскрипти на некои гени во хромозомите кај еукариотските клетки, како и кај тие од рибозомските гени во митохондриите и хлоропластите. Интроните од **групата II** најчесто се присутни во примарните транскрипти од митохондриските и хлоропластните геноми кај габите, алгите и растенијата. Многу ретко, и двете класи се наоѓаат во интроните кај бактериите. Интрамолекуларните водородни врски меѓу комплементарните бази создаваат сложени секундарни структури на кои се должи каталитичната активност (**слика 9-24**).

Карактеристично е што во текот на самопреспојувањето не се потребни високоенергетски соединенија од типот на АТФ, но, неопходно е присуството на нуклеотиди кои ја содржат базата гуанин (GMP, GDP или GTP) и тоа не како извори на енергија, туку како кофактори за одвивање на двете трансеστεрификациски реакции.

Кај самопреспојувачките интрони од типот I, во текот на првата трансеστεрификациска реакција, 3'-хидроксилената група од слободниот гуанински нуклеотид врши нуклеофилан напад врз фосфатната група од нуклеотидот кај 5'-точката за сплајсинг (**слика 9-25, A**).

Во текот на втората трансеστεрификациска реакција, ослободената 3'-хидроксилената група од првиот егзон станува нуклеофил при што врши напад врз фосфатната група од нуклеотидот кај 3'-точката за сплајсинг од интронот. Резултат од



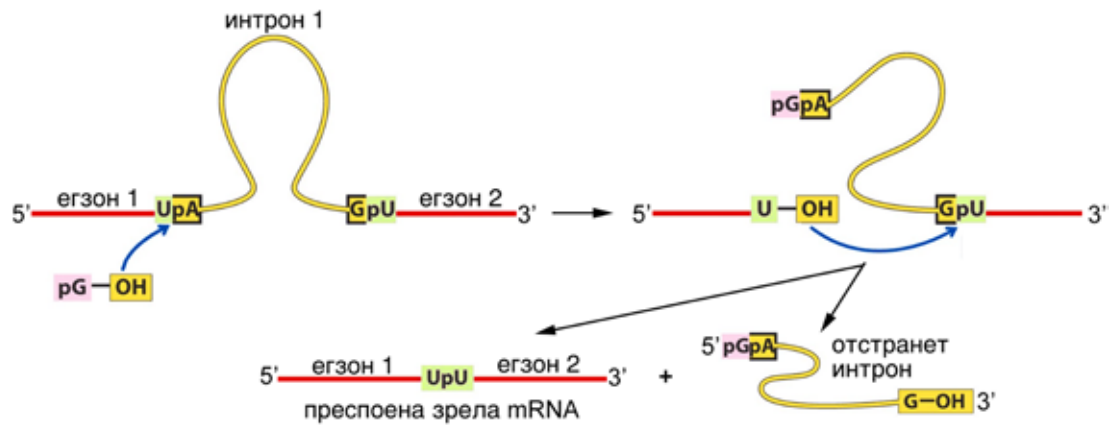
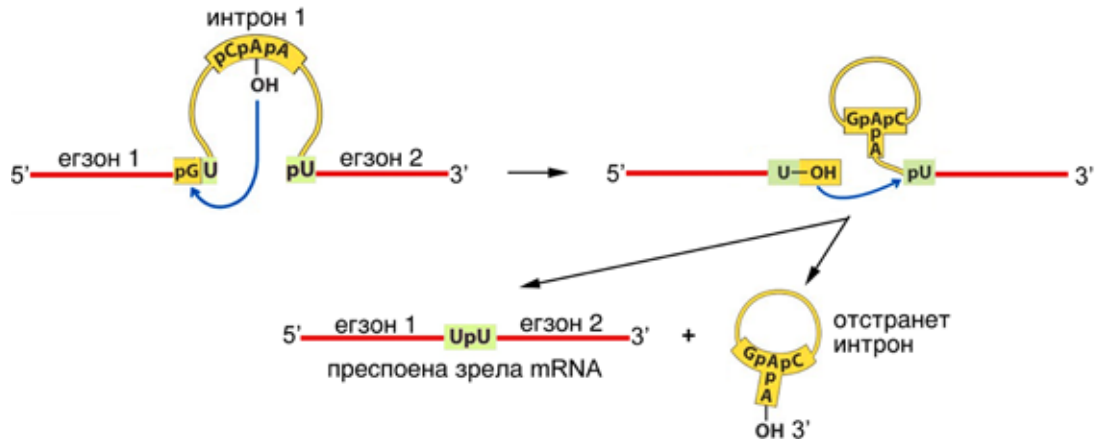
**Слика 9-24:** Примери за карактеристичните секундарни структури кои ги создаваат самопреспојувачките интрони од некои молекули на пред-mRNA. Интронските секвенци (со сина боја) се значително подолги отколку егзонските.

овие две реакции е прецизно отстранување на линеарниот интрон, а преспојување на двата егзона во континуирана верига.

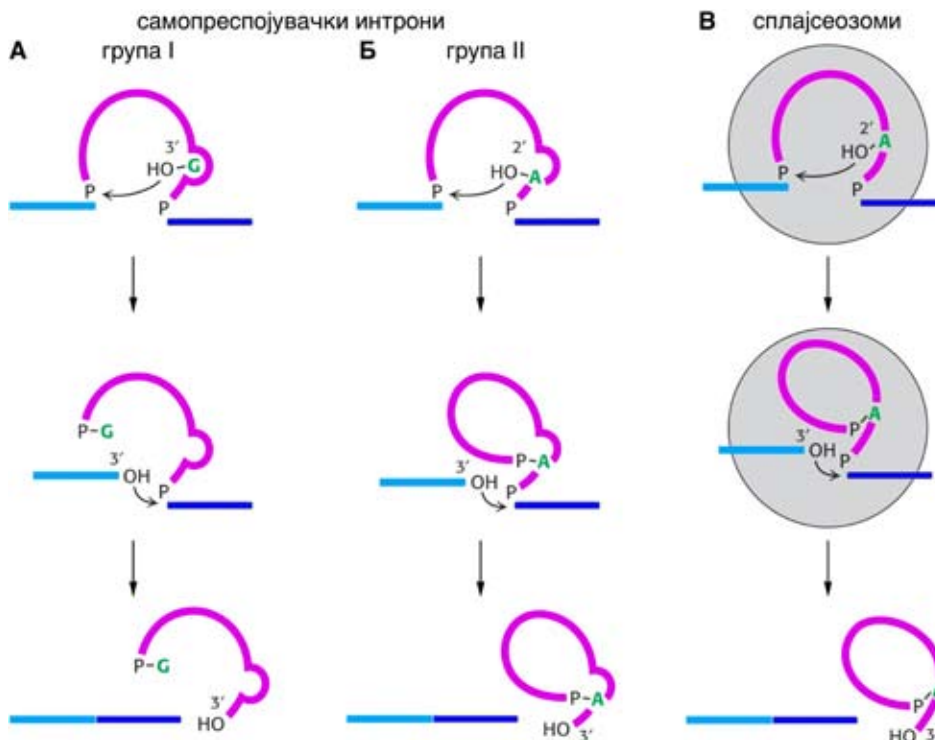
Механизмот е сличен и кај самопреспојувачките интрони од типот II, но, со таа разлика што при првата трансестерификациска реакција, улога на нуклеофил има 2'-хидроксилната група од аденинот од точката на раздвојување во интронот (**слика 9-25, Б**). Отстранетиот интрон создава структура во форма на ласо, слично како кај сплајсеозомскиот механизам на преспојување.

Споредбата на основните карактеристики на трите основни типа на сплајсинг се прикажани на **сликата 9-26** и во **табелата 9-2**.

Забележително е што од отстранетиот интрон при сплајсингот кај самопреспојувачките интрони од групата II и кај преспојувањето со сплајсеозоми се создава структура во форма на ласо, за разлика од линеарната структура при отстранувањето кај самопреспојувачките интрони од групата I. Очигледни се и разликите во однос на нуклеотидот кај точката (секвенцата) за раздвојување: аденинот е најчест кај групата II на самопреспојувачките интрони, како и кај со сплајсеозомското преспојување, додека гуанинот е најчест кај самопреспојувачките интрони од групата I.

**А** сплајсинг со самопрespoјувачки интрони од групата I**Б** сплајсинг со самопрespoјувачки интрони од групата II

**Слика 9-25:** RNA-сплајсинг со самопрespoјувачки интрони. Рибозимската каталитична активност на интронската RNA го извршува самото прespoјување. Шематски е прикажан процесот кај самопрespoјувачките интрони од групата I (**А**) и од групата II (**Б**). Нуклеофилните напади на хидроксилната група од точката за сплајсинг или за раздвојување врз фосфатната група од 3'-крајот на првиот егзон се прикажани со сини стрелки.



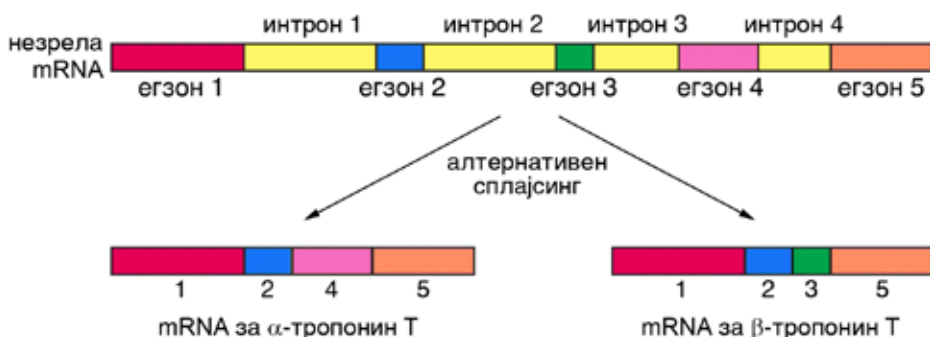
**Слика 9-26:** Споредба на трите основни типа на пресојување на интроните по транскрипцијата. Шематски е прикажан сплајсингот на самопресојувачките интрони од групата I (A) и од групата II (B), како и пресојувањето со помош на сплајсеозоми (C). Со искривени стрелки е прикажан нуклеофилниот напад на хидроксилната група од соодветниот нуклеотид врз фосфатната група од 3'-крајот на првиот егзон. Егзоните се означени со нијанси на сината боја, интронот со виолетова, а нуклеотидот чија хидроксилна група го врши нуклеофилниот напад, е со зелена боја.

карактеристики	Табела 9-2: Споредба на RNA-пресојувањето (сплајсингот) кај трите класи интрони		
	интрони во пред-mRNA од протеин-кодирачките гени	самопресојувачки интрони од група I	самопресојувачки интрони од група II
застапеност	најчести, речиси кај сите еукариотски протеин-кодирачки гени	ретки, во гените за rRNA кај некои еукариоти, во гените на органели и кај неколку прокариотски гени	ретки, во некои гени во еукариотските органели и многу ретко кај некои прокариоти
механизам	две реакции на трансестерификација	две реакции на трансестерификација	две реакции на трансестерификација
каталитична машинерија	сплајсеозом	самиот интрон е RNA-ензим (рибозим)	самиот интрон е RNA-ензим (рибозим)
нуклеофил	A од точката на раздвојување во интронот	гуаозински нуклеотид (GMP, GDP или GTP)	A од точката на раздвојување во интронот
структура на отстранетиот интрон	ласо	линеарна	Ласо



## Алтернативен RNA-сплајсинг

Кај гените од некои еукариотски организми, сплајсингот не ги вклучува секогаш сите егзони во крајниот mRNA-молекул. Со комбинирање на одделните егзони можат да се создадат повеќе различни зрели молекули на mRNA, а со тоа и различни протеини од еден единствен ген, каков што е оној за мускулниот протеин тропонин Т (слика 9-27).



**Слика 9-27:** Создавање на различни mRNA-молекули со алтернативен сплајсинг од еден ист примарен транскрипт кај генот за мускулниот протеин тропонин Т. Со различни комбинации на егзоните се создаваат две mRNA-молекули за α- и за β-изоформите на тропонинот Т.

Ваквиот механизам кој особено е присутен кај вишите еукариоти, во различните клеточни типови можат да се создадат повеќе различни протеински продукти кои се означени како **изоформи**. При транслација, според нив се синтетизираат разни форми на функционалниот протеин.

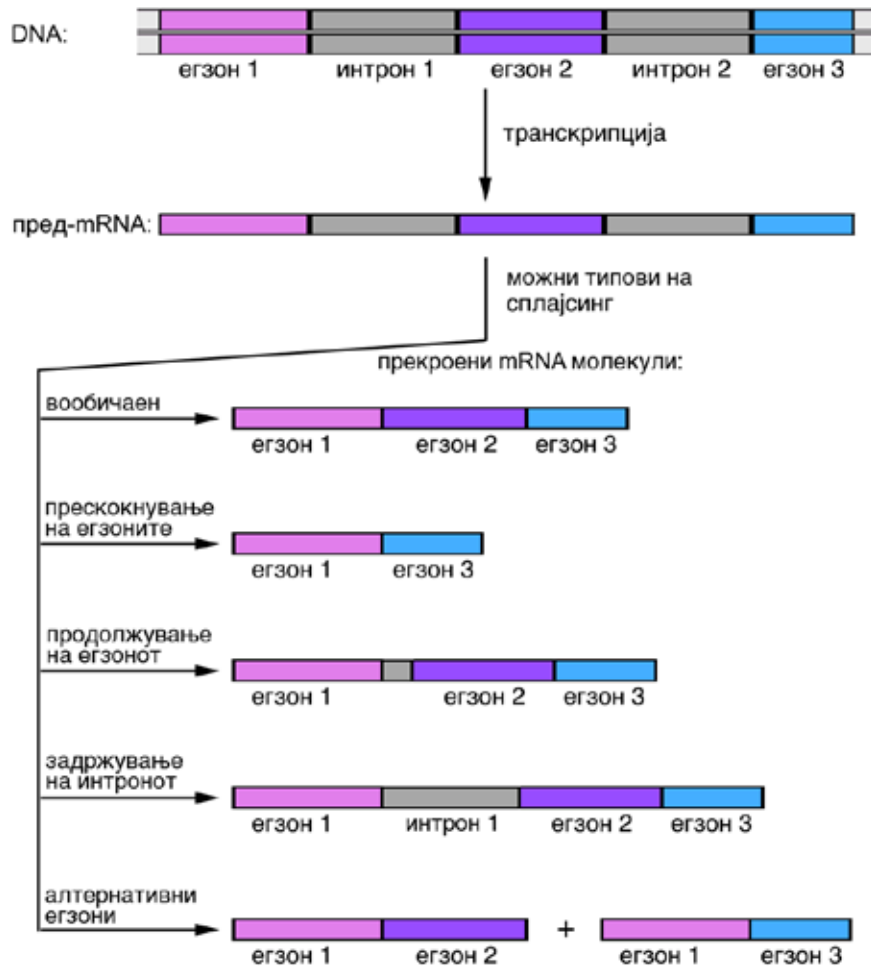
Очигледно е дека кај вишите еукариоти постојат многу повеќе mRNA молекули отколку што има гени во геномот на човечките клетки, а тоа во голем дел се должи на алтернативниот сплајсинг. Се шпекулира дека алтернативниот сплајсинг е главната причина за многу поголемиот број протеински продукти отколку што изнесува пресметаниот број гени во геномите на вишите организми.

Постојат пет вида алтернативен сплајсинг кои шематски се прикажани на **сликата 9-28**.

Опишани се и ретки примери (главно кај паразитскиот протозоен организам *Trypanosoma brucei*) каде се спојуваат егзоните од две **различни** mRNA молекули, процес кој се нарекува **транс-сплајсинг**.

Алтернативниот сплајсинг на транскриптите од некој ген може да се подели на два типа: **регулативен** и **конститутивен**. Кај регулативниот алтернативен сплајсинг секогаш се создаваат повеќе протеински изоформи од транскриптот, додека кај конститутивниот сплајсинг алтернативните форми се создаваат само при различни физиолошки услови, како и при определени стимулации, во различно време или во различни клеточни или ткивни типови.

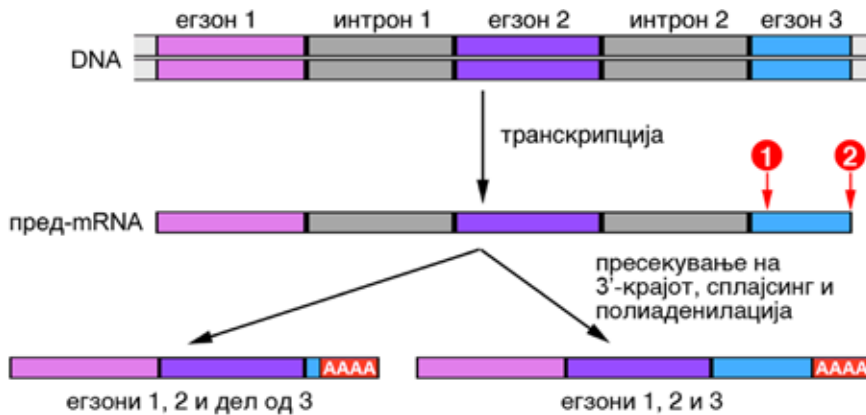
Регулацијата на алтернативниот сплајсинг во контекст на генската експресија е повеќе објаснета понатаму.



**Слика 9-28:** Пет најчести начини преку кои се одвива алтернативниот RNA сплајсинг кај вишите еукариоти.

### Алтернативно пресекување на 3'-крајот од примарниот транскрипт

Во некои еукариотски гени постојат повеќе секвенци за пресекување на 3'-крајот од примарниот транскрипт, како и сигнали за полиаденилација. Тоа овозможува алтернативно процесирање и користење на една од сигналните секвенци, по што се создаваат mRNA со различна должина (слика 9-29).



**Слика 9-29:** Алтернативно процесирање на примарниот транскрипт со користење на различни места за пресекување на 3'-крајот и полиаденилација. Со црвени кручиња се означени двете различни секвенци кои претставуваат места за пресекување и сигнали за полиаденилација.

## Алтернативни промотори

Според биоинформатичките истражувањата на Грин (Phil Green) со соработниците објавени во почетокот на 2007 година се укажува на постоење на многу поголем број генски продукти во човековиот геном, отколку што се претпоставуваше досега. Можно е 40-50% од гените кај луѓето и кај глушецот да имаат алтернативни промотори, па, се смета дека тие имаат клучно значење за комплексноста на вишите организми. Со овие резултати, како и со поновите статистички анализи, се претпоставува дека бројот на гени во хуманиот геном е над 85000, наспроти 25000 - 35000, колку што беа утврдени според претходните биоинформатички анализи на геномските податоци.

### 9.13 RNA-уредување

Покрај сплајсингот, секвенцата на примарниот транскрипт кај еукариотите може да се измени и преку посебен процес наречен **уредување на RNA**, со што и аминокиселинскиот редослед на кодираниот протеин нема да биде онаков каков што директно произлегува од DNA-секвенцата. Овој феномен е откриен при анализа на некои протеин-кодирачки гени во јадрената DNA кај цицачите и во митохондриската DNA кај определени растенија. Притоа било забележано дека, во некои случаи, секвенците на зрелите mRNA молекули не се совпаѓаат целосно со DNA-секвенците на самиот ген. Подоцна е утврдено дека, во тие случаи, секвенцата на RNA-транскриптите претрпела делумна промена, што по аналогија со корекциите при уредувањето на текст, што сликовито е наречено RNA-уредување.

Покрај протеин-кодирачките гени, уредувањето е најдено и при созревањето на tRNA и rRNA-молекулите кај разни организми.

Молекуларните механизми на RNA-уредувањето се пронајдени подоцна и можат да се поделат на две групи: со **хемиска измена** на постојните рибонуклеотиди во секвенцата и со **додавање** на нови или со **отстранување** на рибонуклеотидите во mRNA-молекулите (слика 9-30).



**Слика 9-30:** RNA-уредување преку вметнување или отстранување на рибонуклеотиди (А) или преку хемиска измена на постојните во mRNA-молекулот (Б). Заради поедноставување, прикажани се само нуклеотидите кои се релевантни за примерот.

## RNA-уредување со хемиска измена на постојните рибонуклеотиди

Во определени случаи, измената на постојните нуклеотиди се врши ензимски и тоа само на специфични позиции во секвенцата, при што, на пример, цитидинот се претвора во уридин (слика 9-31).

Овие ензими (ги има три типа кај луѓето, на пример) се означуваат и со кратенката **ADAR** (од англ. *adenosine deaminase acting on RNA*).

На пример, RNA-уредување со ензимска деаминација се врши врз транскриптите од генот за аполипопротеин-В (*APOB*) кај цицачите, кој кодира полипептид за транспорт на липидни компоненти. Во клетките на црниот дроб кај луѓето, транскриптите од овој ген го кодираат протеинот аполипопротеин-В100 со должина од 4563 аминокиселински остатоци. Но, во ентероцитите, примарниот транскрипт се подложува на RNA-уредување при кое деаминацијата на само еден цитидински остаток во уридински предизвикува предвремен прекин на транслацијата (поради појава на стоп-кодон) што создава скусен протеин аполипопротеин-В48, долг само 2153 аминокиселини.

Друг пример за ензимско RNA-уредување се одвива при експресијата на еден мембрански канален протеин во нервниот систем кај цицачите. Вообичаено, функцијата на овој мембрански канал е транспорт на калциумовите јони низ клеточната мембрана. Уредувањето на определени цитозински нуклеотиди во mRNA која го кодира овој протеин, предизвикува замена на хистидинскиот со тирозински остаток во полипептидната верига. Таквата замена резултира со промена на пропустливоста на калциумовите јони. Во отсуство на ова RNA уредување, сериозно се нарушува развојот на мозокот



**Слика 9-31:** Ензимска конверзија на цитидинскиот во урацилен остаток при RNA-уредувањето.

## RNA-уредување со вметнување или со отстранување на рибонуклеотиди

Механизмот за инсерцијата на нови рибонуклеотиди вклучува учество на посебни RNA-молекули кои служат како водилки и се означуваат со кратенката **gRNA** (од англ. *guide*: водилка). Молекулите на gRNA имаат должина од околу 40 до 80 нуклеотиди и се кодирани од посебни гени. Тие содржат секвенци кои се делумно комплементарни со mRNA-молекулот кој треба да се уреди (**слика 9-32**).



Во митохондриите на *Trypanosoma brucei* се најдени молекули на mRNA кои имаат подолги нуклеотидни секвенци отколку што е пресметано според нуклеотидите во генот кој ги кодира. Причината за тоа е RNA-уредувањето при кое се додаваат урацилни остатоци на специфични позиции од mRNA молекулите непосредно по транскрипцијата. Во овој организам, додавањето може да биде толку многу обемно, што повеќе од половина од рибонуклеотидите во mRNA-молекулите се урацилни остатоци вметнати со RNA-уредување.

**Слика 9-32:** RNA-уредување со помош на RNA-водилки (gRNA). Делумната комплементарност на базите овозможува вметнување на нови рибонуклеотиди во неуредената mRNA.

### 9.14 Транспорт на mRNA-молекулите од јадрото во цитоплазмата

Иако содржи огромен број пори, јадрената мембрана кај еукариотските клетки не дозволува транспорт на mRNA-молекулите од нуклеоплазмата во цитоплазмата сè додека нивните 5'- и 3'-краеви не се процесирани и преспојувањето не е завршено (доколку воопшто содржеле интрони).

Транспортот на зрелите и прекроени зрели mRNA-молекули не се одвива пасивно преку протнување низ јадрените пори, туку е прецизно контролиран процес кој е витален за клеточните функции.

Молекуларните механизми со кои се обезбедува слободен излез на зрелите молекули на mRNA од јадрото се должи на повеќе специфични протеини кои се врзуваат со транскриптот уште при неговата синтеза. Овие протеини нековалентно се врзуваат со mRNA-молекулите последователно, како што и тече процесот на нивното созревање. Со секој чекор на процесирање (додавање на 5'-капа, 3'-полиаденилација, сплајсинг) се врзуваат нови и различни протеински молекули, а некои се одвојуваат. Типичната зрела mRNA е поврзана со цела збирка протеини кои, веројатно, ја обележуваат како подготвена за транспорт во цитоплазмата. Од друга страна, отсуството на ваквите протеини, или пак присуството на соодветните протеини кои го попречуваат транспортот, предизвикува блокирање на процесот и задржување на, вака обележаните, mRNA во јадрото.

Транспортот од јадрото во цитоплазмата се одвива низ посебни структури сместени во јадрените пори, а наречени се комплекси на јадрената пора. Со трошење на енергија обезбедена со хидролиза на GTP, овие комплекси специфично ги препознаваат протеините поврзани со зрелите mRNA-молекули и дозволуваат нивен активен транспорт во цитоплазмата каде што се извршува транслацијата.





# ТРАНСЛАЦИЈА- СИНТЕЗА НА ПРОТЕИНИ

## Глава 10

**Т**ранслацијата е процес при која информациите од mRNA-молекулите се преведуваат во полипептидни вериги составени од аминокиселини. Изразот сликовито го одразува преведувањето од „немиот јазик“ на нуклеинските киселини во протеинските молекули, кои се конечни продукти на протеин-кодирачките гени. Синтезата на протеините по урнек на mRNA се одвива во посебни клеточни органи означени како рибозоми. Концептот на генетски код е клучен за разбирање на овие процеси.

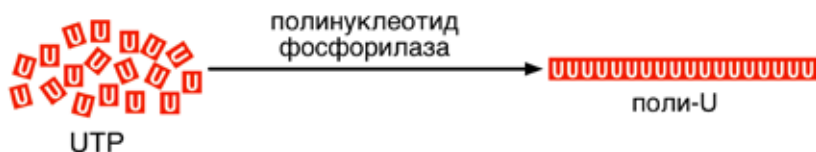
### 10.1 Откривање на генетски код

Откривањето на структурата на DNA во 1953 година од страна на Вотсон и Крик го наметнало и концептот за пренос на информациите во крајните протеински продукти, т.е. „централната догма“ на молекуларната биологија. Сепак, повеќе од десет години по ова откритие сè уште било нејасно како повеќе од 20 различни аминокиселини можат да бидат шифрирани со комбинации од само четири бази (A, T, G и C). Иако не бил познат бројот на нуклеотиди за кодирање на секоја поединечна аминокиселина во протеинот, теоретските пресметувања укажувале дека доколку секоја база би кодирала само по една аминокиселина, тогаш не би можеле да се кодираат сите 20 аминокиселини, туку само четири од нив. Ако, пак, генетскиот код е составен од комбинации од по две букви, тогаш би можел да кодира само 16 аминокиселини ( $4 \times 4 = 16$ ), што повторно не е доволно за сите дваесет. Но, со по три бази може да се добијат 64 комбинации ( $4 \times 4 \times 4 = 64$ ), што е повеќе од доволно за кодирање на сите 20 аминокиселини. Оттаму, уште пред експериментално да се докаже, теоретските пресметки сугерирале дека генетскиот код е составен од комбинации составени од по три бази (триплети).

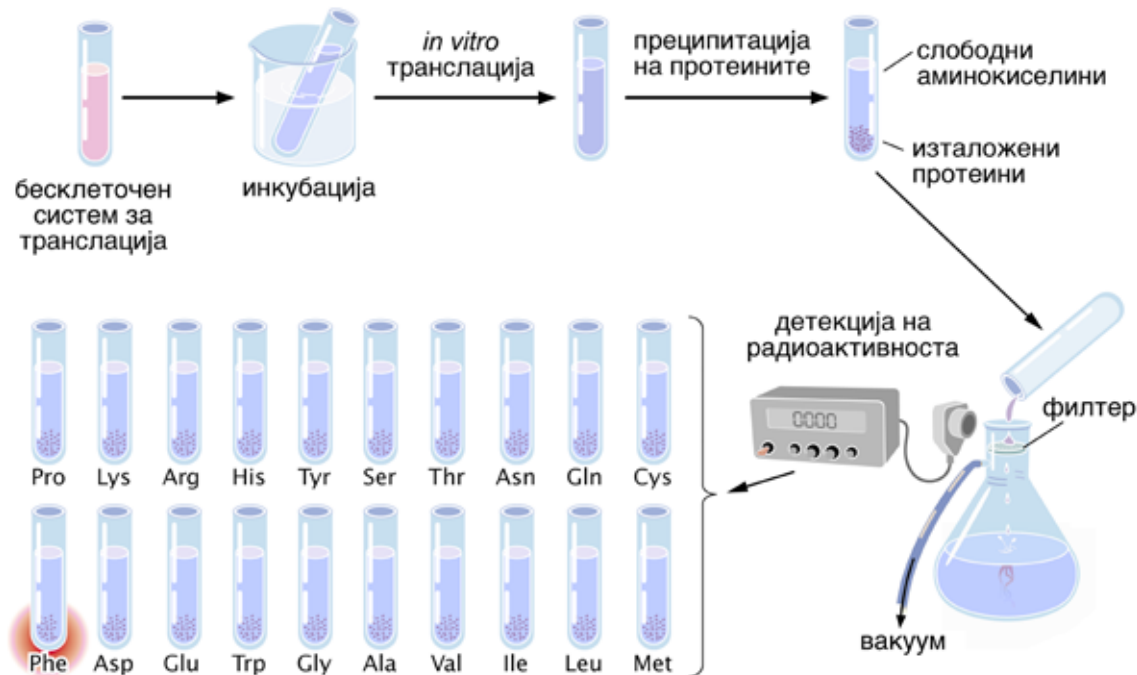
Користејќи експериментален систем во кој се следеле ефектите од генските мутации кај бактериофазите, Крик и неговите соработници во 1961 година покажале дека генетскиот код содржи 64 кодони составени од по три бази.

Сепак, значењето на генетскиот код го расветлиле тимот на научници предводени од Ниренберг и Матеи (Marshall Nirenberg и Heinrich Matthaei) во раните шеесетти години на минатиот век. Тие го дешифрирале генетскиот код користејќи и вештачки синтетизирани едноверижни mRNA-молекули, наместо комплексните природни mRNA. Во овие експерименти биле синтетизирани полинуклеотиди (вештачки mRNA-молекули) составени само од по еден рибонуклеотид, каква што е, на пример, полиурацилната низа (поли-U) (слика 10-1, А). Потоа бил користен *in vitro* систем за транслација, направен од клеточен екстракт во кој била уништена целокупната DNA со ензимска дигестија со деоксирибонуклеаза. Рибозомите, ензимите и преостанатите компоненти кои се неопходни за транслација се сочувани во ваквиот

### А синтеза на полинуклеотиди



### Б транслација и идентификација на кодираната аминокиселина



**Слика 10-1:** Експериментот на Ниренберг и Матеи. **А:** ензимска синтеза на полиурацилни RNA-молекули. **Б:** користење на систем за транслација без клетки. Кратенките за аминокиселините се дадени во главата 6: Протеини, како и во Прилозите.

екстракт. Покрај тоа, во секоја епрувета била додадена по една радиоактивно обележана аминокиселина, како и преостанатите 19 нерадиоактивни аминокиселини. Биле користени 20 реакции - по една за секоја аминокиселина (слика 10-1, Б). По внесувањето на синтетизираната RNA, епруветите биле инкубирани на 37°C за да се изврши транслацијата. Потоа, протеините биле преципитирани од секоја епрувета, талогот бил собран на филтер и била мерена радиоактивноста која потекнувала од обележаните аминокиселини. Епруветата во која е идентифицирана радиоактивноста го содржела протеинот составен од аминокиселината кодирана од синтетизираната RNA. Во овој пример, со транслацијата се синтетизирал полипептид граден од повторувања на само една аминокиселина: фенилаланин (Phe).

Заклучокот бил дека UUU претставува кодниот збор во mRNA, т.е. кодон за фенилаланин. Ниренберг и Матеи подоцна откриле дека кодотот CCC го кодира пролинот, а AAA лизинот. Значењето на кодоните: UUU, CCC и AAA е откриено релативно лесно (табела 10-1).

Табела 10-1: Експериментално откривање на синтаксата на кодоните		
синтетизирана RNA	аминокиселинска секвенца	заклучок
UUUUUUUUUUUUUUUUUUUU	Phe-Phe-Phe-Phe-Phe-Phe	UUU = Phe
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys	AAA = Lys
GGGGGGGGGGGGGGGGGGG	Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly	GGG = Gly
CCCCCCCCCCCCCCCCCC	Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-Pro	CCC = Pro
AUAUAUAUAUAUAUAUAU	Ile-Tyr-Ile-Tyr-Ile-Tyr	AUA = Ile или Tyr UAU = Ile или Tyr
UUUAUAUUUAUAUUUAUA	Phe-Ile-Phe-Ile-Phe-Ile	AUA = Ile UAU = Tyr

За преостанатите кодони биле применети поинакви и покомплицирани пристапи со експерименти и комбинаторика, по што целосно е дешифриран генетскиот код.

## 10.2 Концепт за генетскиот код

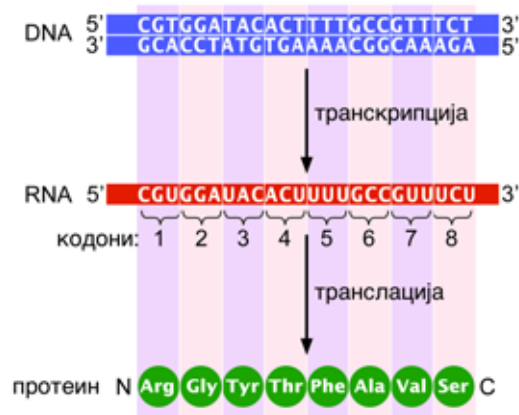
Генетскиот код специфицира која аминокиселина ќе се вгради во полипептидот при неговата синтеза во рибозомите. **Триплетот** е составен од три последователни нуклеотиди (или бази) и се нарекува **кодон**. Посликовито, генетските информации кои се препишани од гените од DNA-молекулите во mRNA-гласниците содржат „зборови“ од по три букви и секоја таков збор ја определува соодветната аминокиселина во полипептидната верига. Но, во споредба со јазикот со кој говориме, генетскиот код нема празни места меѓу „зборовите“ (кодоните) ниту какви било други знаци, освен стоп-кодоните, кои можат да се споредат со точки со кои завршува секоја реченица.

Генетскиот код е прикажан на **табелата 10-2**.

Табела 10-2: Генетски код						
вџора ѓозиџа						
	U	C	A	G		
ѓ р в а	U	UUU Phe	UCU Ser	UAU Tyr	UGU Cys	U
		UUC Phe	UCC Ser	UAC Tyr	UGC Cys	C
		UUA Leu	UCA Ser	UAA Stop	UGA Stop	A
		UUG Leu	UCG Ser	UAG Stop	UGG Trp	G
ѓ о з и џ а	C	CUU Leu	CCU Pro	CAU His	CGU His	U
		CUC Leu	CCC Pro	CAC His	CGC His	C
		CUA Leu	CCA Pro	CAA Gln	CGA Pro	A
		CUG Leu	CCG Pro	CAG Gln	CGG Pro	G
ѓ о з и џ а	A	AUU Ile	ACU Thr	AAU Asn	AGU Ser	U
		AUC Ile	ACC Thr	AAC Asn	AGC Ser	C
		AUA Ile	ACA Thr	AAA Lys	AGA Arg	A
		AUG Met	ACG Thr	AAG Lys	AGG Arg	G
ѓ о з и џ а	G	GUU Val	GCU Ala	GAU Asp	GGU Gly	U
		GUC Val	GCC Ala	GAC Asp	GGC Gly	C
		GUA Val	GCA Ala	GAA Glu	GGA Gly	A
		GUG Val	GCG Ala	GAG Glu	GGG Gly	G

**Напомена:** Кратенките за аминокиселините се дадени во главата 6: Протеини.

Како што се гледа од табелата, има повеќе кодони отколку што е неопходно за кодирање на сите 20 аминокиселини. Покрај тоа, видливо е дека **стартниот кодон** AUG (за започнување на транслацијата во рибозомот), е истовремено и кодон за аминокиселината метионин. Три од кодоните (UAG, UGA и UAA) се наречени **стоп** или **терминациски кодони** и се сигнали за прекин (терминација) на транслацијата. За нив



**Слика 10-2:** Колинеарност на информациите меѓу DNA, mRNA и протеините.

се користи и изразот **бесмислени кодони** (англ. *nonsense*), поради тоа што ниту еден tRNA молекул нема анти-кодон кој е комплементарен со нив, па, таквите кодони се бесмислени и ја терминираат транслацијата. Секој кодон е комплементарен со соодветниот триплет од DNA-молекулот, од кој е транскрибирана. Оттаму, генетскиот код определува **колинеарност** меѓу кодоните во DNA и аминокиселинските остатоци во кодираниот полипептид, а со тоа овозможува пренос на информациите од DNA, преку mRNA, па, сè до протеинските продукти на соодветниот ген (слика 10-2).

## Генетскиот код е повторлив, но, недвосмислен

Освен старт и стоп кодоните, преостанатите 60 кодони се и повеќе од доволни за кодирање на преостанатите 19 аминокиселини (освен метионинот). Оттаму произлегува дека кодоните се повторуваат, односно една аминокиселина може да биде кодирана од повеќе од еден кодон. Овој феномен се нарекува **повторливост** или **редунданција**. Сепак, редундантноста не е подеднакво застапена меѓу кодоните за сите аминокиселини. На пример, метионинот и триптофанот се кодирани само со по еден кодон, а леуцинот е кодиран со дури шест различни кодони. Синонимните кодони се прикажани на **табелата 10-3**.

Табела 10-3: Аминокиселини и кодоните кои ги кодираат			
амино-киселина	кодони	амино-киселина	Кодони
<b>Ala</b>	GCU, GCC, GCA, GCG	<b>Leu</b>	UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, CUG
<b>Arg</b>	CGU, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG	<b>Lys</b>	AAA, AAG
<b>Asn</b>	AAU, AAC	<b>Met</b>	AUG
<b>Asp</b>	GAU, GAC	<b>Phe</b>	UUU, UUC
<b>Cys</b>	UGU, UGC	<b>Pro</b>	CCU, CCC, CCA, CCG
<b>Gln</b>	CAA, CAG	<b>Ser</b>	UCU, UCC, UCA, UCG, AGU, AGC
<b>Glu</b>	GAA, GAG	<b>Thr</b>	ACU, ACC, ACA, ACG
<b>Gly</b>	GGU, GGC, GGA, GGG	<b>Trp</b>	UGG
<b>His</b>	CAU, CAC	<b>Tyr</b>	UAU, UAC
<b>Ile</b>	AUU, AUC, AUA	<b>Val</b>	GUU, GUC, GUA, GUG
<b>START</b>	AUG	<b>STOP</b>	UAG, UGA, UAA

Треба да се има во предвид дека и покрај редундантноста, кодот е **недвосмислен**, односно еден ист кодон не може да кодира две или повеќе аминокиселини. Во спротивно би се случувале сериозни грешки при синтезата на полипептидите.

## Генетскиот код е речиси универзален

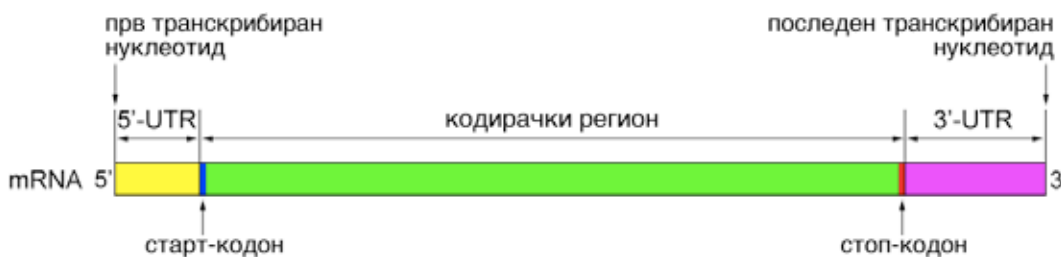
Повеќегодишните истражувања врз голем број најразновидни организми покажале дека генетскиот код е речиси универзален, односно дека еден ист кодон специфицира иста аминокиселина кај речиси сите живи суштества на планетава. Се претпоставува дека генетскиот код е прастар и се одржал речиси неизменет низ целата еволуција. Сепак се познати и исклучоци: генетскиот код во митохондриите и хлоропластите покажува многу мали разлики во однос на тој кај прокариотите и од хромозомската DNA на еукариотите. Кај определена група на прокариоти, триплетите UAA и UAG кодираат глутамин наместо да функционираат како стоп кодони (**табела 10-4**).





Од овој пример е очигледно дека изборот на почетниот кодон ја определува и рамката на читање, а со тоа и на аминокиселинската секвенца на протеинскиот продукт при транслацијата.

На секој mRNA-молекул може да се идентифицира барем една рамка на читање, која обично започнува на почетниот регион од неговиот 5'-крај. Но, важно е да се има предвид дека старт-кодонтот не е лоциран на самиот почеток од mRNA-молекулот. Имено, регионот од 5'-крајот на mRNA (кој е препишан од почетниот транскрипциски нуклеотид: +1), па, сè до стартниот кодон (AUG) се означува како **5'-непреводлив регион (5'-UTR, од англ. 5'-untranslated region)**, а некаде во литературата и како **водечки (англ. leader) регион (слика 10-3)**. Иако самиот не се преведува во mRNA, се смета дека содржи секвенци кои имаат влијание врз стабилноста на mRNA-молекулот и врз ефективноста на транслацијата. Спротивниот, 3'-крај од mRNA кој е транскрибиран, но, не содржи кодони за транслација се протега од стоп-кодонтот па сè до последниот транскрибиран нуклеотид. Овој регион се означува како **3'-непреводлив регион (3'-UTR, од англ. 3'-untranslated region)**, а поретко и како **регион-приколка (англ. trailer)**. Важно е што покрај можните влијанија врз стабилноста на mRNA и врз ефективноста на транслацијата, овој регион ја содржи и секвенцата која служи како сигнал за полиаденилација.



**Слика 10-3:** Непреводливи региони во mRNA-молекулот. Кратенките: 5'-UTR и 3'-UTR се објаснети во текстот.

## 10.4 Транспортната RNA како носач на специфични аминокиселини

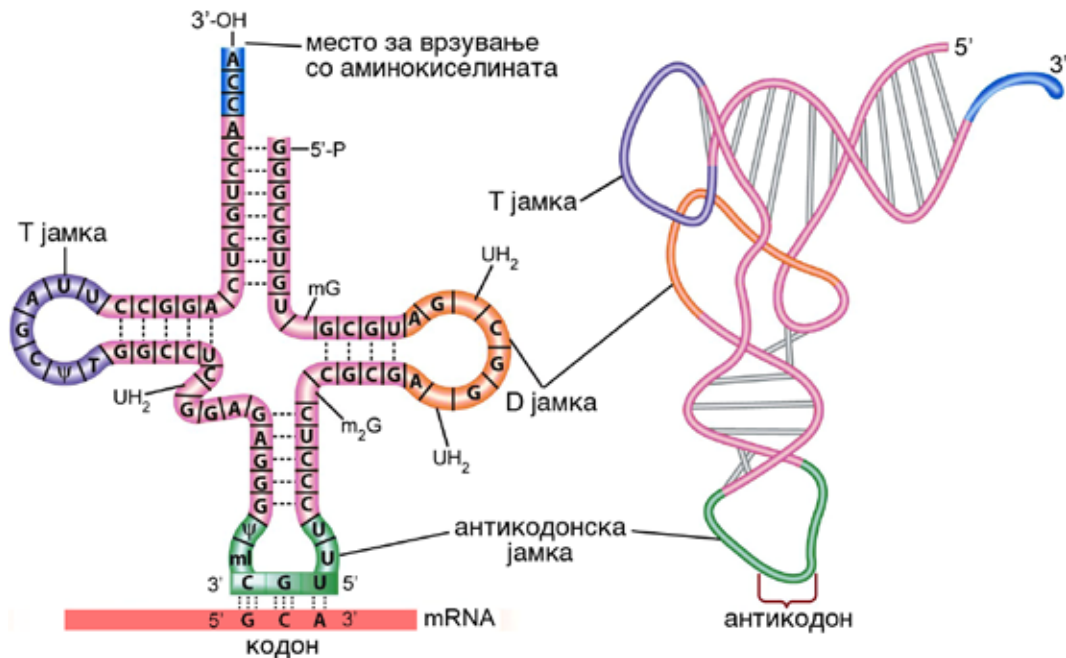
Според Вотсон-Криковата догма за трансферот на генетските информации, при транслацијата на mRNA во протеини, потребен е адаптер - специфичен tRNA-молекул кој ја пренесува информацијата од кодонтите на mRNA до специфичните аминокиселини. Постои најмалку по еден вид tRNA-молекули за секоја од дваесетте аминокиселини. tRNA-молекулот врши три основни функции: ја пренесува аминокиселината, го препознава, а потоа и се врзува со кодонтот во mRNA молекулот во рибозомот. За синтетизирање на протеинскиот продукт според информациите од специфичниот mRNA-молекул, неопходно е антикодонтот од транспортниот RNA-молекул точно да го препознае соодветниот кодонт од mRNA и мора да ја носи точната аминокиселина.

Конформацијата на tRNA-молекулот овозможува негово специфично врзување со рибозомите. На 3'-крајот од секој tRNA-молекул се наоѓа регион со кој

ковалентно се врзува специфичната аминокиселина. Приближно на средината од tRNA-молекулот се наоѓа триплет на бази наречен **антикодон** кој комплементарно се врзува со кодонот од mRNA со помош на водородни врски. Секој тип на tRNA-молекули има уникатен антикодон кој е комплементарен со кодонот од mRNA за таа tRNA натоварена со аминокиселина, а кодонот и антикодонот се антипаралелни еден на друг при воспоставување на контактот. На пример, кодот за аргинин во урнек DNA-веригата е 3`-GCC-5`, истиот се транскрибира во mRNA-кодон 5`-CGG-3`, а потоа mRNA-кодонот се врзува со антикодонот 3`-GCC-5` од tRNA-молекулот која го носи аргининот.

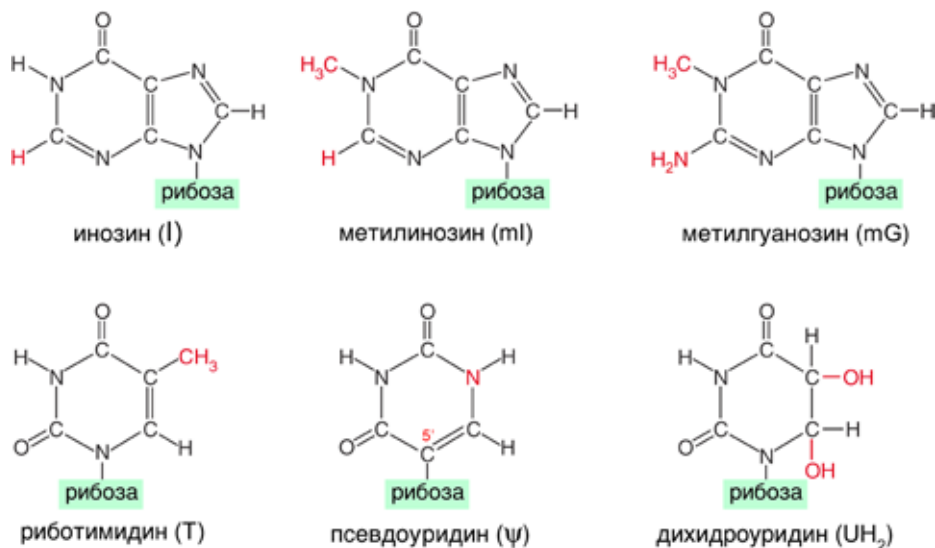
## 10.5 Структура на tRNA молекулите

Молекулот на tRNA содржи околу 75 - 80 нуклеотиди, а секундарната структура се создава со интрамолекуларни водородни врски, односно со комплементарно спарување меѓу базите во самиот молекул (**слика 10-4**).



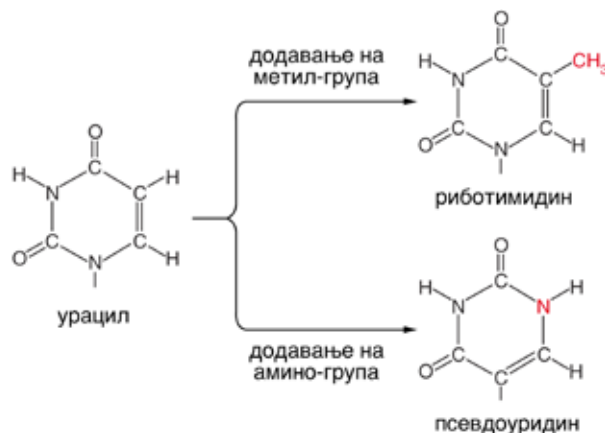
**Слика 10-4:** Структура на tRNA-молекулот. **А:** примарна и секундарна структура. Обележани се водородните врски кои ја формираат карактеристичната форма на делтина со три листа (јамки). Означени се и карактеристичните модифицирани бази: ψ-псевдоуридин, **mG**-метилгуанозин, **m<sub>2</sub>G**-диметилгуанозин, мл-метилизин и **UH<sub>2</sub>**-дихидроуридин. **Б:** Тридимензионален модел на tRNA молекулот.

Во примарната структура на овој молекул учествуваат и посебни, модифицирани нуклеотиди: псевдоуридин, метилгуанозин, диметилгуанозин, метилинозин и дихидроуридин (**слика 10-5**).



**Слика 10-5:** Структурни формули на некои од модифицираните рибонуклеозиди во молекулите на tRNA. Функционалните групи по кои се разликуваат од вообичаените бази се означени црвено. Инозинот е всушност нуклеозид од базата хипоксантин, ковалентно врзана со рибоза. Ова често доведува до конфузија при користење на изразите: инозин и хипоксантин. Интересно е што псевдоуридинот е поврзан со рибозата преку C-5 атомот, наместо преку N-1, како што е вообичаено за пиримидинските бази.

Ваквите модифицирани рибонуклеотиди настануваат преку хемиски реакции катализирани со специфични tRNA-модифицирачки ензими. На пример, со метилирање на урацилот се создава риботимин (слика 10-6).



**Слика 10-6:** Пример за ензимска конверзија на вообичаениот рибонуклеотид урацил во модифицираните база риботимидин или во псевдоуридин, кои учествуваат во градбата на tRNA-молекулите.

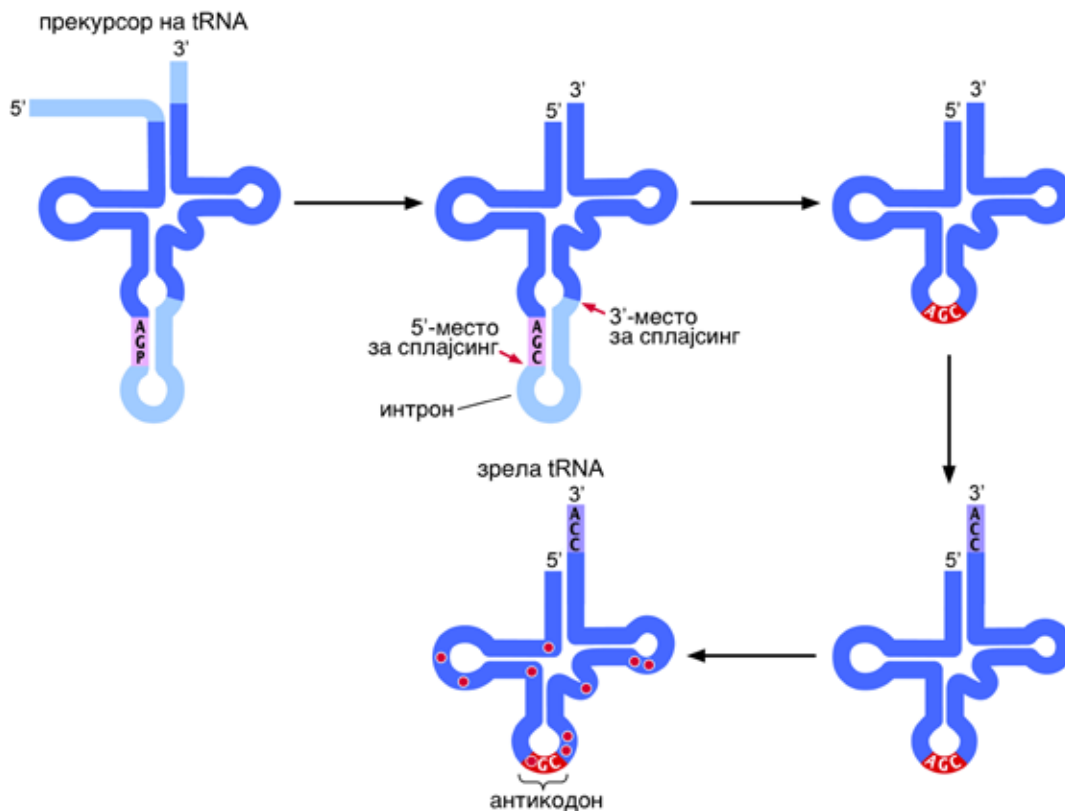
## 10.6 Транскрипција и процесирање на tRNA-молекулите

Транспортните RNA-молекули се создаваат со транскрипција од соодветните гени, со што и се пример за крајни генски продукти од гените кои не кодираат протеини. Кај *E. coli*, гените за неколку различни tRNA одеднаш се транскрибираат како единствен долга прекурзорен транскрипт од кој со пресекување, се создаваат

повеќе единечни tRNA-молекули. Сепак, постојат повеќе исклучоци: некои tRNA се кодирани од поединечни гени, додека други се вклучени во транскриптот од гените за рибозомските RNA-молекули. 5'-крајот од tRNA прекурзорот кај бактериите се отсекува со **рибонуклеазата P**. Интересно е што овој ензим содржи и протеинска и RNA-компонента и дека токму последнава е каталитично активна и е уште еден пример за рибозим.

Слично е и кај еукариотските клетки, но, кај нив постојат многу повеќе варијации од еден до друг организам, како и од еден до друг тип на tRNA-молекул. Процесирањето на прекурзорната tRNA се одвива низ повеќе реакции: отсекување на нефункционалните региони, додавање на рибонуклеотиди, како и ензимско модифицирање на некои од постојните (**слика 10-7**).

Доколку се присутни, интроните се отсекуваат со преспојување (сплајсинг), но, со многу поразличен механизам отколку претходно опишаниот спајсинг кај mRNA-транскриптите. Кај прекурзорните tRNA молекули, 5'- и 3'-местата за спајсинг се препознаваат од страна на специфични ендонуклеази кои го отсекуваат линеарниот интрон, а потоа се лигираат двата слободни краја од tRNA-молекулот.

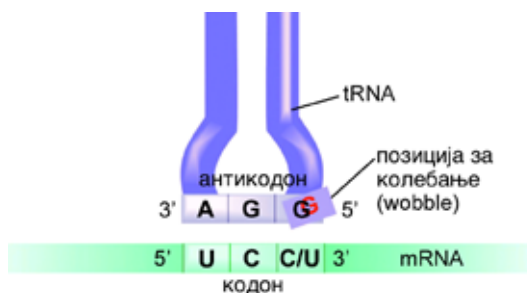


**Слика 10-7:** Процесирање на прекурзорната tRNA во зрел tRNA-молекул. Поголем број единечни незрели tRNA-молекули се отсекуваат од прекурзорниот молекул. Интронот се отсекува со рибонуклеази кои го препознаваат 5'- и 3'-местото за спајсинг. Процесирањето продолжува со додавање на неколку рибонуклеотиди на 3'-крајот, како и со ензимско модифицирање на постојните. Модифицираните рибонуклеотиди се означени со црвени точки.

## 10.7 Феномен на колебање

Специфичноста за третата база од кодонот не е секогаш критична. Овој феномен е познат како **колебање** (англ. *wobble*) и е претпоставен од страна на Крик уште во 1966 година. Според оваа хипотеза, препознавањето е критично важно само меѓу третата позиција на кодонот од mRNA и првата позиција од антикодонот на tRNA. На пример, гуанинскиот остаток на третата позиција (5'-крајот) од антикодонот од tRNA може да се спари и со С и со U во третата позиција (3'-крајот) на кодонот (слика 10-8).

**Слика 10-8:** Пример на колебање при воспоставувањето на водородни врски меѓу антикодонот од tRNA и кодонот од mRNA-молекулите. Шематски се прикажана само мали делови од двете молекули.



Досега се утврдени повеќе примери за колебање меѓу третата позиција на кодонот и првата позиција од антикодонот (табела 10-5).

**Табела 10-5: Колебање меѓу еден нуклеотид од кодонот и антикодонот**

трет нуклеотид во кодонот (3'-крај)	прв нуклеотид во антикодонот (5'-крај)
U	A
G	C
C или U	G
A или G	U
A или C или U	I

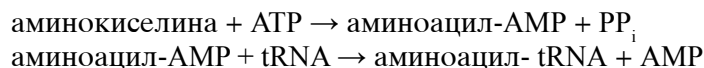
Колебањето е дозволено само во некои случаи, но, најважно е што и тогаш не предизвикува двосмисленост на генетскиот код, што спречува погрешно препознавање меѓу кодонот и антикодонот.

## 10.8 Поврзување на аминокиселините со tRNA

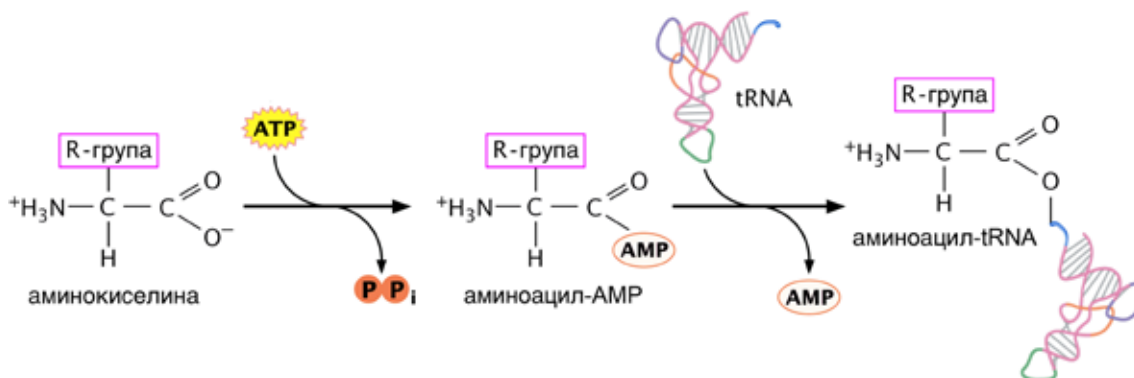
Поврзувањето на секоја tRNA со соодветната аминокиселина се постигнува со група на специфични ензими познати како **аминоацил-tRNA-синтетази**. Секој ензим е специфичен за една аминокиселина и за соодветната tRNA. Ензимот има три активни региони со кои препознава три помали молекули: специфичната аминокиселина, АТФ и специфичната tRNA. Специфичниот ензим реагира со tRNA и со аминокиселината во два чекори. Во првиот, ензимот врши „активација“ на аминокиселината со аденозин трифосфат, при што се создава аминокиселин аденилат. Во вто-



риот чекор, ензимот ковалентно го врзува аминоксил аденилатот со соодветната tRNA преку реакција на естерификација. Овие два чекора можат да се претстават на следниот начин:



На крајот од реакцијата, аминокиселината е поврзана со 3'-крајот од tRNA (со слободна хидроксилна група од рибозата) со енергетски богата врска. Со тоа се создава tRNA „натоварена“ со аминокиселина и се нарекува **аминоцил-tRNA** (слика 10-9). Енергетски богатата хемиска врска подоцна обезбедува енергија за образување на пептидна врска со претходната аминокиселина.



**Слика 10-9:**Ковалентното врзување на аминокиселината со соодветниот tRNA-молекул се одвива низ двостепена реакција.

## 10.9 Препознавање на mRNA-кодот - експериментот на Бенцер

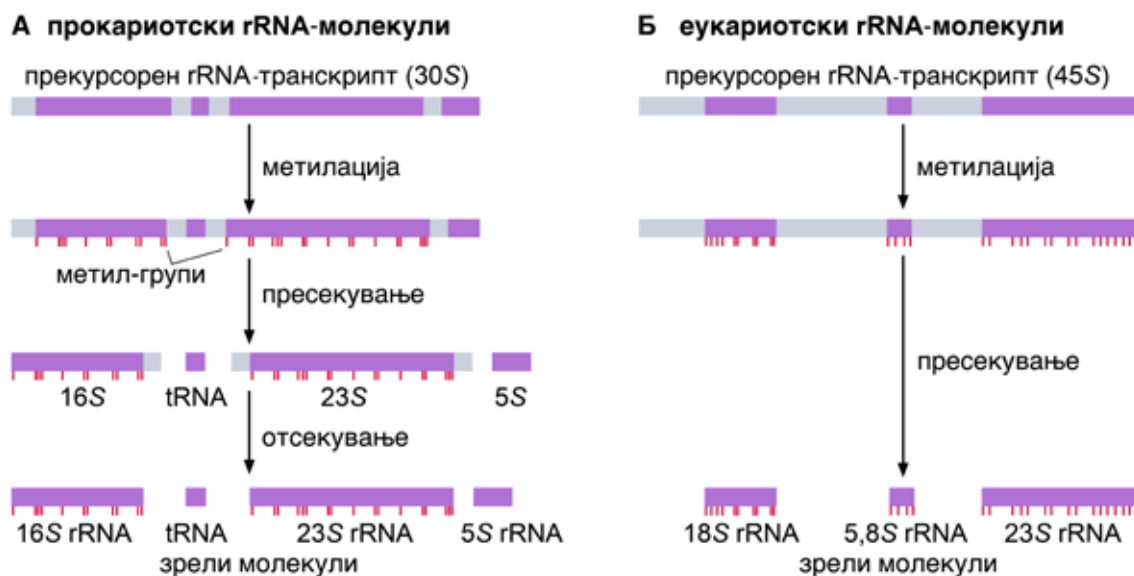
Важноста на специфичното поврзување на tRNA со соодветната аминокиселина било докажано со извонредно важен и интересен експеримент кој бил изведен од Бенцер (Seymour Benzer) со соработниците од Калифорнискиот технолошки институт. Во експериментот била користена tRNA специфична за цистеин, но, наместо со оваа аминокиселина, натоварена со аланин, што било намерно направено со посебна хемиска трансформација. Екипата на Сејмур се обидуваа да утврди дали во *in vitro* систем за синтеза на протеини, кај оваа хибридна tRNA ќе биде препознаена погрешната натоварена аминокиселина или, пак, точната tRNA (со антикодон специфичен за цистеин). Доколку системот за синтеза на протеини би ја препознал аминокиселината, тогаш тоа би значело дека го препознава аланинот. Наспроти тоа, експериментот покажал дека на местата во синтетизираниот протеин, каде требало да биде аминокиселината цистеин, се појавил аланинот. Цистеин-специфичната tRNA го транспортирала нејзиниот товар (аланинот) во рибозомот и го вметнала во полипептидната верига чија синтеза е во тек според секој mRNA-кодон специфичен за цистеин.

Со овој експеримент се докажало дека механизмот за синтезата на протеини вклучува препознавање на антикодонот на tRNA, а не на самата аминокиселината поврзана со неа. Оттаму е критично важно аминоксил-tRNA-синтезите да ги повр-

зуваат tRNA-молекулите со точно определените аминокиселини, со што се спречува синтеза на мутантни протеини.

## 10.10 Транскрипција и процесирање на rRNA-молекулите

Трите рибозомски RNA-молекули кај бактериите се транскрибираат споено со што настанува долг прекурзорен молекул. Овој rRNA-транскрипт ензимски се метилира преку ковалентно врзување на метил-групи (-CH<sub>3</sub>) со 2'-јаглеродниот атом од рибозата кај некои рибонуклеотиди. Овој прекурзор се пресекува со посебни рибонуклеази (III, *P* и *F*) со што се создаваат интермедиерни молекули. Понатаму, краевите од овие молекули се отсекуваат со егзонуклеази, со што настануваат зрелите рибозомски молекули (23S, 16S и 5S rRNA), како и една транспортна RNA (слика 10-10, А).



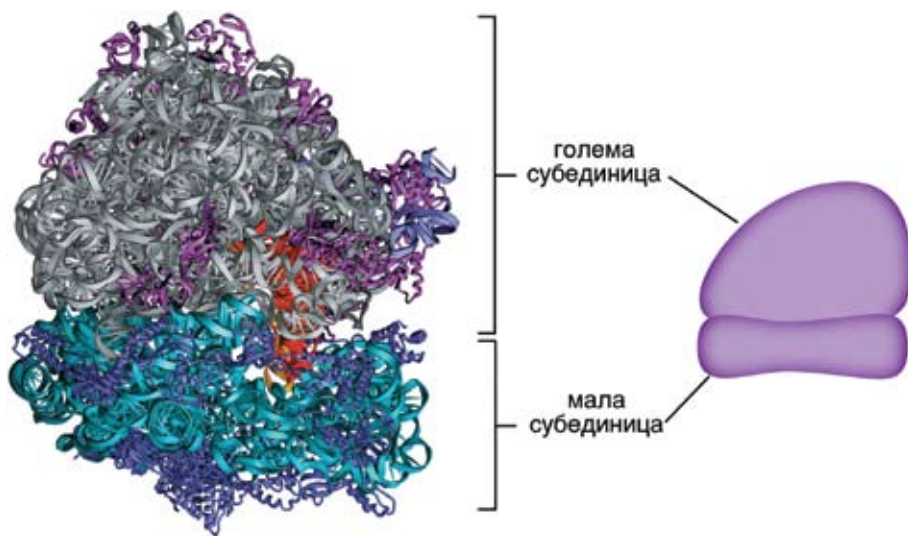
**Слика 10-10:** Процесирање на прекурзорите на rRNA-молекулите. **А:** кај прокариотите, прекурзорниот транскрипт најпрво екстензивно се метилира, а потоа се пресекува создавајќи и интермедиерни молекули. Понатаму, краевите од овие молекули се отсекуваат, со што настануваат зрели рибозомски и еден транспортен RNA-молекул. **Б:** процесирањето е слично и кај еукариотските организми, освен што не се отсекуваат краевите на интермедиерните молекули. Метил-групите се прикажани како вертикални црвени цртчики.

Процесот е сличен и кај еукариотските клетки, при што настануваат трите рибозомски RNA-молекули (28S, 18S и 5,8S rRNA) (слика 10-10, Б). Четвртиот, најмал rRNA-молекул (5S) е кодиран од сосем различен ген и, по транскрипцијата, не подлежи на процесирање.

### 10.11 Рибозомите како транслациска машинерија

Молекулите на mRNA делуваат како гласници кои ги пренесуваат информациите за синтеза на протеини до рибозомите, т.е. до клеточните органели каде што се одвива транслацијата. Рибозомите се мултимолекуларни комплекси составени од голем број протеини и од рибозомски RNA-молекули. Нивната важност за клетката може да се претстави со фактот што учествуваат со дури до 25% од клеточната маса кај бактериите *E. coli* при фазата на нивниот брз раст.







Структурата на рибозомите е слична и кај прокариотските и кај еукариотските клетки. Всушност, во експериментални услови, еукариотските рибозоми можат да вршат транслација на изолираните бактериски mRNA-молекули. Сепак, еукариотските рибозоми, особено тие кај цицачите, се посложени и содржат поголем број протеински молекули. Рибозомот се состои од две структури со нееднаква големина означени како **голема** и **мала субединица**. Рибозомските RNA-молекули, како и протеините, заземаат карактеристична секундарна и терциерна структура, што е критично важно за целосната тридимензионална структура и за функцијата на рибозомот (слика 10-11).



**Слика 10-11:** Структура на рибозомите. **A:** компјутерски модел на асемблираниот (целосен) 70S рибозом од бактеријата *Thermus thermophilus* според податоците од Рендгенската дифракција на кристалната структура. **B:** еден од можните шематски прикази на комплетен рибозом.

Секоја од рибозомските субединици е составена од различен тип и број на молекули на рибозомска RNA и протеини, кои се разликуваат меѓу прокариотите и еукариотите (**табела 10-6**).

Табела 10-6: Структура на рибозомите

	прокариотски ( <i>E. coli</i> )		еукариотски (цицачи)	
<b>целосен рибозом</b>	 70S		 80S	
<b>рибозомски субединици</b>	 50S	 30S	 60S	 40S
	голема	мала	голема	мала
<b>rRNA-молекули</b>	23S RNA и 5S RNA	16S RNA	28S + 5,8S RNA и 5S RNA	18S RNA
<b>протеини</b>	31 протеин	21 протеин	49 протеини	33 протеини

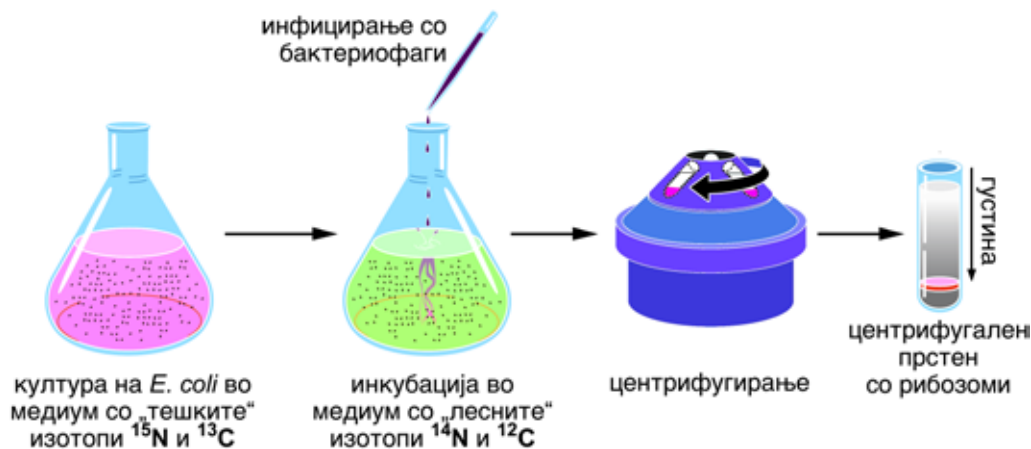
Кај прокариотите (конкретно кај *E. coli*), големата рибозомска субединица има вредност 50S, додека малата 30S. Споени во целосен рибозом имаат вредност 70S, од причини кои се објаснети претходно. Рибозомите и нивните субединици кај еукариотските клетки варираат во нешто поширок опсег на вредности. Нивните вредности донекаде се разликуваат кај квасните габи, кај вишите растенија, кај митохондриите, кај хлоропластите и кај анималните организми.

Протеините и rRNA-молекулите во рибозомските субединици меѓусебно се поврзани со јонски и хидрофобни врски, а не со ковалентни. Ако овие врски се раскинат со определени реагенси (некои детергенти, на пример), протеините и rRNA-молекулите се раздвојуваат едни од други. Со отстранување на детергентот, целата сложена структура се повторна самата се склопува (се самоасемблира).

Една од основните улоги на рибозомите е да обезбедат прецизна интеракција меѓу mRNA и tRNA-молекулите, односно врзување на точниот антикодон од tRNA со соодветниот кодон од mRNA. Притоа, се создаваат водородни врски меѓу комплементарните базни парови кои не се доволно силни да ги задржат подолго tRNA-молекулите. rRNA од малата рибозомска субединица има улога во потврдување на совпаѓањето на трите базни пара од антикодонот со mRNA-кодонот. Ако водородните врски не се формираат меѓу сите три базни пара, тогаш таа tRNA не е соодветната за дадениот mRNA-кодон, па, истата се исфрла од рибозомот.

## Експериментот на Бренер, Жакоб и Мезелсон

Во 1961 година, Бренер (Sydney Brenner), Жакоб (François Jacob) и Мезелсон (Matthew Meselson) објавиле експериментален доказ дека рибозомите не чуваат генетски информации и само ја извршуваат транслацијата (слика 10-12).



**Слика 10-12:** Шематски приказ на експериментот на Бренер, Жакоб и Мезелсон.

Имено, тие култивирале *E. coli* во хранлив медиум кој содржел соединенија со „тешките“ изотопи  $^{15}\text{N}$  и  $^{13}\text{C}$  и тоа во текот на неколку генерации, сè додека сите рибозоми во клетката не станале обележани со овие радиоактивни маркери. Потоа, бактериите биле пренесени во медиум кој ги содржел со „лесните“ изотопи  $^{14}\text{N}$  и  $^{12}\text{C}$  и биле инфицирани со бактериофаг.

Откога почнале да се размножуваат вирусите, рибозомите се издвојувани преку центрифугирање во градиент на густина. Мерењата покажале дека биле присутни само „старите“ рибозоми со изотопите  $^{15}\text{N}$  и  $^{13}\text{C}$ .

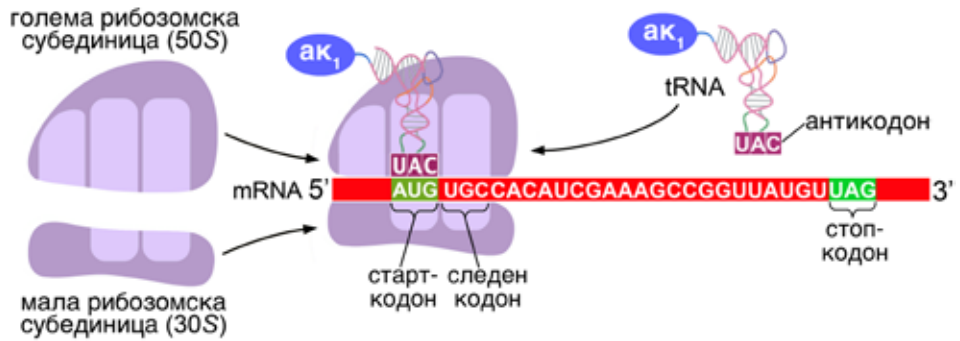
Од овој експеримент произлегол заклучокот дека рибозомите се создаваат пред да започне транслацијата и немаат генетски информации за синтезата на полипептидите.

## Транслацијата е полипептидна синтеза според RNA-урнек

Како и транскрипцијата, и процесот на транслација се одвива во три фази: **иницијација**, **елонгација** и **терминација**. Рибозомите не се ограничени да синтетизираат само определен специфичен протеин. Имено, секој рибозом може да врши транслација со која било mRNA, па, според тоа можат да се синтетизираат различни полипептиди. Важно е да се има предвид дека молекулот на mRNA ја кодира полипептидната секвенца, додека рибозомот претставува само молекуларна работилница каде што се извршува синтезата.

Општиот и поедноставен преглед на трите фази на транслацијата е прикажан на **сликата 10-13**.

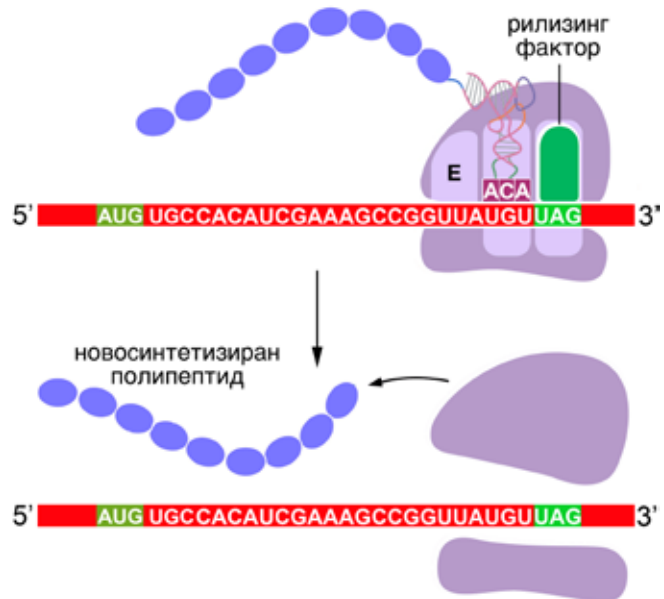
**А иницијација**



**Б елонгација**



**В терминација**



**Слика 10-13:** Општ и поедноставен преглед на трите основни фази на транслацијата во прокариотските клетки.

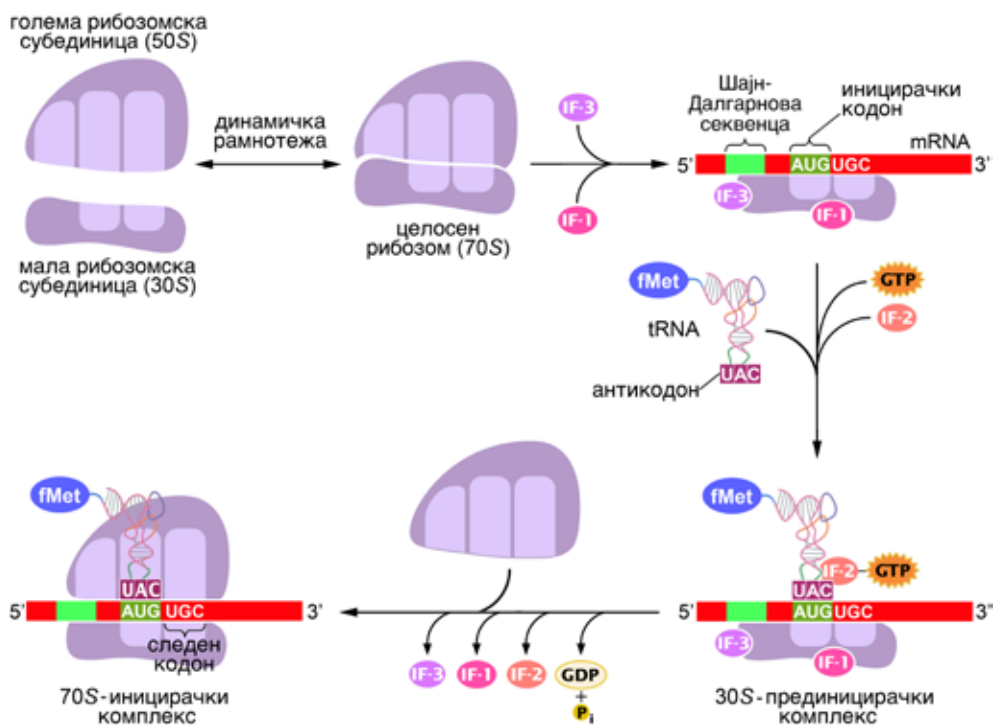


## 10.12 Иницирање на транслацијата

Транслацијата на mRNA започнува со учество на следниве компоненти: **малата рибозомска субединица, mRNA молекулот, иницирачката tRNA, иницирачките фактори, големата рибозомска субединица, GTP и магнезиумови јони ( $Mg_2^+$ )**. Имено, иницирачката tRNA кај прокариотите е натоварена со хемиски модифицираната аминокиселина *N*-формилметионин, додека кај еукариотите со неа е врзан вообичаената аминокиселина метионин. Поради тоа, првиот аминокиселински остаток од N-крајот од сите новосинтетизирани протеини е метионин (односно формилметионин кај бактериите), но, често пати оваа, па, и неколку последователни аминокиселински остатоци од N-крајот на протеинот ензимски се отстрануваат непосредно по транслацијата. Факторите на иницијација се посебна група протеини и кај *E. coli* се означени како: IF-1, IF-2 и IF-3. За иницирање на транслацијата неопходна е енергија која се обезбедува со хидролиза на GTP.

Во првиот чекор од иницирањето, малата рибозомска субединица (30 S) се врзува со два иницирачки фактори (IF-1 и IF-3), а потоа и со самиот mRNA-молекул. Имено, малата рибозомска субединица може да се врзе со mRNA-молекулот само ако е одвоена од големата субединица. Токму тоа го овозможува IF-3 протеинот, кој откога ќе се врзе со малата субединица, ја спречува да се поврзе со големата додека се одвива иницијацијата.

Во следниот чекор, иницирачката tRNA го препознава стартниот кодон (AUG) на самиот 5'-крај од mRNA-молекулот. Но, со оглед на тоа што кодоните за



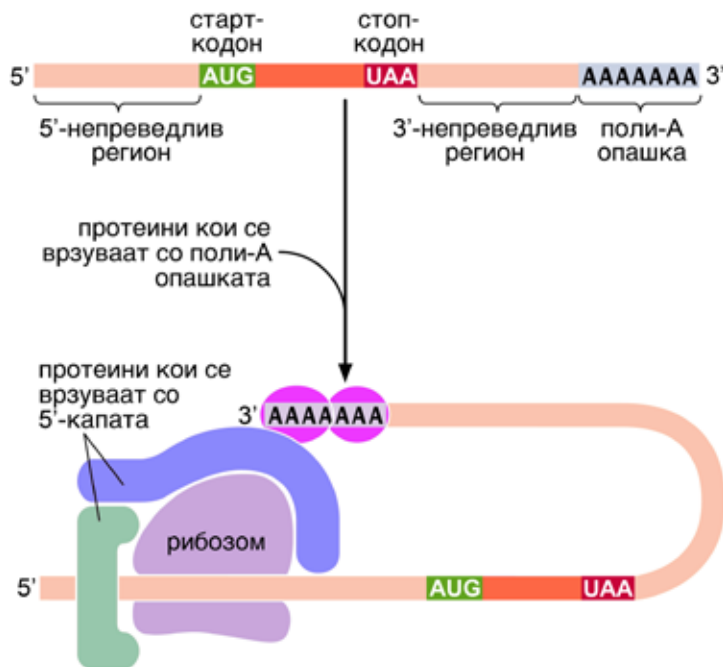
**Слика 10-14:** Шематски приказ на иницирањето на транслацијата кај прокариотите.

метионин можат да се најдат и низводно (во 3'-насока) од mRNA, неопходно е иницирачката tRNA и рибозомот да го препознаат токму стартниот кодон AUG (**слика 10-14**). За таа цел, малата рибозомска субединица препознава и се врзува со посебен регион од mRNA-молекулот означен како **место за врзување со рибозомот (RBS**, од англ. *ribosome binding site*). Кај бактериите, овој регион има консензусна секвенца (5'-AGGAGG-3') и се наоѓа неколку рибонуклеотиди спротиводно (кон 5'-крајот) во однос на старт кодонот, од кој започнува транслацијата и е наречена **Шајн-Далгарнова (Shine-Dalgarno)** или **S-D-секвенца**, според австралиските истражувачи Шајн и Далгарно (John Shine и Lynn Dalgarno) кои први ја идентифицирале споредувајќи повеќе вакви региони од различни mRNA-молекули.

Понатаму, антикодонот од иницирачката формилметионин-tRNA се врзува со стартниот кодон (AUG) од mRNA молекулот при што учествуваат протеините IF-2 и IF-1, а се користи енергијата од ослободена од хидролизата на GTP. Со тоа е создаден т.н. **30S-прединицирачки комплекс**. По одвојувањето на протеинот IF-3 од малата субединица се овозможува приклучување и на големата рибозомска субединица со што се создава целосниот **70S-иницирачки комплекс**.

Поради тоа што еукариотските mRNA-молекули немаат Шајн-Далгарнови секвенци, препознавањето на стартниот кодон се врши со скенирање по должината на mRNA-молекулот сè додека не се пронајде првиот AUG кодон веднаш по 5'-капата. Кај вишите еукариотски организми, особено кај вертебралните, mRNA-молекули имаат специфична секвенца составена од три пурински нуклеотиди лоцирани спротиводно (кон 5'-насока) од старт-кодонот, а еден гуанин следи по самиот старт-кодон. Тоа е секвенцата: 5'-RNN**AUG**G-3', каде R е пуринска база (аденин или гуанин), N е која било база, а стартниот кодон е прикажан со црвени букви. Во литературата, оваа низа е позната и како **Козакова секвенца** во чест на Козак (Marylin Kozak) која ја прва ја открила. Иако отсуствува кај многу mRNA-молекули, утврдено е дека и оваа секвенца го олеснува иницирањето на транслацијата. Но, за разлика од прокариотската Шајн-Далгарнова секвенца, Козаковата реагира со првата аминоксил-tRNA (специфична за метионин) и со тоа ја зголемува ефикасноста на врзувањето на целата mRNA со еукариотскиот рибозом.

Покрај тоа, за иницирањето на транслацијата кај еукариотите, неопходни се поголем број иницирачки фактори кои имаат дополнителни улоги во споредба со тие кај прокариотите. Некои од нив се потребни за препознавање и врзување со 7-метилгуанозинската капа на 5'-крајот од mRNA-молекулот од страна на малата рибозомска субединица. Поради поголемата должина на еукариотските mRNA-молекули, тие често создаваат секундарни структури кои можат да го попречат иницирањето на транслацијата, па, хеликазната активност на посебни иницирачки фактори ги раздвојува ваквите интрамолекуларни водородни врски. Во иницирачката фаза кај еукариотите, своја улога има и полиаденилатната опашка на mRNA-молекулот која ја препознаваат и со неа се врзуваат посебни протеини. Тие создаваат комплекси со други протеини кои се поврзани со 5'-капата на mRNA-молекулот со што го олеснуваат самото иницирање (**слика 10-15**).



**Слика 10-15:** Шематски приказ на иницирањето на транслацијата кај еукариотите.

### 10.13 Елонгација на полипептидната верига

Откога и големата рибозомска субединица е приклучена на иницирачкиот комплекс, започнува и втората фаза на транслацијата: елонгација. На големата субединица од рибозомот постојат три места или региони за кои се врзува соодветна tRNA и се означени како: **А-место** (аминокиселинско), **Р-место** (полипептидно) и **излезно** или **Е-место** (од англ. *exit* - излез). Само две tRNA-молекули можат да бидат истовремено навлезени во рибозомот: или во местата А и Р или во Р и Е.

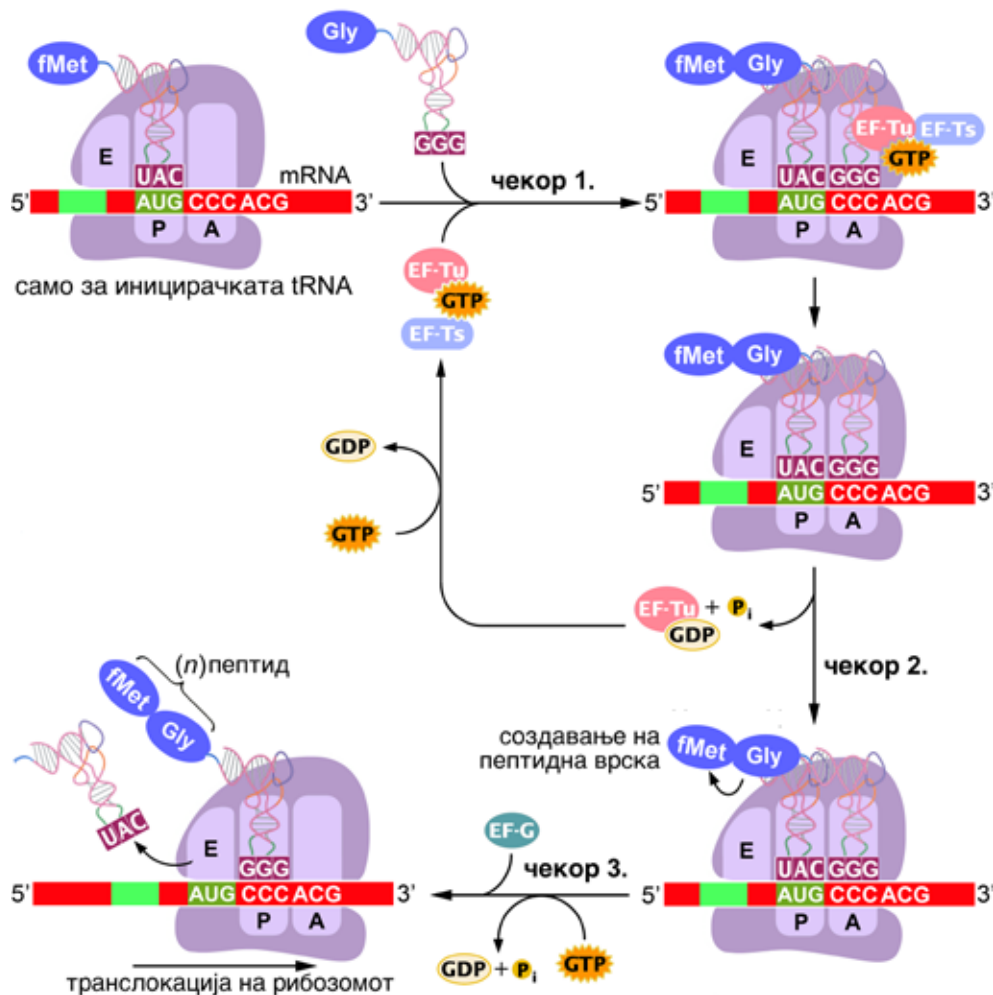
При претходната фаза на иницијација, иницирачката tRNA „натоварена“ со метионин (формилметионин кај бактериите) веќе го има заземено Р-местото, а А-местото е порамнето со вториот кодон во mRNA. Единствено оваа иницирачка tRNA може директно да навлезе во Р-местото, додека сите следни tRNA-молекули можат најпрво да навлезат единствено во А-местото на рибозомот. Елонгацијата на транслацијата се одвива низ три чекора.

Во текот на **првиот чекор** неопходно е учеството на два **елонгациски фактори**, протеините: **EF-Tu** и **EF-Ts**, како и на **GTP** кој обезбедува енергија. EF-Tu протеинот се врзува со GTP, а потоа и со следната аминоксил-tRNA, создавајќи т.н. троен комплекс кој навлегува во А-местото од рибозомот (**слика 10-16**). Доколку антикодонот од аминоксил-tRNA е комплементарен со кодонот од mRNA молекулот, хидролизата на GTP го ослободува EF-Tu-комплексот. Поедноставено, елонгацискиот фактор EF-Tu ја инсталира соодветната аминоксил-tRNA во А-местото од рибозомот, трошејќи ја енергијата обезбедена со хидролиза на GTP. Улогата на елонгацискиот фактор EF-Ts е да го обнови GTP на местото на GDP во EF-Tu-GDP комплексот.

**Вториот чекор** на елонгацијата е воспоставување на ковалентна пептидна врска меѓу двете аминокиселини кои се врзани со соодветните tRNA молекули нав-

лезени во Р- и во А-местото. Всушност, притоа се катализираат две реакции: првата е раскинување на врската меѓу аминоксил-tRNA која се наоѓа во Р-местото и врзаната аминокиселина, а втората е создавање пептидна врска меѓу таа аминокиселина и аминокиселината која е поврзана со tRNA во А-местото. Со тоа, втората аминокиселина сега е врзана со првата (метионинот).

Катализирајќи ги овие реакции, големата рибозомска субединица врши **пептидил-трансферазна активност**. Долго преовладувало мислењето дека оваа ензимска активност на рибозомот се должи на неговите протеински компоненти, како што е случај со најголем број ензими. Но, истражувањата на Нолер (Hary Noller) со соработниците на Калифорнискиот универзитет сугерирале дека каталитичната активност ја врши големата рибозомска субединица. Тие откриле дека и по отстранувањето



**Слика 10-16:** Елонгирање на транслацијата. Прикажан е само еден циклус во кој е синтезиран дипептид од првите две аминокиселински остатоци. Користена е ознаката (n)пептид за да се истакне дека бројот на аминокиселински остатоци во синтезираниот молекул зависи од дотогашниот број на кодони на mRNA кои ги процесирал рибозомот. Процесот продолжува циклично со повторување на прикажаните реакции. Деталите се објаснети во текстот.

на речиси сите протеини од големата субединица, таа сè уште го катализира формирањето пептидни врски. Пептидил-трансферазната активност се прекинала дури по отстранување на rRNA. Еден дел од rRNA од големата субединица реагира со крајот на tRNA каде е поврзана, од што произлегува дека rRNA-молекулот е катализаторот. Всушност, тие експерименти сугерираат дека протеините имаат повеќе структурна улога во градбата на рибозомите, а дека каталитичната активност при воспоставувањето на ковалентните пептидни врски меѓу аминокиселините ја вршат токму рибозомските RNA-молекули. Тоа е невообичаено, затоа што улогата на катализатори во биолошките системи речиси секогаш ја имаат протеините, но, со прочистување и кристализација на рибозомите се потврдила пептидил-трансферазната активност на самиот молекул на rRNA. Оттаму произлегува дека **рибозомите делуваат како рибозими**.

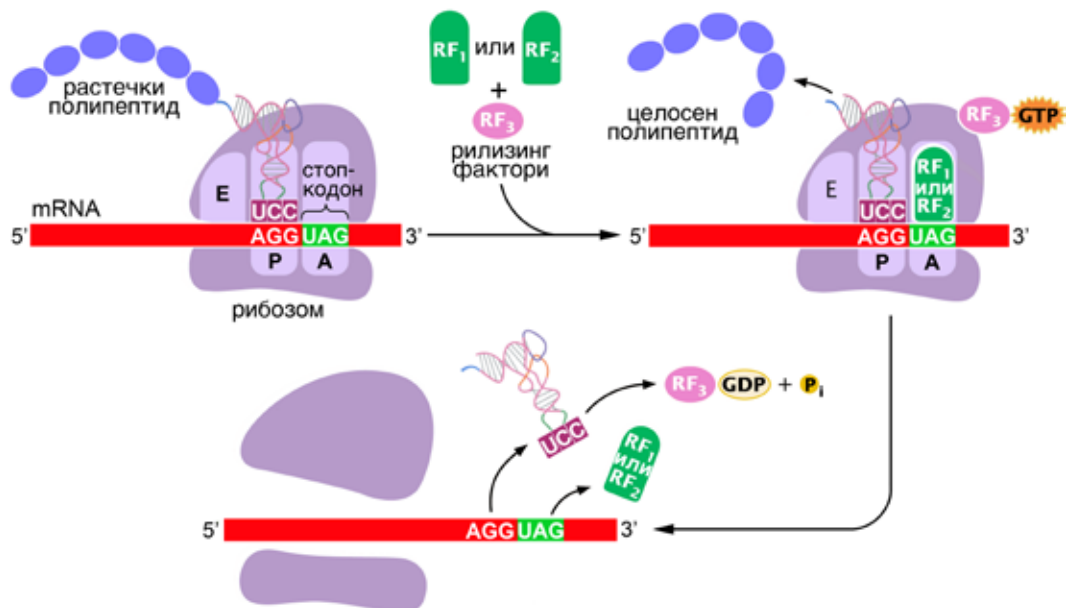
При **третиот чекор** на елонгацијата, рибозомот се преместува по должината на mRNA за еден кодон во 5' кон 3' насока, што се означува како **транслокација**. За овој процес неопходно е учество на **елонгацискиот фактор G (EF-G)**, а се троши и енергија со хидролиза на GTP. Со таквото движење двете tRNA молекули сега се наоѓаат во P- и во E-местото од рибозомот, а слободно останува A-местото.

Претходната аминоксил-tRNA, веќе растоварена од аминокиселината, се одвојува од рибозомот преку E-местото и се враќа во цитосолот каде повторно може да биде натоварена со друга аминокиселина. Третиот кодон од mRNA станува порамнет со A-местото, а следната tRNA, која го препознава третиот кодон, навлегува во A-местото. Елонгацијата продолжува и полипептидната верига расте, а трите чекови последователно се повторуваат сè додека има кодони на mRNA. Накусо, секоја аминоксил- tRNA која учествува во елонгацијата поминува низ истиот редослед на местата во рибозомот: навлегува низ A-местото, формира пептидна врска со претходната во P- и на крајот излегува од E-местото. Како што е претходно веќе споменато, единствен исклучок е иницирачката метионин-tRNA која директно навлегува во P-местото.

Во текот на елонгацијата на транслацијата, полипептидната верига останува постојано врзана со соодветната tRNA во P-местото, додека рибозомот се движи додавајќи по една аминокиселина според секвенцата на кодоните од mRNA-молекулот.

## 10.14 Терминирање на транслацијата

Циклусот на издолжување прекинува, а транслацијата запира (терминира) кога во A-местото ќе навлезе еден од трите можни стоп-кодона (UAA, UAG или UGA). Овие кодони не кодираат ниту една аминокиселина, ниту пак врзуваат некоја tRNA. Наместо тоа, тие се привлекуваат некој од **ослободувачките (рилизинг) фактори (RF** од англ. *releasing factor*). Овие мали протеини ја хидролизираат врската меѓу последниот аминокиселински остаток од полипептидот и tRNA во P-местото. Со тоа новиот комплетиран полипептид се одвојува од рибозомот. Кај E. coli постојат три рилизинг фактори: RF1, RF2 и RF3. Притоа, RF1 ги препознава стоп-кодоните UAA и UAG, додека протеинот RF2 ги препознава UGA и UAA. RF3 факторот не ги препознава самите стоп-кодони, туку создава комплекс со еден од врзаните два фактора,



**Слика 10-17:** Шематски приказ на терминарање на транслацијата кај прокариотите.

со GTP и со рибозомот (слика 10-17). Хидролизата на GTP обезбедува енергија за раскинување на пептидната врска.

Слично се одвива терминарањето на транслацијата и кај еукариотите, освен што притоа учествуваат два релизинг фактори: факторот eRF1 (буквата е кратенка од еукариотски) може да препознае кој било од трите стоп-кодони и eRF2 кој се врзува со GTP и овозможува ослободување на новосинтетизираниот полипептид од рибозомот.

### 10.15 Општ осврт кон транслацијата

Брзината на процесот на транслацијата се разликува меѓу прокариотските и еукариотските клетки. Кај првите, во полипептидот кој се синтезира се вградуваат околу 15 аминокиселински остатоци во секоја секунда, додека кај еукариотите две до пет во истиот временски интервал. Заради посликовито претставување на брзината, пресметано е дека за синтеза на протеин со просечна должина од околу 300 аминокиселински остатоци се потребни околу 20 секунди кај прокариотските клетки, наспроти околу 2,5 минути кај еукариотските.

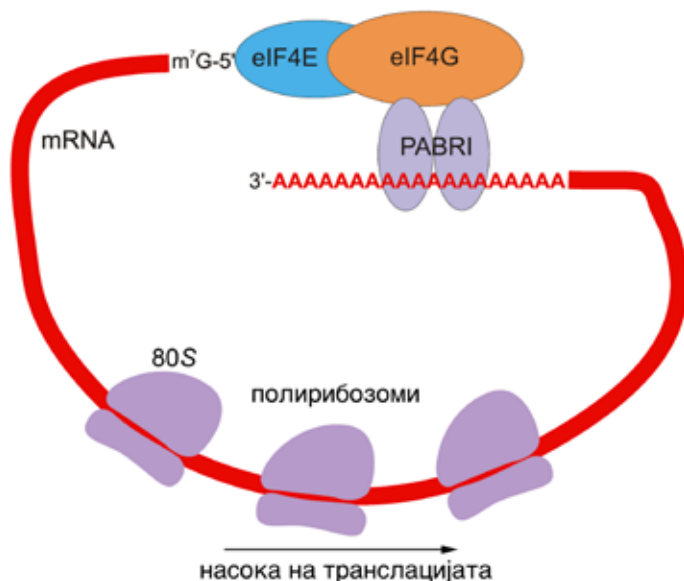
При синтезата на полипептидот, за секоја вградена аминокиселина се трошат по најмалку четири енергетски богати фосфатни соединенија: еден молекул ATP во текот на товарањето на соодветната tRNA, еден молекул GTP во текот на врзувањето на tRNA во A-местото на рибозомот и еден GTP за транслокација на рибозомот. Покрај тоа, по еден GTP се троши и за иницирањето на транслацијата, т.е. за првата (иницирачка) tRNA натоварена со метионин, како и по еден GTP за терминарање на транслацијата. Тоа претставува огромен енергетски трошок за клетката. Пресметано е дека околу 90% од произведената енергија кај *E. coli* се трошат на синтезата на

протеини.

Се претпоставува дека присуството на 3'-полиаденилатните опашки во mRNA молекулите кај еукариотите го зголемува нивото на транслацијата преку подржување на ефективоста на рециклирањето на рибозомите.

## Полирибозоми

Со истовремено врзување на повеќе рибозоми (т.н. полирибозоми или полизоми), се зголемува ефективоста на транслацијата и кај прокариотските и кај еукариотските клетки. Кај прокариотите, транскрипцијата и транслацијата се вршат истовремено, па, полирибозомите линеарно се движат по должината на mRNA молекулот. Кај еукариотите, ефективоста на транслацијата се зголемува со создавање на циркуларна структура создадена од mRNA-молекулот, од посебни протеини кои ја препознаваат неговата 5'-капа и 3'-полиаденилатна опашка, како и од поголем број на рибозоми распоредени по должината на mRNA (слика 10-18).



**Слика 10-18:** Транслација кај еукариотските клетки со циркуларни полирибозоми.

Притоа, eIF4E факторот се врзува со 7-метилгуанизинската капа ( $m^7G$ ) на 5'-крајот од зрелата mRNA, додека PABPI протеините (од англ. *polyadenilate-binding proteins*) се врзуваат со полиаденилатната опашка на 3'-крајот. eIF4G факторот ги поврзува во кружна формација, а при транслацијата, рибозомите кои достигнуваат до 3'-крајот од mRNA, се расклопуваат во поединечни субединици и повторно се врзуваат (иницијација) на 3'-крајот од mRNA, со што целиот процес добива континуиран, цикличен тек.



## 10.16 Разлики во транслацијата меѓу прокариотите и еукариотите

Поголемиот дел од геномот на *E. coli*, кој е составен од една циркуларна двоверижна DNA која кодира протеини и функционални RNA-молекули, а дел од некодирачките секвенци се вклучени во регулацијата на транскрипцијата на гените. Важно е што, кај прокариотите, транскрипцијата на повеќе еден по друг поставени гени кои се групирани во посебен регион означен како **оперон** кои се објаснети понатаму. Овие гени кај прокариотите се нарекуваат **полицистронски гени** и се под контрола на еден единствен промотор, а се транскрибираат во еден единствен mRNA молекул од кој при транслацијата се синтетизира соодветниот број протеини.

Заради прегледност, споредбата на основните карактеристики на транслацијата кај прокариотските и кај еукариотските организми се прикажани во **табелата 10-7**.

Табела 10-7: Споредба на транслацијата меѓу прокариотите и еукариотите		
процес или компонента	прокариоти	еукариоти (во цитоплазма)
поврзаност на транскрипцијата и транслацијата	поврзани	Одвоени
број на гени во една транскрипциска единица	полицистронски mRNA	моноцистронски mRNA
полирибозоми	линеарни	циркуларни
местото на mRNA за врзување со рибозомот	има (RBS)	нема посебно место
препознавање на старт-кодот во mRNA	првиот кодон AUG низводно од местото на mRNA за врзување со рибозомот	првиот кодон AUG низводно од 5'-капата
прва аминокиселина во полипептидот	формилметионин	Метионин
рибозом (целосен)	70S	80S
иницијациски фактори	IF1, IF2 и IF3	eIF2, eIF3, eIF4 и eIF5
елонгациски фактори	EF-T и EF-G	eEF1 и eEF2

### Регулација на транслацијата

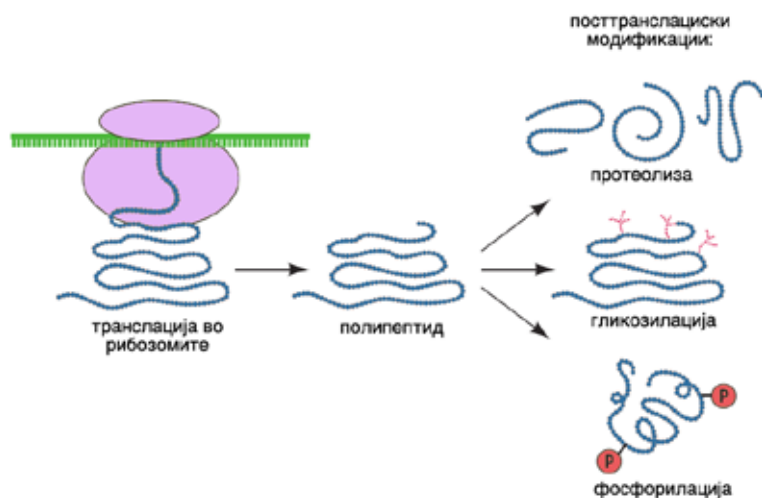
Процесот на транслација може да функционира со различна ефективност, а клеточните механизми за менување на брзината на транслацијата го регулираат количеството на синтетизирани протеини. Определени хемиски соединенија, како некои антибиотици, на пример, можат да ја забават или целосно да ја запрат транслацијата. Спротивно на тоа, активноста на повеќе од еден рибозом на ист mRNA-молекул може да ја забрза синтезата на протеините и да го зголеми нивниот принос. Откога првиот рибозом ќе се оддалечи доволно далеку од иницијалната точка, може да се формира втор иницирачки комплекс, по што следи трет итн. На тој начин се образува збирна формација наречена **полирибозом** или **полизом**, во вид на ѓердан, која е составена од повеќе рибозоми по должината на еден ист mRNA-молекул.

## 10.17 Посттранслациска модификација на протеините

Повеќето протеини се модифицираат после транслацијата, а овие модификации се од есенцијално значење за нивната крајна функција (слика 10-19). Следат неколку поважни посттранслациски модификации на протеините.

**Протеолизата** претставува ензимско пресекување на полипептидната верига и со протеази и е опишана претходно. Некои протеини иницијално се составени од полипротеини, кои се пресекуваат до конечни функционални продукти. Неодамна е опишан редок и интересен феномен сличен на **преспојувањето (сплајсинг)**, но, **на ниво на протеинските молекули**, наместо на mRNA. Деловите од полипептидната верига кои се отстрануваат, по аналогија со интроните се нарекуваат **интеини**, додека регионите кои се преспојуваат и кои остануваат во крајниот полипептид, по аналогија со екзоните, се нарекуваат **егзтеини**.

**Гликозилацијата** претставува ензимска адиција на различни шеќерни остатоци на определени аминокиселински групи од протеините при нивното поминување



**Слика 10-19:** Посттранслациски модификации на протеините. Повеќето протеини се модифицираат по синтезата, по што стануваат функционални.

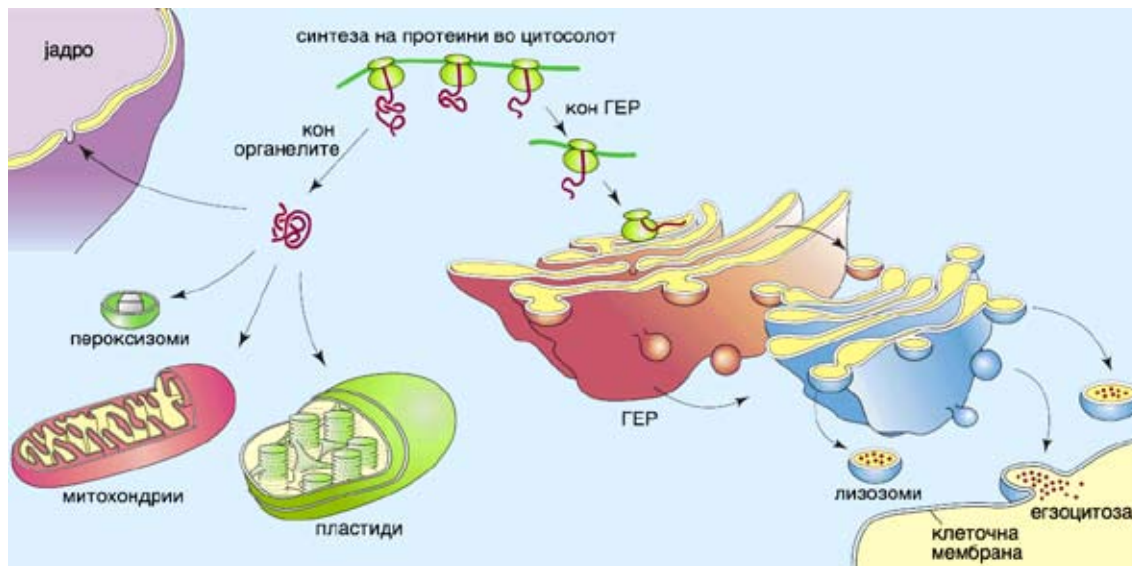
низ ендоплазматскиот ретикулум или Голџиевиот комплекс.

**Фосфорилацијата** претставува адиција на фосфатни групи на протеините со помош на ензимите **протеин кинази**. Електростатскиот набој на фосфатните групи ја менува конформацијата на целните протеини, со што се експонираат определени активни региони од полипептидните вериги.

## 10.18 Посттранслациски случувања

Кај еукариотските клетки, карактеристично е што полипептидната верига која се ослободува од рибозомот мора да се измени за да стане функционален протеин. Некои протеини потребно е да се достават подалеку од местото на синтезата во цитоплазмата, да се транспортираат во некоја органела, или да се излачат надвор од клетката во форма на секреторни гранули (слика 10-20). Полипептидите можат

и дополнително да се модифицираат со додавање на нови хемиски групи, што може да влијае врз нивната функција. Од големо значење е и **насочувањето на протеините** кон крајната дестинација (цитоплазмата, некоја органела или секреција надвор од клетката).



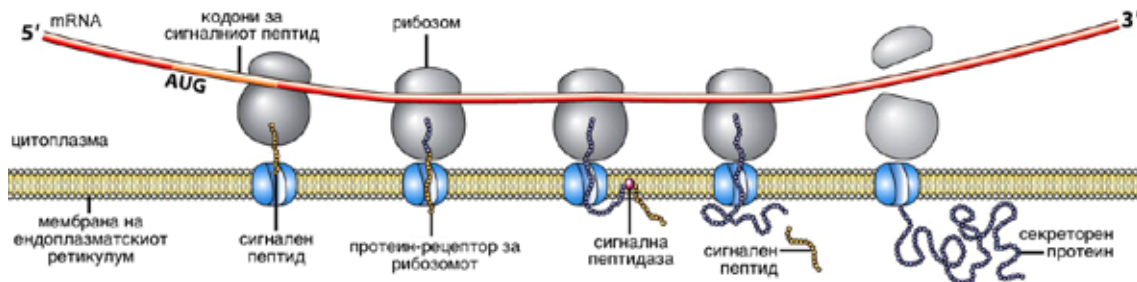
**Слика 10-20:** Дестинација на синтетизираните протеини.

**Протеини чија крајна дестинација е цитоплазмата:** По транслацијата, некои полипептиди имаат куси експонирани аминокиселински секвенци кои делуваат како своевидна адреса која ги насочува кон органелите. Таквите **сигнални секвенци** се наоѓаат на N-терминалните краеве, или во внатрешниот регион од аминокиселинската верига.

**Секвенците за локализирање на јадрото (NLS, од англ. nuclear localization sequences)** овозможуваат протеините да поминуваат низ јадрените пори во внатрешноста на јадрениот компартман.

Сигналната секвенца има конформација која овозможува да се врзе со специфични рецепторни протеини, наречени **docking протеини**, кои се наоѓаат на надворешните мембрани од соодветните органели.

**Протеини чија крајна дестинација е ендоплазматскиот ретикулум:** Ако на почетокот на полипептидната верига се наоѓа специфична хидрофобна секвенца од околу 25 аминокиселини, крајниот производ најпрво се испраќа до ендоплазматскиот ретикулум, а потоа до лизозомите, плазма мембраната, или пак, надвор од клетката. Во цитоплазмата, пред комплетирањето на транслацијата, сигналната секвенца (наречен и сигнален пептид) се врзува со посебен протеински рецептор на мембраната од ендоплазматскиот ретикулум а потоа и ја втурнува и останатата протеинска верига низ мембраната (**слика 10-21**).



**Слика 10-21:** Сигнални секвенци за насочување на протеините по синтезата. Протеините наменети да бидат излачени од клетката имаат посебна аминокиселинска секвенца на својот amino-крај. Оваа сигнална секвенца се врзува со мембраната и го втурнува преостанатиот дел од протеинот низ липидната мембрана. Сигналната секвенца се отстранува од протеинот со пресекување ензимско со помош на ензимот сигнална пептидаза.

По ензимското отстранување на сигналната секвенца, протеинот се наоѓа во луменот на ендоплазматскиот ретикулум од каде може да биде пренасочен кон соодветна локација: во друга клеточна органела или да биде излачен надвор од клетката. Некои протеини се модифицираат хемиски во ендоплазматскиот ретикулум или во Голџиевиот комплекс, пред да бидат процесирани и насочени кон соодветните органели.

# РЕГУЛАЦИЈА НА ГЕНСКАТА ЕКСПРЕСИЈА

## Глава 11

**Б**иолошките карактеристики и функциите на секоја клетка, во најголема мерка, се должат на протеините кои активно се експримираат во истата. Констелацијата и количеството на експримирани протеини значително влијаат врз клеточната архитектура, клеточните ензимски активности, меѓуклеточните интеракции, како и врз многу други биохемиски и физиолошки особини. Експресијата на различните протеини драматично се менува и во различни временски интервали во една иста клетка.

Гените кои кодираат ензими и структурни протеини се нарекуваат и **структурни гени**, а нивната експресија е под контрола на **регулаторните DNA-секвенци** (означени и како **регулаторни елементи**). Некои регулаторни елементи самите не се транскрибираат, туку индиректно влијаат врз експресијата на определен ген. Од друга страна, кога овие елементи кодираат крајни продукти (**регулаторни протеини** или **регулаторни RNA-молекули**) што ја регулираат транскрипцијата или транслацијата на соодветните структурни гени, тогаш се нарекуваат и **регулаторни гени**.

Не треба да се заборава дека се регулира и експресијата на гените кои не кодираат протеини, т.е. на гените чии крајни продукти се функционалните RNA-молекули (на пример: rRNA, tRNA, рибозими и други).

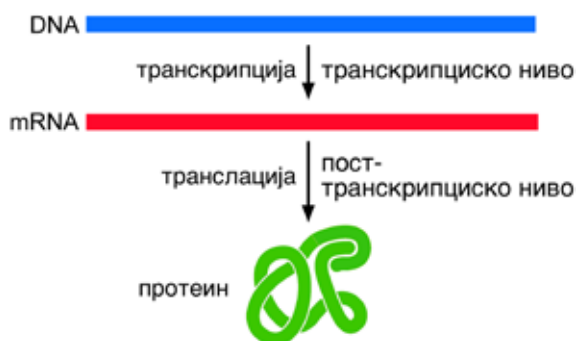
Регулацијата на генската експресија може да се врши на различни нивоа и кај прокариотите и кај еукариотите: преку промена на нивоата на транскрипција и/или на транслација на генот кој го кодира протеинскиот продукт, преку промена на стабилноста на mRNA, како и со посттранслациски модификации на протеините. Сепак, се смета дека примарниот начин за регулирање на експресијата на гените се одвива преку контрола на ниво на транскрипцијата на гените.

### 11.1 Регулација на генската експресија кај прокариотите

Продуктите на некои гени кај прокариотските клетки се неопходни во текот на целиот животен циклус (на пример, гените за протеините и ензимите вклучени во транслацијата, репликацијата, па, нивната експресија е непрекината и се означува како **конститутивна експресија**).

Од друга страна, во текот на еволуцијата, кај прокариотите се развиле механизми со кои некои протеини се синтетизираат само по потреба, со што клетките ја штедат и енергијата и нејзиниот извор (енергенсите). Слично, гените чии продукти се вклучени во DNA-репарацијата се експримираат само доколку се појави оштетување на DNA-молекулот. Ваквите гени се активираат само по потреба, па, овој тип на експресија се нарекува **индуцибилна експресија**. Во зависност од условите во кои се живеат, прокариотите можат прилично бргу да ја прилагодат брзината на протеинската синтеза.

Постојат неколку начини со кои кај прокариотите ја намалуваат или запираат синтезата на протеините кои се непотребни за клетката во тој момент, и тоа преку: блокирање на транскрипцијата на mRNA, хидролиза на mRNA веднаш по транслацијата, инхибиција на транслацијата на ниво на рибозоми, разградување на протеинот веднаш по неговата синтеза, инхибиција на протеинската функција и преку други механизми (**слика 11-1**). Сиве овие начини мораат да бидат селективни, односно да делуваат само врз определени гени или врз протеините, и во определен момент.



Селективното запирање на транскрипцијата е далеку поефективно отколку деградацијата или инхибицијата на веќе создадениот протеин. Иако постојат примери за регулација на протеините со секој од горенаведените механизми, прокариотите најчесто се служат со најефикасниот начин: со транскрипциска регулација.

Селективното запирање на транскрипцијата е далеку поефективно отколку деградацијата или инхибицијата на веќе создадениот протеин. Иако постојат примери за регулација на протеините со секој од горенаведените механизми, прокариотите најчесто се служат со најефикасниот начин: со транскрипциска регулација.

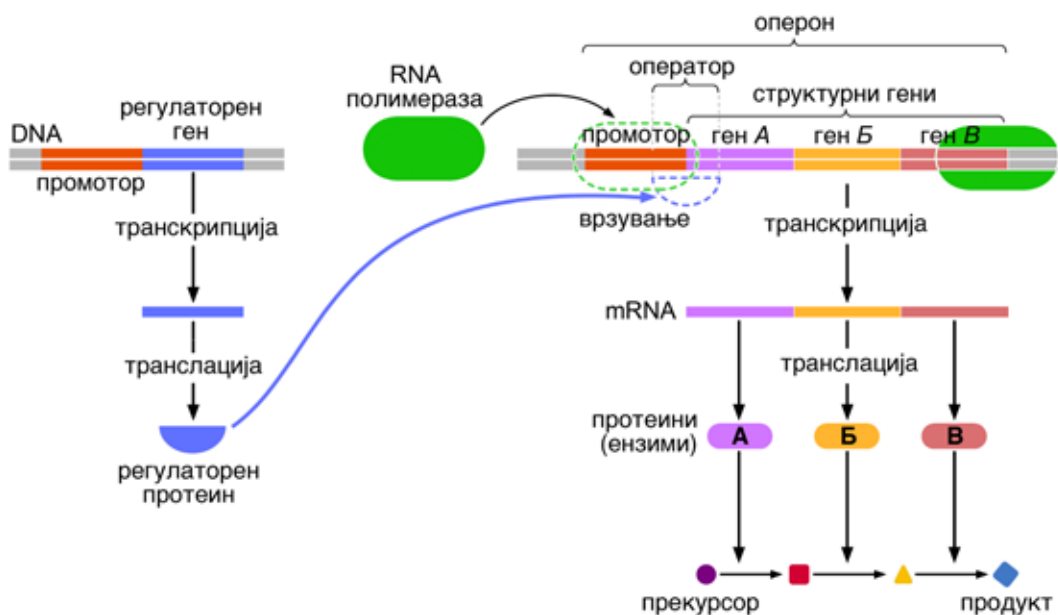
**Слика 11-1:** Нивоа на регулација на генската експресија кај прокариотските клетки.

## Оперони - континуирани транскрипциски единици

Една од најважните карактеристики на регулацијата на генската експресија кај бактериите се темели на специфичната организација на некои гени. Имено, гените чии протеински продукти учествуваат во ист метаболичен пат или имаат други поврзани функции можат да бидат групирани еден по друг и да имаат само еден единствен промотор. Таквите групирани гени обично се транскрибираат непрекинато при што се добива единствен, континуиран mRNA молекул. При транслацијата, сепак, се синтетизираат одвоени полипептиди. Интересно е што ваквата регулација не се јавува кај еукариотските организми, освен во крајно ретки исклучоци.

Целокупната DNA-секвенца составена од едно по друго поставени гени заедно со единствениот промотор и со останатите DNA-секвенци кои ја контролираат транскрипцијата е наречена **оперон**. Структурата на типичен оперон е шематски прикажана на **сликата 11-2** и е поедноставена од дидактички причини.

Во организацијата на оперонот клучна улога има кусата DNA-секвенца позната како **оператор**, која се наоѓа меѓу промоторот и првиот од групираниите гени



**Слика 11-2:** Структура и основни функции на бактерискиот оперон. Регулаторниот протеин е кодиран од соодветен ген кој е лоциран одделно од оперонот. Оперонот е единечна транскрипциска единица која вклучува повеќе структурни гени, како и DNA-секвенците на промоторот и на операторот. Протеинските производи на структурните гени се најчесто ензими вклучени во ист метаболичен пат или со сродна функција.

во оперонот. Посебен **регулаторен протеин** кој се врзуваат со DNA може да се врзе со операторот и со тоа да ја регулира транскрипцијата на сите гени во оперонот одеднаш. На својата површина, регулаторните протеински молекули обично имаат по две места (домени) за врзување: со едното специфично ја препознаваат секвенцата на операторот, додека со другото се врзуваат со мал органски молекул кој може да предизвика нивна алостеричка модификација и со тоа промена на способноста за врзување со операторот. Ова ќе биде сликовито објаснето со повеќе примери. Самиот регулаторен протеин е кодиран од т.н. **регулаторен ген** кој не е дел од оперонот, иако учествува во неговата функција. Овој ген е најчесто лоциран на поголемо растојание од оперонот.

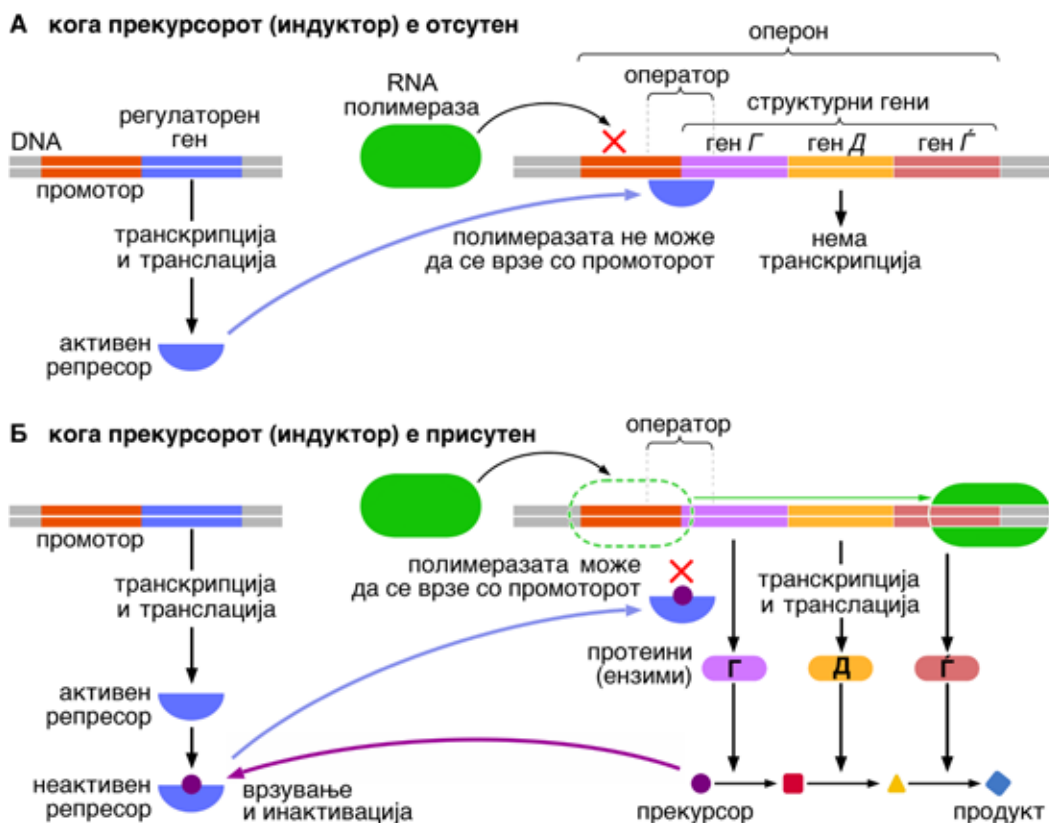
Важно е да се има предвид дека оперонот секогаш се состои од промотор, оператор и од два или повеќе во низа поредени структурни гени. Промоторот и операторот претставуваат места за врзување на DNA со регулаторните протеини и тие не се транскрибираат. Всушност, операторот е класичен пример за цис-регулаторен елемент, додека регулаторниот ген претставува прокариотски еквивалент за транс-регулаторен елемент кај еукариотите. Овие термини се објаснети подолу во контекст на еукариотската регулација на генската експресија.



## 11.2 Негативна и позитивна контрола на експресијата на гените во оперонот

Утврдено е дека *E. coli* има повеќе механизми за регулација на транскрипцијата на опероните кои се должат на интеракција меѓу репресорниот протеин со операторот. **Негативната контрола** (или **регулација**) на транскрипцијата на гените во оперонот се однесува на примерите каде регулаторниот протеин делува како **репресор** кој специфично се врзува со операторот формирајќи своевидна „пречка“ за RNA-полимеразата, и со тоа ја блокира транскрипцијата. Наспроти тоа, кога репресорниот протеин не е поврзан со операторот, синтезата на mRNA се одвива непречено. Кај **позитивната регулација**, регулаторниот протеин има улога на **активатор** кој ја олеснува и/или забрзува транскрипцијата преку привлекување на RNA-полимеразата или преку некој друг стимулирачки механизам. Интересно, регулаторниот протеин-активатор често ја препознава и се врзува со DNA-секвенцата вон таа на операторот.

Важно е што и кај негативната и кај позитивната регулација, самиот механизам на контролата на транскрипцијата може да биде **индуцибилен** или **репресибилен**.



**Слика 11-3:** Негативно индуцибилен оперон. **А:** кога прекурзорниот молекул е отсутен, регулаторниот протеин-репресор е активен и се врзува со оперонот, со што го попречува врзувањето на RNA-полимеразата и транскрипцијата. **Б:** кога прекурзорот е присутен, тој делува како индуктор и се врзува со репресорот, предизвикувајќи негова инактивација.

Оттаму, во зависност од механизмот на делување, опероните можат да се поделат на четири класи: негативно индуцибилни, негативно репресибилни, позитивно индуцибилни и позитивно репресибилни оперони.

Кај **негативно индуцибилните оперони**, регулаторниот протеин е репресорен и во основната состојба е поврзан со операторот со што ја оневозможува транскрипцијата на гените од оперонот. Во таквиот случај постои транскрипција на регулаторниот ген со што, по транслацијата, се добива активен репресорен протеин кој е способен да ја препознае и да се поврзе со секвенцата на операторот. Поради тоа што секвенцата на операторот се преклопува со таа на промоторот, RNA-полимеразата физички не може да се врзе со промоторот и да ја започне транскрипцијата, па, гените остануваат нетранскрибирани (**слика 11-3**).

Ваквиот систем на регулација се нарекува индуцибилен од причини што, во основната состојба, оперонот е неактивен (негативно регулиран), а може да се индуцира со мал молекул кој се нарекува **индуктор**. Овој молекул е најчесто самиот прекурзор (супстрат) на метаболичниот пат кој се регулира со оперонот и е способен да се поврзе со репресорниот протеин. Притоа, го спречува да се поврзе со операторот и предизвикува алостеричка модификација на репресорниот протеин. Таквиот неактивен репресорен протеин ја губи способноста да ја препознае и да се поврзе со DNA-секвенцата на операторот, па, транскрипцијата тече непречено.

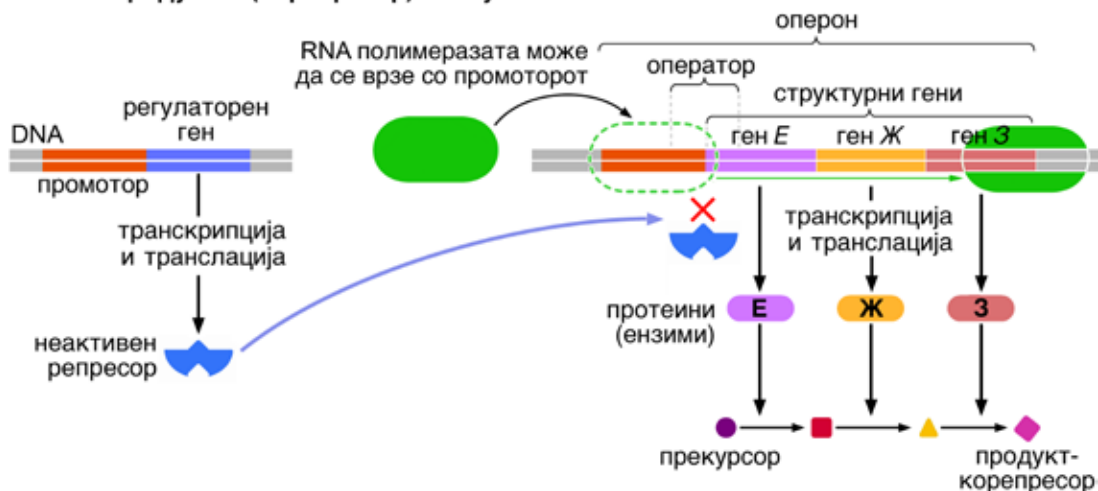
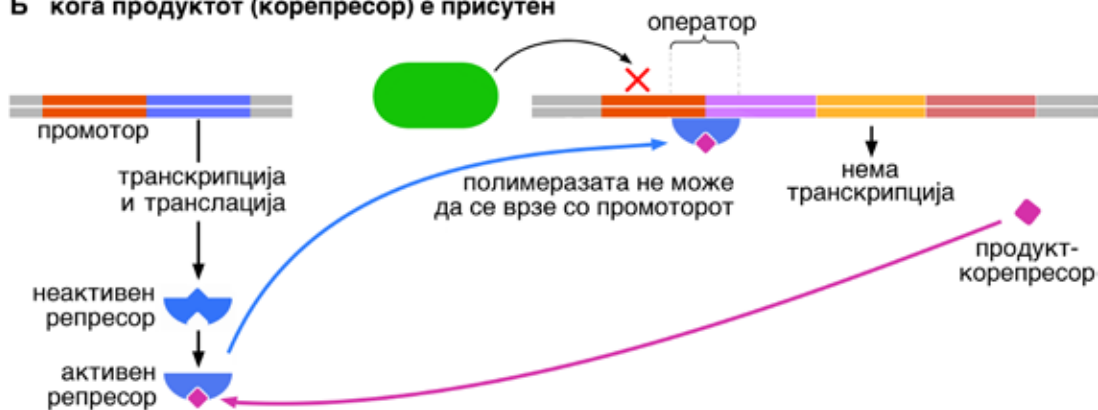
Се смета дека овој механизам на регулација на генската експресија има големо еволуциско значење. Имено, експресијата на гените од оперонот би предизвикувала непотребно трошење на енергија и ресурси на бактериската клетка за синтеза на ензимите во отсуство на индукторот (прекурзор-супстрат). Откога супстратот ќе се појави, бргу ќе дојде до транскрипција на гените од оперонот со негативно индуцибилна регулација.

Кај **негативно репресибилните оперони**, регулацијата на транскрипцијата се заснова на тоа што молекулот наречен **корепресор**, кој е продукт на метаболичниот процес, реагира со регулаторниот протеин со што го оспособува за врзување со операторот и ја инхибира транскрипцијата. Во основната состојба, корепресорот е отсутен и репресорниот протеин е неактивен, па, транскрипцијата се одвива непречено (**слика 11-4**).

Очигледно е дека и негативно репресибилниот систем на контрола овозможува значителна заштеда на енергијата и ресурсите на бактеријата.

Транскрипцијата на гените во **позитивно индуцибилните оператори** е исклучена поради тоа што репресорниот протеин е неактивен во основната состојба. Индукторот (кој често е прекурзор или супстрат на определен метаболичен пат во кој учествуваат генските продукти кодирани од оперонот) предизвикува активација на претходно неактивниот активаторен протеин со што истиот може да се поврзе со операторот или непосредно до него и да ја стимулира транскрипцијата.

Во основната состојба, транскрипцијата кај **позитивно репресибилните оперони** се одвива стимулирано поради поврзаноста на функционалниот (активен) активаторен протеин со соодветната DNA-секвенца. Како што е и претходно наведено, активаторот не мора да се врзе токму со операторот во сите оперони, но, препознавачката секвенца е во негова непосредна близина. Ваквото врзување делува стимулативно на транскрипцијата, како и кај индуцибилниот систем на позитивна контрола. Но, кај репресибилните оперони, малите молекули (најчесто продукти на

**А** кога продуктот (корепресор) е отсутен**Б** кога продуктот (корепресор) е присутен

**Слика 11-4:** Негативно репресибилен оперон. **А:** во отсуство на продуктот-корепресор, регулаторниот протеин-репресор е неактивен и не може да се врзе со оперонот, па, транскрипцијата на структурните гени тече непречено **Б:** продуктот на метаболичниот пат кој делува како молекул-корепресор се врзува со репресорниот протеин и алостерички го модифицира, предизвикувајќи негова активација. Активниот репресор се врзува со операторот, попречувајќи го врзувањето на RNA-полимеразата и транскрипцијата на структурните гени.

метаболичниот пат кој се регулира) делуваат како корепресори и се врзуваат со регулаторниот активаторен протеин со што го инактивираат. Со тоа, отсуствува стимулирањето на транскрипцијата, па, таа се инхибира или целосно запира.

Воопштено, индуцибилните системи ги контролираат катаболичните патишта во метаболизмот на бактериската клетка (кај кои транскрипцијата се вклучува само кога прекурзорот или супстратот е присутен), додека репресибилните системи најчесто ги контролираат биосинтетските патишта (кои се исклучуваат кога продуктот достигнува определени концентрации во клетката).

Заради поголема прегледност и споредба, основните карактеристики на четирите теоретски типа на оперони се прикажани во **табелата 11-1**.

**Табела 11-1: Споредба на регулацијата на транскрипцијата кај индуцибилните и репресибилните оперони со негативна и со позитивна контрола**

тип на оперон	негативно индуцибилен	негативно репресибилен	позитивно индуцибилен	позитивно репресибилен
транскрипција во основната состојба	нема	има	нема	има
регулаторен протеин во основната состојба	активен репресор	неактивен репресор	неактивен активатор	активен активатор
тип на малиот органски молекул кој се врзува со регулаторниот протеин	индуктор (најчесто прекурзор)	корепресор (најчесто продукт)	индуктор (најчесто прекурзор)	корепресор (најчесто продукт)
ефект од врзувањето на малиот молекул со регулаторниот протеин	инактивација на репресорот	активација на репресорот	активација на активаторот	инактивација на активаторот
транскрипција по промената на конформацијата на регулаторниот протеин	има	нема	има	нема

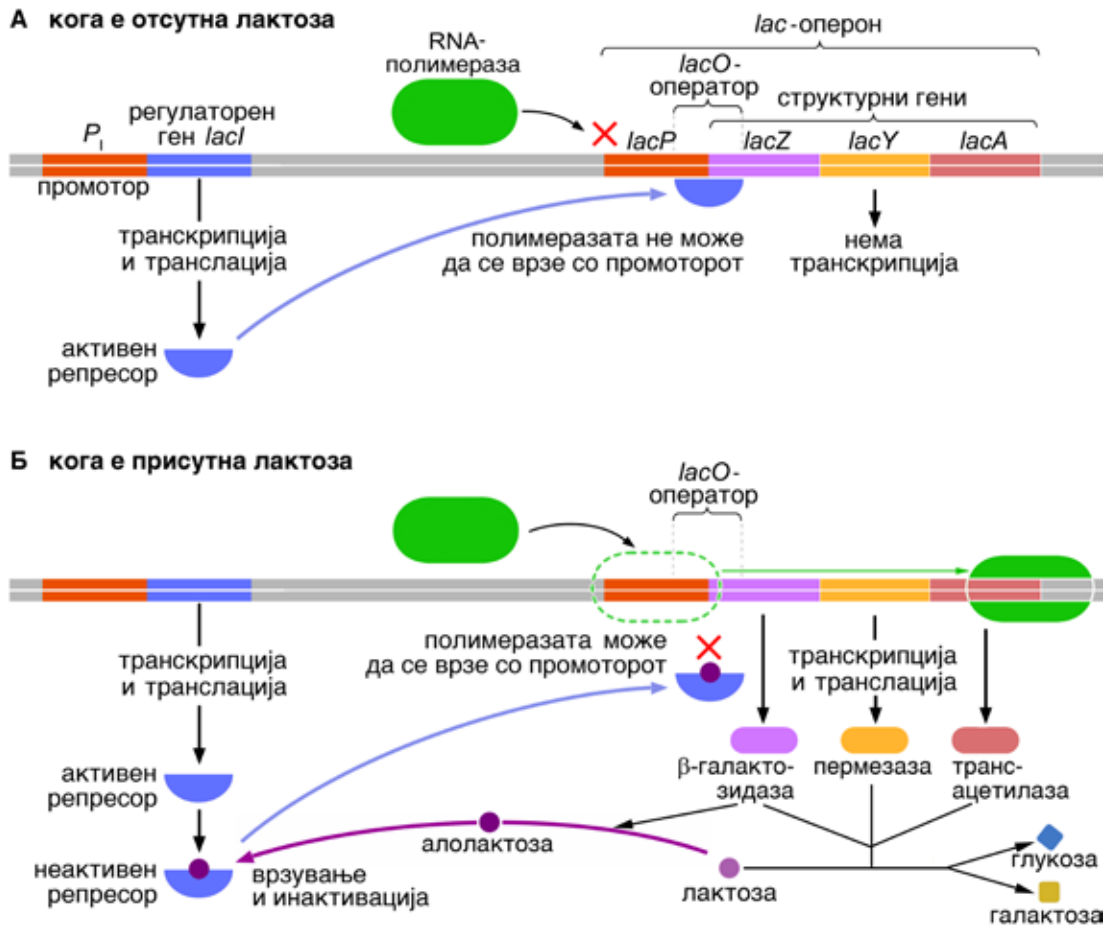
### Пример за негативно индуцибилна контрола: *lac*-оперон

Оперонот кој ги содржи структурните гени за метаболизирање лактоза кај *E.coli* се нарекува ***lac*-оперон** и е истражуван во 1950-тите години од страна на Жакоб и Моно (François Jacob и Jacques Monod). Протеинот репресор има две места за врзување: едно за операторот, а другото за индукторот: молекул на лактоза и други  $\beta$ -галактозидни шеќери (слика 11-5).

При врзувањето со индукторот, се менува конформацијата на репресорот (алостеричка модификација) со што се оневозможува поврзување на репресорниот протеин со операторот. Тогаш непречено се синтетизира соодветната mRNA, од која во рибозомската машинерија, се врши синтеза на протеини неопходни за метаболизирање на лактозата.

Со намалување на концентрацијата на лактозата во цитосолот, репресорниот молекул ја ослободува лактозата од себе, со што повторно се враќа во првобитната конформација погодна за врзување со операторот, се врзува со операторот и ја блокира транскрипцијата на *lac* оперонот. За тоа време, веќе синтетизираните mRNA молекули постепено се деградираат.

Регулаторниот ген кој го кодира репресорот на *lac*-оперонот е наречен *i* (индуцирачки ген), и се наоѓа во близина на оперонот кој го регулира. Како секој ген, и генот *i* има свој промотор означен како  $p_i$ . Овој промотор не е многу ефикасен во врзувањето со RNA-полимеразата, па, во текот на една клеточна генерација се синтетизираат десетина молекули што е доволно за ефективна регулација на оперонот. Меѓу промоторот  $p_i$  и кодирачката секвенца на генот *i* не постои оператор, односно репресорот на *lac* оперонот е **конститутивен протеин** кој се синтетизира континуирано и независно од условите на средината.



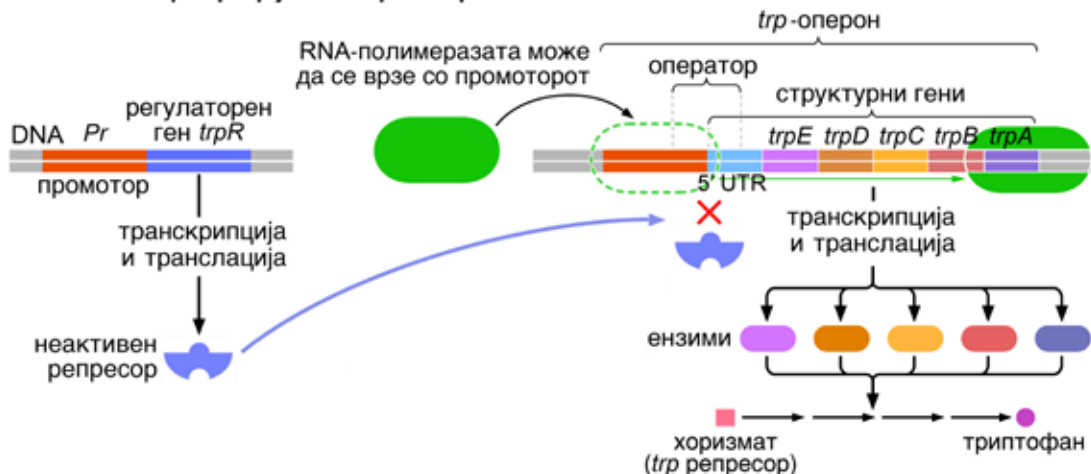
**Слика 11-5:** Индуцибилниот лац-оперон кај *E. coli* е DNA-сегмент кој содржи промотор, оператор и три структурни гени кои кодираат три ензими инволвирани во метаболизмот на лактоза. **A:** во отсуство на лактозата, регулаторниот протеин-репресор е активен и се врзува со операторот, инхибирајќи ја транскрипцијата на овие гени. **B:** кога лактозата е присутна, дел од неа се конвертира во алолактоза која го инактивира репресорот. Таквиот неактивен репресорен протеин не се врзува со операторот, па, транскрипцијата на структурните гени и синтезата на потребните ензими тече непречено. Овие ензими ја конвертираат лактозата во глюкоза и во галактоза.

### Пример за негативно репресибилна контрола: *trp* оперон

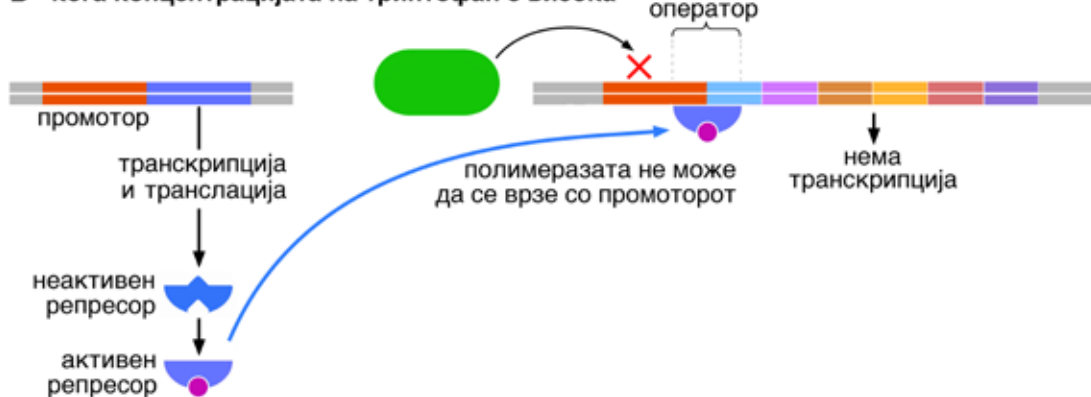
Во генската регулација кај бактериите постојат и оперони со репресорна негативна контрола кои ја потиснуваат синтезата на определени ензими како одговор на акумулирањето на поголеми количества од метаболичните продукти во бактеријата. На пример, доколку есенцијалната аминокиселина триптофан е присутна во изобилни количества, кај бактеријата настапува прекин на експресијата на

ензимите задолжени за неговата синтеза.. Кај ваквите оперони со негативна контрола, репресорниот протеин е неактивен во основната состојба и не може да се врзе со операторот доколку најпрво не е врзан со **корепресор**, т.е. со самиот краен метаболитен продукт (триптофан во овој пример) или со соодветен хемиски аналог (слика 11-6).

### А кога концентрацијата на триптофан е ниска



### Б кога концентрацијата на триптофан е висока



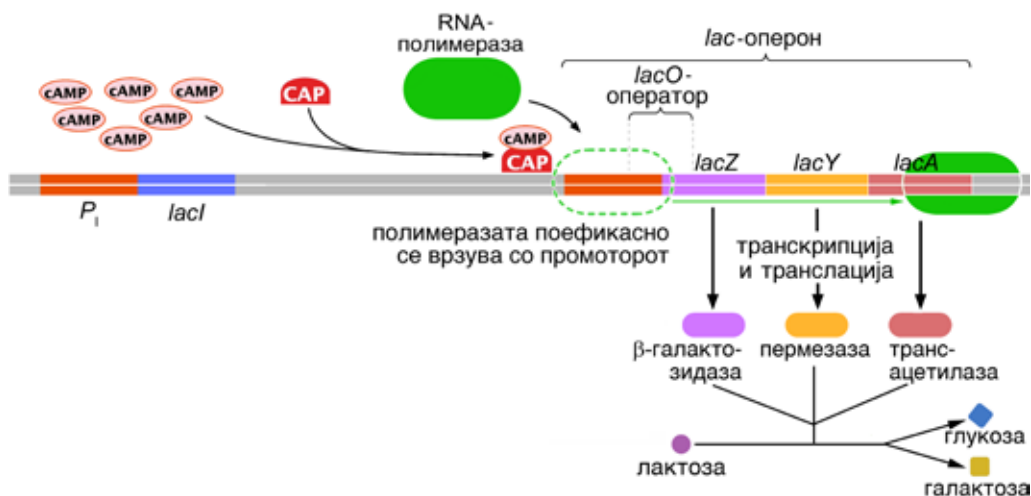
**Слика 11-6:** Репресибилен трп-оперон за контрола на биосинтезата на аминокиселината триптофан кај *E. coli*. **А:** во вообичаени околности, кога концентрацијата на триптофан во хранливата подлога е ниска, регулаторниот протеин-репресор е неактивен и не ја попречува транскрипцијата на структурните гени чии продукти (ензими се вклучени во биохемискиот пат за синтеза на триптофан). **Б:** кога е присутен триптофанот, дел од молекулите се врзуваат со репресорот и го активираат, со што истиот се врзува со операторот и ја блокира транскрипцијата на структурните гени од оперонот *trp*.

Доколку крајниот продукт (триптофан, во примеров) е отсутен, репресорниот протеин не може да се врзе со операторот и оперонот се транскрибира со максимална ефективност. Кога триптофанот е присутен, репресорниот протеин се врзува со операторот и експресијата на гените од оперонот се потиснува.

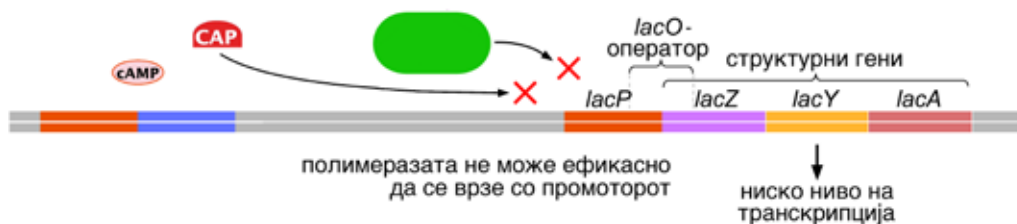
## Пример за позитивно индуцибилна контрола

При недостаток на преферираниот извор на енергија - глукозата, *E. coli* може да користи и друг шеќер (на пример, лактоза) кој може да го разгради за добивање на енергија. Опероните кои кодираат ензими за катализирање на овој алтернативен извор на енергија, каков што е *lac* оперонот, имаат механизми за стимулирање на транскрипцијата на гените за соодветните ензими преку зголемување на ефикасноста на промоторот во оперонот. Кај овие оперони, RNA-полимеразата се врзува со промоторот во неколку чекори. Најпрво, протеинот наречен **катаболит-активаторен протеин** (CAP, од англ. *catabolite activator protein*) се врзува со **цикличниот аденозин 3',5'-монофосфат** (сАМР). сАМР е чест сигнален молекул вклучен во разни клеточни процеси и кај прокариотите и кај еукариотите. Понатаму, комплексот CAP-сАМР се

### А кога концентрацијата на глукоза е ниска



### Б кога концентрацијата на глукоза е висока



**Слика 11-7:** Транскрипцијата се засилува со врзување на комплексот CAP-сАМР со промоторот на *lac*-оперонот. **А:** кога концентрацијата на глукоза во подлогата е ниска, нивото на сАМР е високо и овие молекули создаваат комплекси со протеинот CAP (од англ. *catabolite activator protein*: катаболит-активирачки протеин). Врзувањето на комплексот CAP-сАМР со DNA-молекулот непосредно пред промоторот *lacP*, значително ја зголемува ефективноста на врзувањето на RNA-полимеразата со истиот промотор, па, и нивото на транскрипција на структурните гени од *lac*-оперонот е значително повисоко. **Б:** при високи концентрации на глукоза, нивото на сАМР е многу ниско, со што е ниско нивото на комплексот CAP-сАМР. Питоа значително опаѓа ефективноста на врзувањето на RNA-полимеразата со промоторот *lacP*, па, се намалува и нивото на транскрипција на овие гени.



врзува со DNA спротиводно (во 5`-насока) од промоторот. Притоа, доаѓа до поефикасно привлекување и врзување на RNA-полимеразата со промоторот со што се зголемува транскрипцијата на структурните гени од овој оперон.

Кога глукозата е обилно присутна во хранливиот медиум, бактеријата нема потреба да ги метаболизира алтернативните енергетски молекули (каква што е лактозата), па, синтезата на ензимите кои ја катаболизираат лактозата се прекинува или се намалува. Присутната глукоза ја намалува синтезата на ензимите преку намалување на концентрацијата на cAMP (слика 11-7).

Вака намалената концентрација на cAMP го спречува протеинот CAP да се врзе со промоторот, што на крај резултира со помалку ефикасно врзување на RNA-полимеразата и со тоа до редуција на транскрипција на структурните гени. Овој механизам на регулација на транскрипцијата се нарекува и **катаболична репресија**.

Индукцибилниот *lac* оперон и репресибилниот *trp*-оперон се примери за два система на ниво оператор-репресор кај кои постои **негативна контрола** на транскрипцијата, поради тоа што регулаторниот молекул (репресор) ја спречува транскрипцијата и во двата случаи.

Од друга страна, репресивниот систем на ниво промотор-катаболит е пример за **позитивна контрола** на транскрипцијата од причина што регулаторниот молекул (комплексот CRP-cAMP) ја засилува транскрипцијата.

Основните карактеристики на позитивните и негативните контролни механизми кај *lac*-оперонот се прикажани во **табелата 11-2**:

Табела 11-2: Влијанија на концентрациите на глукоза и лактоза врз транскрипциската активност на <i>lac</i> -оперонот						
глукоза	лактоза	ниво на cAMP	врзување на RNA-полимеразата со промоторот	<i>lac</i> репресор	транскрипција на гените <i>lac</i>	користење на лактозата
присутна	<i>ојсујна</i>	<i>ниско</i>	<i>има</i>	активен и се врзува со операторот	нема	<b>нема</b>
присутна	присутна	<i>ниско</i>	<i>има, но неефикасно</i>	<i>неактивен и не се врзува со ојераторот</i>	ниско ниво	<b>нема</b>
<i>ојсујна</i>	присутна	високо	има, многу ефикасно	<i>неактивен и не се врзува со ојераторот</i>	високо ниво	<b>има</b>
<i>ојсујна</i>	<i>ојсујна</i>	високо	<i>нема</i>	активен и се врзува со операторот	нема	<b>нема</b>

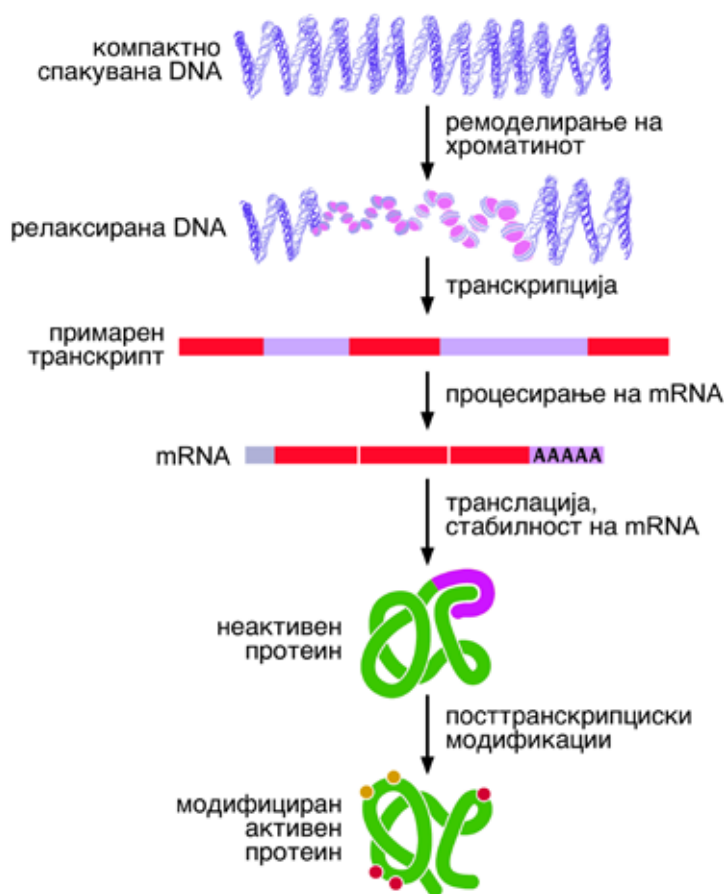
**Напомена:** негативните контролни механизми се прикажани со црвена боја и со накосен фронт (*italic*)

Контролата на генската експресија со регулаторни протеини не е својствена само за прокариотите. Покрај еукариотските организми, ваквата контрола ја користат и некои вируси (бактериофагите).

### 11.3 Регулација на генската експресија кај еукариотите

Неопходноста за регулација на генската експресија е клучна за клетката, која не треба непотребно да ги троши клеточните резерви и енергијата за синтеза на протеините кои што не и се потребни во определен момент. За разлика од прокариотските гени, кои се често групирани во транскрипциски единици - оперони, регулацијата на експресијата кај еукариотите се врши поединечно за секој ген посебно. Геномите на еукариотските клетки, типично, содржат по неколку десетици илјади гени, далеку повеќе отколку тие на прокариотите клетки. Кај повеќеклеточните организми, механизмите за регулација на генската експресија учествуваат и во клеточната диференцијација, ембриогенезата, органогенезата, хомеостазата и во многу други комплексни биохемиски и физиолошки процеси на ниво на организмот, во целост.

Шаблонот и динамиката на експресијата на поединечните гени кај различните клеточни типови и ткива во еукариотските организми се екстремно сложени. Во некои ткива и клетки, мал број гени мораат да бидат постојано активни, но, повеќето остануваат неактивни, додека уште помал број гени повремено се експримираат и



**Слика 11-8:** Поважни нивоа на кои се врши регулација на генската експресија кај еукариотите.

тоа со различен и променлив интензитет. Имено, определени, т.н. „домаќински“ гени (англ. *housekeeping genes*) кои кодираат протеини вклучени во основниот метаболизам и во одржување на елементарните животни функции на клетката (ензимите и протеините задолжени за клеточната респирација, гликолизата, обновувањето на клеточниот цитоскелет, на пример) се експримираат постојано во речиси сите клетки. Но, во хепатоцитите, на пример, се врши и транскрипција на голем број гени кои ги кодираат албуминот, коагулацискиот фактор VIII и на многу други протеини и ензими специфични исклучиво за клетките на црниот дроб.

Временскиот период на експресијата на гените е исто така клучен. Така, повеќето гени кои се неопходни во текот на ембрио-

генезата се целосно инактивирани кај адултните организми. Слично се однесува и на гените кои се инволвирани во клеточната диференцијација: тие активно се транскрибираат само при присуство на определени стимулирачки фактори: сигнални молекули и хормони. Гените кои не се транскрибираат се нарекуваат **потиснати** (или **стивнати**) гени.

За разлика од регулацијата на DNA-репликацијата, која генерално се одвива во јадрениот геном на принципот „сè или ништо“, регулацијата на генската експресија е различна за секој поединечен ген и, генерално, е многу посложена. Покрај квалитативната регулација (активен или неактивен ген) и временската регулација, експресијата на еукариотските гени се регулира и квантитативно што овозможува контрола и на количеството на синтетизирани протеини во клетката.

Воопштено, генската експресија кај еукариотите може да се регулира на неколку нивоа: пред транскрипцијата, во текот на транскрипцијата и по транскрипцијата, како и пред транслацијата, во текот на транслацијата и по транслацијата (**слика 11-8**). Регулацијата може да се врши и **епигенетски** (во буквален превод: над-генетски), и тоа преку ремоделирање на структурата на хроматинот.

## 11.4 Регулирање на транскрипцијата со ремоделирање на хроматинот

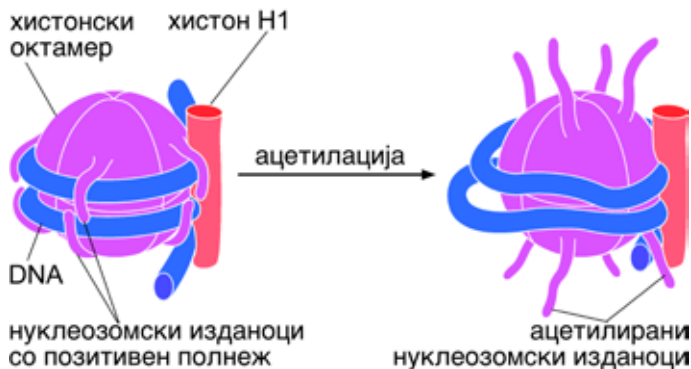
Промената на структурата на хроматинот и хромозомите, пред сè преку ацетирање на хистонските протеини, промена на степенот на кондензација на DNA со хроматинските и со другите протеини за пакување, како и метилирањето на DNA-молекулот, драстично влијаат врз генската експресија кај еукариотските клетки. Во литературата, овие процеси се опфатени со изразот **ремоделирање на хроматинската структура**.

Пакувањето на DNA-молекулите во нуклеозомски нишки и нивното натамошно кондензирање, ги прави гените физички достапни за RNA-полимеразата и останатата транскрипциска машинерија. Вака густо пакуваната структура на DNA се означува како **хетерохроматин** и, генерално, е транскрипциски неактивна. Спротивно на тоа, регионот од DNA-молекулот каде степенот на кондензираност и поврзаноста со хистонските и другите протеини е помала е транскрипциски поактивен и се опишува како **еухроматин**. Клеточната машинерија задолжена за регулирање на генската експресија мора да изврши релаксирање на хроматинот за да се овозможи достапност до самиот DNA-молекул и транскрипција на гените кои е потребно да се активни. Забележано е дека DNA-регионите кои се подготвуваат за транскрипција стануваат чувствителни за прекинување со ензимот DNаза I (се чита де-ен-аза). Овие секвенци од DNA-молекулот се лоцирани околу самиот ген кој ќе се транскрибира и се нарекуваат **региони хиперсензитивни кон DNаза I**. Се смета дека оваа промена се должи на олабавувањето на пакувањето со хистонските протеини.

**Ацетирањето на хистоните** е поврзано со активирање на гените, а деацетирањето со генско инактивирање (**слика 11-9**).

Друг транскрипциски регулаторен механизам може да дејствува врз цели хромозоми: **метилацијата** на цитозинските бази во DNA-молекулот (со што се созда-

ва 5-метилцитозин) може да го инактивира едниот X-хромозом кај жените, на пример, трансформирајќи го во транскрипциски неактивен **хетерохроматин**.



**Слика 11-9:** Ремоделирање на хроматинот преку ацетилирање на хистонските протеини од нуклеозомското јадро.

## 11.5 Транскрипциска регулација на генската експресија кај еукариотите

Од сите досега познати механизми за контрола на генската експресија во еукариотските клетки, најмногу проучено и, несомнено, многу важно е регулирањето на ниво на транскрипцијата.

Како што е веќе претходно опишано, за иницирањето на транскрипцијата, односно за правилно врзување на RNA-полимеразата со еукариотскиот промотор, неопходно е транскрипциските фактори најпрво да се асемблираат во транскрипциски комплекс (прединицијациски комплекс), а потоа да се поврзат со соодветниот промотор или со промоторите на генот.

Покрај тоа, кај протеин-кодирачките гени, покрај основниот (минимален) промотор, се наоѓаат и т.н. проксимални промоторни елементи, кои се лоцирани уште понатаму во спротиводна насока од нуклеотидот од кој започнува транскрипцијата на генот (најчесто на позициите меѓу -50 и -200 нуклеотиди кон 5'-насока).

Воопштено, транскрипциските фактори кои се врзуваат со основниот промотор се неселективни и се вклучени во транскрипцијата на гените кои се прилично рамномерно активни во сите клетки на мултицелуларниот организам. Наспроти тоа, проксималните промотори и транскрипциските фактори кои се врзуваат со нив, се задолжени за транскрипциската регулација која е специфична за различни клеточни типови и ткива. Важно е и што, иако општите транскрипциски фактори се есенцијални за процесот на транскрипција, самите не можат квантитативно да ја регулираат.

Оттаму, не зачудува што во секоја еукариотската клетка постојат илјадници транскрипциски фактори кои се строго специфични за препознавање и врзување со прецизни DNA-секвенци.

## Регулаторни DNA-елементи

Покрај промоторите, кај еукариотите се наоѓаат и посебни **регулаторни DNA-секвенци** кои се наоѓаат спротиводно (во 5'-насока) во близина на промоторот и со кои можат да се врзат посебни **регулаторни протеини** (поопширно за нив е објаснето подолу во текстот).

**Цис-регулаторен елемент** е нуклеотидна секвенца која ја регулира експресијата на гените лоцирани на **истиот линеарен DNA-молекул**, т.е. на истиот хромозом. Префиксот „цис-“ е од латинскиот збор *cis* кој значи: од иста страна. Цис-елементите се наоѓаат во промоторниот регион (во 5'-насока од генот кој го контролираат), но, и во интроните или во 3'-насока од генот. Цис-регулаторните елементи не кодираат протеински продукти, туку се места кои ги препознаваат протеините кои се врзуваат со DNA.

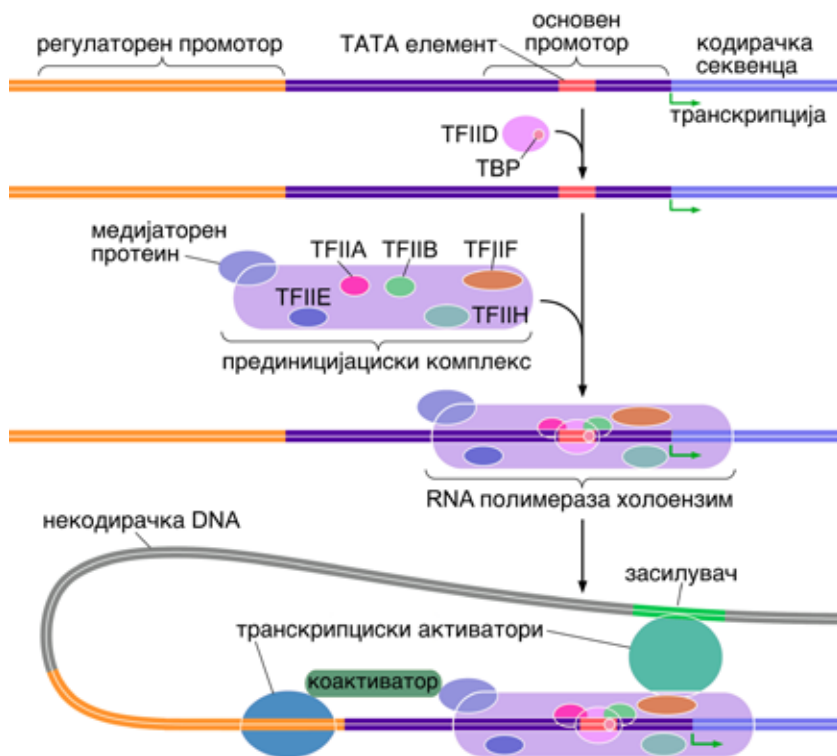
Наспроти нив, со изразот **транс-регулаторен елемент** се означува нуклеотидната секвенца лоцирана оддалечено или на друг DNA-молекул (на друг хромозом), која ги кодира самите транскрипциски фактори и останатите регулаторни протеини. Изразот потекнува од латинскиот збор: *trans* што означува: од спротивна страна. Функционално, транс-регулаторните елементи се слични со цис-елементите, бидејќи и тие се вклучени во регулацијата на генската експресија, но, основната разлика е во тоа што првите кодираат протеински продукт.

Во асемблирањето на прединицијацискиот комплекс и неговото врзување со промоторот учествуваат и **транскрипциските активатори**. Тоа се протеини со две функционални домени: **врзувачкиот доменот кој се врзува со DNA** ги препознава и се врзува со специфичните регулаторни DNA-секвенци, додека **активацискиот домен** се препознава и врзува со други транскрипциски фактори (каков што е TFIID, на пример). Овие протеини учествуваат во создавањето на основниот прединицијациски комплекс преку директно врзување на својот активациски домен со општите транскрипциски фактори или, индиректно, преку интеракција со посебни протеини наречени **медијатори** или **коактиватори**. Постојат голем број транскрипциски активатори кои се врзуваат со соодветните транскрипциски фактори. Покрај тоа, некои активатори и коактиватори, но, и некои од општите транскрипциски фактори, имаат инхерентна ацетилтрансферазна активност со која ја променуваат ацетилацијата на хистонските протеини и со тоа ја ремоделираат структурата на хроматинот.

Во некои протеин-кодирачки гени кај повеќеклеточните еукариоти се наоѓаат и регулаторни DNA-елементи кои се лоцирани на поголеми растојанија, понекогаш и до 100 000 базни пара (100 kB) подалеку, од кодирачката секвенца на генот. Регулаторната функција на овие елементи е експериментално потврдена со испитувања врз трансгеничните животни. Во принцип, овие елементи не се наоѓаат кај едноклеточните еукариотски клетки, какви што се тие на квасните габи, на пример.

Од регулаторните **DNA-елементи поставени на поголеми растојанија** од промоторот на генот досега најекстензивно проучени се следниве елементи: засилувачи, стивнувачи, изолатори, региони за контрола на локусот и региони за врзување со матриксот.

**Засилувачите** (англ. *enhancers*) и **стивнувачите** (англ. *silencers*) се регулаторни DNA-елементи поставени на растојанија од околу 700 - 1000 базни пара од промоторот на генот кој го контролираат (**слика 11-10**).



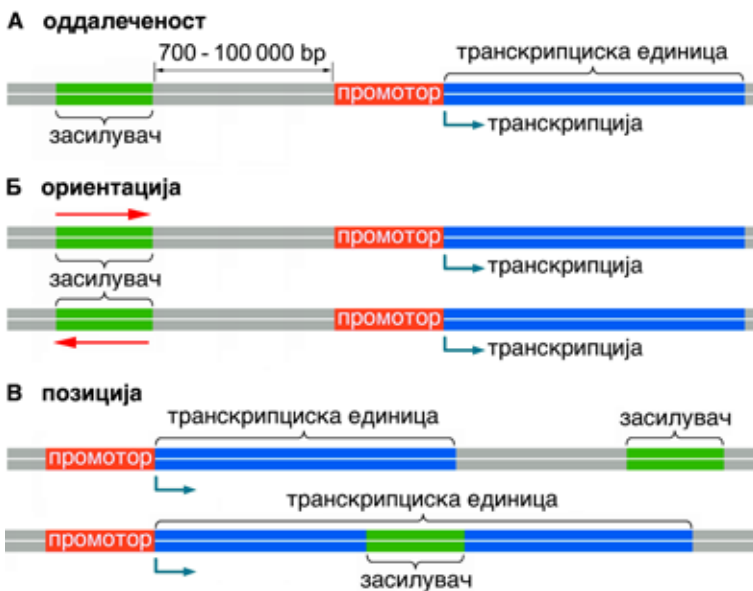
**Слика 11-10:** Улога на засилувачите, транскрипциските активатори и коактиваторите во стимулирањето на генската транскрипција. Засилувачките DNA-елементи можат да се наоѓаат на поголеми растојанија од кодирачката секвенца на самиот ген чија транскрипција ја засилуваат. Тие создаваат DNA-јамки со кои се овозможува физички контакт меѓу основниот промотор и основната транскрипциска машинерија (RNA-полимераза холоензим), од една страна, и секвенците на регулаторниот промотор и засилувачот со транскрипциските активаторни протеини, од друга страна.

Секвенцата на типичниот засилувачки елемент е со должина од околу 500 базни пара и содржи околу 10 места за врзување со соодветните транскрипциски фактори или со, претходно споменатите, транскрипциски активатори. По врзувањето, нивото на транскрипција на соодветниот ген може да се зголеми дури за 100 пати над нивото без засилувачот.

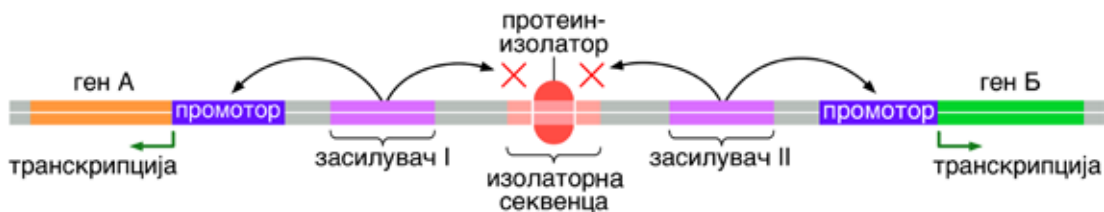
Спротивно, со секвенците на стивнувачите директно се врзуваат **репресорните протеини**, а во некои случаи и **корепресорните протеини**, со што вршат негативна регулација на транскрипцискиот процес. Засилувачите ја зголемуваат активноста на промоторите или неспецифично (во сите ткива на мултицелуларниот организам подеднакво) или специфично за секое ткиво. Некои се активни според стадиумот на ембрионскиот развој на организмот.

Интересно е што засилувачите во некои гени можат да бидат лоцирани спротивно или низводно од промоторот, но, и во некој од интроните на генот (**слика 11-11**).

**Слика 11-11:** Основни карактеристики на генските засилувачи. **А:** овие регулаторни елементи ја засилуваат транскрипцијата на големи растојанија од основниот промотор на генот. **Б:** засилувачите дејствуваат независно од ориентацијата на нивната нуклеотидна секвенца во однос на таа на промоторот и транскрипциската единица на генот. **В:** покрај најчестата поставеност спротиводно (во 5'-насока) од генскиот промотор, засилувачите можат да се најдат и низводно (во 3'-насока) од транскрипциската единица или во интроните на генот.



Поради големите растојанија од кои делуваат засилувачките DNA-елементи врз определени генски промотори, постои можност од непотребно засилување на транскрипцијата и врз други гени на кои засилувачот може да дејствува. Оттаму, во текот на еволуцијата се појавиле DNA-региони кои се нарекуваат **изолатори** (англ. *insulators*) или **гранични елементи** (англ. *boundary elements*), и кои го попречуваат несаканото стимулирање на транскрипцијата преку изолирање на соседните засилувачи и промотори (слика 11-12).



**Слика 11-12:** Пример за функцијата на генските изолатори. Врзувањето на соодветниот протеин-изолатор со изолаторниот DNA-елемент го попречува непотребното стимулирање на транскрипцијата од страна на соседниот засилувач I врз промоторот на генот Б и, *vice versa*, дејството на засилувачот II врз промоторот на генот А.

Сепак, треба да се има предвид дека егзактните молекуларни механизми со кои дејствуваат изолаторите не се доволно разјаснети.

Покрај оваа улога, изолаторите ја спречуваат и несаканата инактивација на некои гени и со друг механизам. Имено, гените не се еднакво распоредени по должината на целокупната DNA-секвенца што ја содржат геномите на повеќеклеточните еукариоти. Во определени делови од геномот (што зависи од секој вид поединечно), гените се густо поставени по должината на DNA-молекулот, додека во



други геномски региони гените се ретки и таму DNA-хеликсот е високо кондензиран во хетерохроматин. Хетерохроматинот има тенденција да се проширува на околните делови од DNA-молекулот, преку привлекување на протеините кои предизвикуваат кондензација. Изолаторните DNA-елементи, делуваат како одвојувачи кои го спречуваат непотребното привлекување на овие протеини, а со тоа и го превенираат натамошното проширување на хетерохроматинскиот регион и непотребната инактивација на гените.

**Регионите за контрола на локусот (LCRs, од англ. *locus control regions*)** се регулаторни DNA-секвенци кои обезбедуваат високо ефикасна активација на гените од определен локус (положба на хромозомот) и тоа на начин кој е специфичен за ткивото и од големи растојанија. Иако се откриени уште пред дваесетина години, екзактните молекуларни механизми на нивната активност не се доволно јасни. Сепак, кај трансгеничните глумци, експериментално е докажано дека LCR-елементите се неопходни за интензивна експресија на  $\beta$ -глобинскиот ген, на пример.

**Регионите за врзување со матриксот (MARs, од англ. *matrix attachment regions*)** се однесуваат на DNA-секвенците кои се клучни за врзување со јадрениот матрикс. Функцијата на овие секвенци не е само структурна, туку тие учествуваат и во регулацијата на генската експресија на тој начин што определени региони од DNA-молекулот ги прават достапни, или обратно, прикриени, за транскрипциската машинерија. Најголемиот број од останатите регулаторни DNA-елементи и соодветните протеини кои се врзуваат со нив се откриени при *in vitro* експерименти со користење на изолирана геномска DNA и прочистени протеини. Но, MAP-секвенците дејствуваат веројатно само во интактни јадра и се должат токму на високата структурна организација на хроматинот и на хромозомските „скелиња“. Оттаму, не е чудно што нивните прецизни механизми на делување се многу слабо проучени. Се претпоставува дека овие регулаторни елементи се инволвирани во регулацијата на генската експресија која е зависна од ткивната диференцијација и ембриолошкиот развој.

## Регулаторни протеини кои се врзуваат со DNA

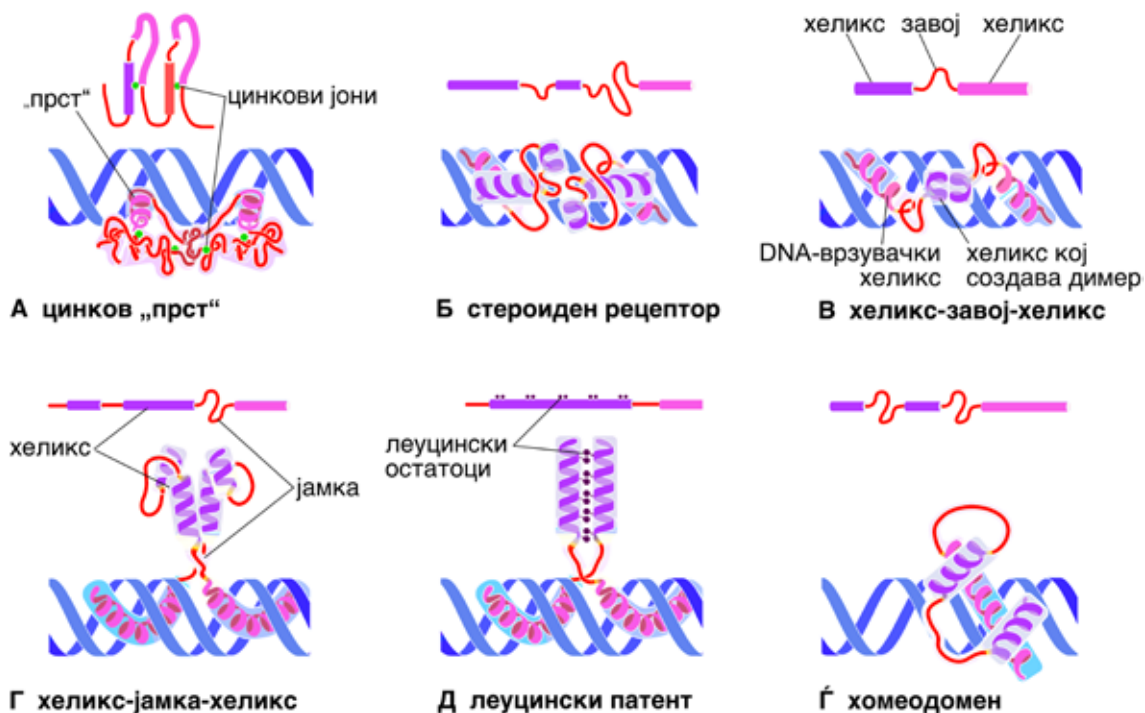
Како што е веќе потенцирано, за регулирање и координација на генската експресија кај еукариотските организми неопходно е врзување на посебни специјализирани регулаторни протеини со соодветните DNA-секвенци.

Во човековиот геном досега се идентифицирани околу 2600 протеини за кои се смета дека се транскрипциски фактори и за кои е заедничко што имаат способност за врзување со DNA. Всушност, пресметките укажуваат дека приближно 10% од хуманиот геном кодира транскрипциски фактори, па, тие претставуваат и најголема протеинска фамилија која е досега најдена во некој организам.

Заедничка особина на сите овие транскрипциски фактори е нивната можност за препознавање и врзување со специфични нуклеотидни секвенци во DNA-молекулите. Ваквата интеракција меѓу протеинот (транскрипциски фактор) и нуклеинската киселина (регулаторниот DNA-регион од определен ген) подразбира кооперативно врзување. При врзувањето директно учествуваат само делови од протеинскиот молекул и тоа не случајни региони, туку токму специфични мотиви кои се повторуваат кај повеќето транскрипциски фактори. Здружувањето на секундарните структури

во мотиви е клучно за молекуларното препознавање и за кооперативното врзување на транскрипциските фактори со строго специфични DNA-секвенци. Таквата просторна поставеност на секундарните структури овозможува прецизно препознавање (кое може да се спореди со препознавањето меѓу антигенот и антителото или врзувањето на лигандот со рецепторот) и врзување со соодветната регулаторна секвенца на генот. Покрај тоа, се смета дека со комбинирањето на неколку транскрипциски фактори истовремено се овозможува регулирање на толку многу гени во сложените геноми на вишите еукариотски организми.

Протеинскиот мотив наречен **цинков „прст“** првично е најден во општиот транскрипциски фактор TFIIIA кај *Xenopus leavis*, но, се наоѓа и кај некои транскрипциски фактори вклучени во регулацијата на ембриогенезата кај *Drosophila*, кај некои продукти на протоонкогените, кај определени фактори на раст и протеинските регулатори на клеточната диференцијација. Оттаму, не зачудува што мотивот



**Слика 11-13:** Структурни мотиви кај регулаторните протеини кои се врзуваат со DNA. **А:** мотивот на цинков прст кој содржи структура на јамка и  $\alpha$ -хеликс со по еден јон на цинк. **Б:** протеините кои се рецептори за стероидните хормони содржат мотив со два  $\alpha$ -хеликси поставени перпендикуларно, а секој од нив содржи по еден цинков јон и е опкружен со по четири бочни групи од цистеинските остатоци. **В:** мотивот на хеликс-завој-хеликс е составен од два  $\alpha$ -хеликса раздвоени со завој. По два вакви домена создаваат функционален димер кој може да се поврзе со DNA-молекулот. Овој мотив често се наоѓа кај протеините што ја регулираат експресијата на гените инволвирани во ембриогенезата. **Г:** мотивот на хеликс-јамка-хеликс се јавува кај протеините кои ја регулираат експресијата на гените од имунолошкиот систем. **Д:** мотивот на леуцински патент е присутен кај еукариотските транскрипциски фактори кои ја регулираат експресијата на гените задолжени за клеточната делба. **Г:** хомеодоменот е составен од три последователни  $\alpha$ -хеликси и се наоѓа во еукариотските регулаторни протеини.

на **цинков „прст“** се наоѓа кај една од главните фамилии на еукариотски транскрипциски фактори. Јоните на цинк се вклучени во постигнувањето и одржувањето на структурата на овој карактеристичен протеински мотив, по што и го добил името (**слика 11-13, А**). Протеинскиот мотив кој го имаат **рецепторите за стероидните хормони** е составен од по два  $\alpha$ -хеликси поставени под прав агол. Откога ќе се поврзе со соодветниот стероиден хормон, овој протеин се врзуваат со големиот жлеб и со скелетот на DNA-молекулот и тоа со специфични секвенци на определени гени (**слика 11-13, Б**). Протеините кои учествуваат во регулацијата на гените вклучени во ембриогенезата на мултицелуларните организми често содржат мотив означен како **хеликс-завој-хеликс** кој е составен од две  $\alpha$ -хеликални структури раздвоени со кус полипептиден завој долг само неколку аминокиселински остатоци (**слика 11-13, В**).

Интересно е што овој мотив е често присутен и кај бактериските регулаторни протеини кои се врзуваат со DNA. Мотивот **хеликс-јамка-хеликс** е чест кај регулаторните протеини кои се вклучени во координацијата на гените кои имаат функција во имуниот одговор кај вертебралните организми. Составен е од  $\alpha$ -хеликс, по кој следи слободна полипептидна јамка, па, повторно  $\alpha$ -хеликс (**слика 11-13, Г**). Друг тип регулаторни протеини кои имаат улога на транскрипциски фактори кои ја регулираат експресијата на гените задолжени за клеточниот циклус содржат мотив составен од два паралелно поставени  $\alpha$ -хеликси, меѓусебно нековалентно поврзани со леуцинските остатоци од двата хеликса. Овој протеински мотив се нарекува **леуцински „патент“**, по аналогија на патент за заклопување (**слика 11-13, Д**). Мотивот наречен **хомеодомен** е присутен во еукариотските регулаторни протеини и содржи три  $\alpha$ -хеликални структури со вкупна должина од околу 60 аминокиселински остатоци од кои голем број се базични аминокиселини (аргинин и лизин) (**слика 11-13, Ѓ**). Откога со својата високо конзервирана секвенца ќе ја препознае специфичната нуклеотидна секвенца, едниот од трите  $\alpha$ -хеликси се врзува со големиот жлеб на DNA-молекулот.

## 11.6 Координирана експресијата на гените

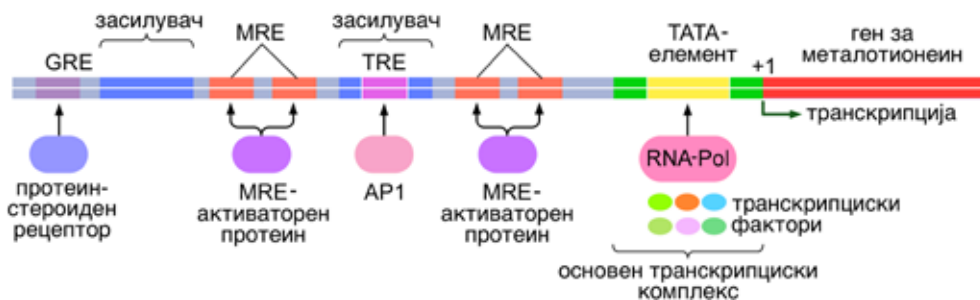
Во повеќето ткива кај еукариотите се транскрибира само од мал број од гените во геномот, при што специфичната комбинација на транскрипциски фактори го определува нивото на транскрипција на конкретните гени. Иако еукариотските гени не се групирани во оперони, сепак, експресијата на некои гени кои учествуваат во определени физиолошки или биохемиски процеси е индуцирана од иста стимулација и може да е оркестрирана со меѓусебни интеракции на генските продукти и регулаторните елементи.

Кај прокариотите, гените кои кодираат протеински продукти вклучени во исти метаболични процеси се организирани во оперони. Со тоа, еден единствен регулаторен елемент ја активира нивната координирана транскрипција. Но, кај еукариотите не постои таква полицистронска организација, па, експресијата на неколку гени за кои е потребна координирана регулација мора да се врши со посебни и по-комплексни механизми. Покрај тоа, некои од гените за кои е потребна истовремена експресија, можат да се наоѓаат на поголеми геномски растојанија или да се лоцирани на различни хромозоми. Координацијата може да се постигне ако овие различни

гени имаат исти секвенци (регулаторни промотори или засилувачки елементи), со кои се врзуваат едни исти регулаторни протеини. Во тој случај, транскрипцијата на еден единствен регулаторен протеин ќе предизвика експресија на сите гени кои имаат регулаторна секвенца со која може да се врзе тој регулаторен протеин.

Координираната регулација на генската експресија со DNA-елементите со повратен одговор може да се опише со примерот на хуманиот ген за металотионеин *hMTIIA* (од англ. *human metallothionein IIA*). Овој ген го кодира нискомолекуларниот протеин **металотионеин** чија основна улога е да ги врзува и да ги отстранува тешките метали од клетките. Металотионеинот е невообичаено богат со цистеински остатоци и се наоѓа во многу широк спектар на таксономски категории на организми (кај бактерии, квасни габи, растенија и животни). Генот *hMTIIA* кај човекот е најмногу експримиран во клетките на црниот дроб и на бубрезите и очигледно ги штити од прекумерното количество на тешките метали и од оксидативниот стрес. Имено, јоните на некои тешки метали предизвикуваат врзување на соодветниот активаторен протеин со секвенцата MRE што доведува до засилена транскрипција на генот *hMTIIA*.

Во клетките на вишите повеќеклеточни организми, врзувањето на основната транскрипциска машинерија со TATA-елементот на основниот промотор на металотионеинскиот ген доведува само до незначително, основно ниво на транскрипција, а со тоа и експресија во отсуство на метални јони. Но, присуството на јони на тешките метали (кадмиумови или цинкови, на пример) предизвикува значително стимулирање на транскрипцијата на генот за металотионеин. За таквата транскрипциска активација се задолжени неколку копии на **цис-регулаторниот (попрецизно: засилувачки) елемент кој реагира на метални јони (MRE, од англ. metal response element)** кои се наоѓаат дистално (кон 5'-насока, спротиводно) од основниот промотор (слика 11-14).



**Слика 11-14:** Координирање на експресијата на металотионеинскиот ген во еукариотските клетки. Шематски е прикажан регулаторниот дел од генот кој содржи повеќе цис-регулаторни елементи. Покрај врзувањето на општите транскрипциски фактори и RNA-полимеразата со TATA-елементот (основен транскрипциски комплекс), транскрипцијата на генот за металотионеин е регулирана и со поголем број MRE-елементи со кои можат да се врзат MRE-активаторните протеини. Поединечниот сигнал, какво што е експонирањето на јоните на тешките метали, предизвикува активаторниот протеин MRE да се врзе истовремено со повеќе места во промоторите и засилувачите на повеќе е оддалечени гени и со тоа координирано ја активира нивната експресија. Кратенките се опишани во текстот.

Покрај овие елементи, транскрипцијата на металотионеинскиот ген регулирана и со други засилувачи. Така, со засилувачкиот **елемент кој реагира на тироидни хормони (TRE, од англ. thyroid response element)** се врзува протеинот AP1 при присуство на форбол естри. Со **елементот кој реагира на глукокортикоиди (GRE, од англ. glucocorticoid response element)** се врзува кортикоидниот рецептор (доколку е претходно поврзан со соодветен кортикоиден хормон). Важно е да се истакне дека овие засилувачки секвенци функционираат како **реактивни елементи**. Имено, врзувањето на соодветен регулаторен протеин (транскрипциски фактор) со овие елементи предизвикува активирање или засилување на транскрипцијата на повеќе гени кои се вклучени во координираната регулација. За споредба, овој механизам е различен од оној кај бактериските оперони, каде гените се поредени еден по друг во оперон и се под контрола на единствен промотор.

Покрај овој, постојат и многу други примери за координирана генска регулација кај мултицелуларните организми. Вреден е да се спомне и, во дидактички цели, широко користениот пример за реакцијата на еукариотските клетки на прекумерно зголемената температура и други форми на стрес преку синтеза на **протеините на топлотниот стрес (HSP од англ. heat-shock proteins)**. Во човековиот геном се наоѓаат најмалку 20 различни гени кои кодираат протеини на топлотниот стрес. Нивната истовремена и координирана експресија се активира бргу по експонирањето на висока амбиентална температура преку синтеза на регулаторен протеин кој се врзува со еден ист регулаторен **елемент кој реагира на стрес (SRE, од англ. stress response element)** кој е присутен во сите гени кои ги кодираат HSP-протеините.

На тој начин, регулацијата на експресијата на поголем број гени е координирана истовремено, без оглед на нивната физичка блискост во геномот или на структурата и функцијата на самите гени. Присуството на иста DNA-секвенца во регулаторниот елемент (промотор или засилувач) во повеќе различни и оддалечени гени обезбедува координирана експресија, а со тоа се овозможени и комплексни биохемиски и физиолошки одговори кон различни стимулации и метаболични фактори кои се карактеристични за вишите организми.

## 11.7 Посттранскрипциска регулација на генската експресија кај еукариотите

Постојат повеќе начини со кои се регулира генската експресија дури и откако соодветниот ген е транскрибиран во RNA-молекул. Веќе опишаното алтернативно преспојување (сплајсинг) овозможува синтеза на различни протеини од еден ист ген, односно од ист примарен RNA-транскрипт. Во определени клеточни типови се фаворизира синтеза на само некој тип на протеини.

Иако повеќето хемиски модификации на примарниот транскрипт предизвикуваат нивна заштита и продолжување на времето на полуживот, сепак крајната судбина на зрелите mRNA-молекули е нивна целосна, но, контролирана деградација. Имено, доколку mRNA-молекулите би останувале предолго во цитоплазмата на еукариотските клетки, синтезата на протеинот кој го кодираат би течела теоретски неограничено, со што регулацијата на генската експресија не би имала никаква смисла. Брзината со која зрелите mRNA-молекули се деградираат, всушност, е еден од

начините со кои се контролира и експресијата на соодветниот ген. За разлика од двоверижната DNA, едноверижните RNA-молекули се хемиски мошне нестабилни и се подложни на хидролитичка деградација со **рибонуклеази**, ензими кои се присутни во цитоплазмата и во лизозомите на сите клетки. Полувремето на живот на различните mRNA-молекули силно се разликува. Разликите во стабилноста (долговечноста) на mRNA-молекулите е уште еден механизам за посттранскрипциска регулација на нивото на синтезата на соодветниот протеин. Колку покус е полуживотот на определен mRNA-молекул, толку помало количество ќе биде синтетизирано од соодветниот протеин.

Во некои mRNA-молекули се наоѓаат посебни нуклеотидни секвенци богати со AU што, на некој начин, ги обележува да бидат брзо разградени со специфичен рибонуклеазен комплекс наречен **егзозом**. Сигналните протеински молекули какви што се факторите на раст, на пример, се синтетизираат по потреба, а потоа бргу се разградуваат. Молекулите на mRNA кои ги кодираат овие фактори на раст се исклучително нестабилни токму поради тоа што содржат региони со бројни AU-секвенци. Се претпоставува дека исклучително кусиот полуживот на овие mRNA-молекули е неопходен за прецизно регулирање на функцијата на протеините кои ги кодираат.

## 11.8 Регулација на генската експресија со мали RNA-молекули (микро-RNA и интерферирачки RNA)

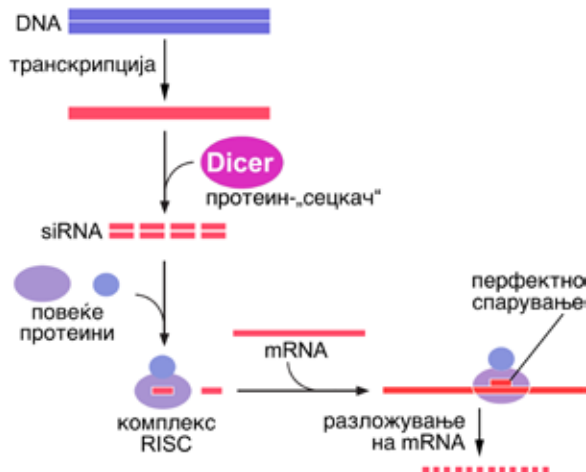
Во последниве десетина години се откриени повеќе типови на мали RNA-молекули со должина од 20-30 нуклеотиди кои имаат важна улога во генската регулација, ремоделирањето на хроматинот и други процеси. Особено интересен е механизмот за контрола на генската експресија преку создавање на RNA-молекули кои се комплементарни со соодветната mRNA и вршат нејзино специфично разложување или ја инхибираат транслацијата. Ваквата форма на посттранскрипциско потиснување на генската експресија со мали RNA-молекули се нарекува **RNA-интерференција (RNAi)** и постои кај сите досега испитувани анимални и растителни организми, а учествува во различни процеси какви што се ембриогенезата, малигните заболувања и многу други.

Откриени се две основни класи на мали функционални RNA молекули кои учествуваат во RNA-интерференцијата: микро-RNA (miRNA, од англ.: *micro RNA*) и малите интерферирачки RNA-молекули (siRNA, од англ.: *small interfering RNA*). Иако овие два вида RNA-молекули се разликуваат според начинот на добивање, имаат и голем број на заеднички карактеристики, а нивните функции значително се преклопуваат. На пример, и двете класи молекули имаат должина од околу 22 нуклеотиди. Малите микро-RNA се создаваат со специфично пресекување на mRNA-молекулите, како и од RNA-транспозоните и некои RNA-вируси. Понатаму, некои микро-RNA се синтетизираат преку транскрипција од DNA-секвенци кои ги кодираат (т.н. гени за микро-RNA), а други се кодирани во секвенци кои се наоѓаат во интроните и егзоните на mRNA молекулите. Во секој случај, и двете класи се создаваат со ограничена рибонуклеазна активност од едноверижни прекурзорни RNA-молекули кои имаат самокомплементарни секвенции, па спонтано создаваат структура во



форма на шнола која вклучува и двоверижен регион.

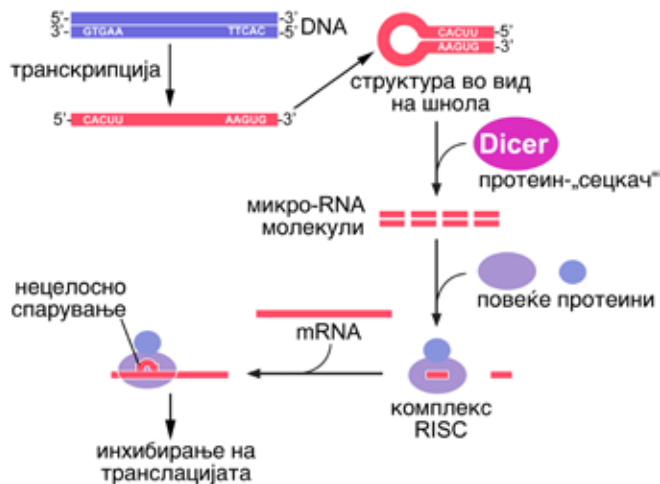
Малите интерферирачки RNA-молекули обично имаат целосна комплементарност со целните mRNA или DNA-секвенци, па потиснувањето на генската експресија го вршат на транскрипциско или посттранскрипциско ниво (слика 11-15).



**Слика 11-15:** Потиснување на генската експресија со куси интерферирачки RNA молекули. Транскрипцијата на генската секвенца која содржи инвертирана репетиција предизвикува превиткување на mRNA во форма на шнола во која постои регион на двоверижен молекул. Ензимскиот комплекс Dicer го препознава и го пресекува овој двоверижен регион создавајќи низа куси интерферирачки RNA молекули (siRNA). Едната од двете вериги на овие siRNA молекули и поголем број на специјализирани протеини формираат комплекс наречен RISC кој ги препознава mRNA-транскриптите од истиот ген и ги разградува, предизвикувајќи инхибиција на транслацијата.

За разлика од нив, микро-RNA-молекулите имаат делумна комплементарност со целните mRNA и експресијата на гените ја вршат преку инхибиција на транслацијата (слика 11-16).

Подолгите двоверижни RNA молекули прво се пресекуваат со ензимскиот комплекс наречен *Dicer* (од англискиот збор што значи сецкач), со што се продуцираат помали двоверижни фрагменти. Потоа, двоверижните RNA-молекули се препознаваат од страна на **RNA-индуцираниот потиснувачки комплекс (RISC)**, кој поседува RN-азна активност. По раздвојувањето на двете вериги од siRNA молекулот, RISC-комплексот се активира, специфично ја препознава и ја деградира целната mRNA.



Постојат хипотези дека феноменот на RNA-интерференција се појавил во текот на еволуцијата како механизам за интрацелуларна одбрана од вируси и транспозони во чија репликација се појавува двоверижна RNA.

**Слика 11-16:** Потиснување на генската експресија со микро-RNA молекули. Транскрипцијата на генската секвенца која содржи инвертирана репетиција предизвикува превиткување на mRNA во форма на шнола во која постои регион на двоверижен молекул. Ензимскиот комплекс Dicer го препознава и го пресекува овој двоверижен регион создавајќи низа микро-RNA молекули (miRNA). Едната од двете вериги на овие куси miRNA молекули и поголем број на специјализирани протеини формираат комплекс наречен RISC кој ги препознава mRNA-транскриптите од истиот ген и ги разградува, предизвикувајќи инхибиција на транслацијата.



## 11.9 Транслациска и посттранслациска регулација

Во една неодамна објавена студија биле споредени повеќе гени во клетките на квасните габи со цел да се утврди дали количеството на определен протеин е директно поврзано со количеството на соодветната mRNA во клетката. Кај околу една третина од неколкуте десетици испитани гени, била потврдена квантитативната поврзаност меѓу mRNA и протеините: поголемо количество mRNA-молекули резултира со поголемо количество синтетизирани протеини. Но, кај околу две третини од протеините не била најдена ваква поврзаност. Очигледно е дека концентрацијата на овие протеини во клетките се регулира преку фактори кои делуваат по синтезата на определена mRNA, т.е. на посттранскрипциско ниво.

Мамалиските клетки реагираат на некои стимулации со синтеза на **циклини**, протеини кои имаат клучна улога во регулацијата на клеточниот циклус. Ако mRNA-молекулот кој кодира циклин е присутен во цитоплазмата подолго време, циклинот ќе продолжи и понатаму да се синтетизира и кога не е потребно ниту пожелно. Неговото влијание може да предизвика целата клеточна популација да се дели несоодветно и неконтролирано, што може да допринесе за трансформација во неопластична (туморска) клетка.

Покрај стабилноста на mRNA, регулацијата на генската експресија може да се врши и на посттранслациско ниво преку контрола на полуживотот на самите протеински молекули, најчесто преку деградација посредувана со убиквитин.



# КУС ОСВРТ КОН МЕНДЕЛОВАТА ГЕНЕТИКА

## Глава 12

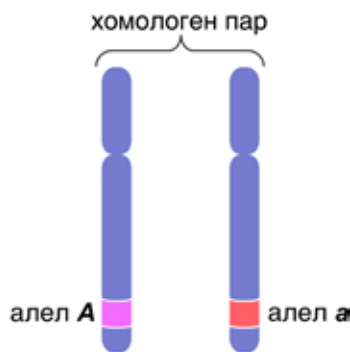
**П**роучувањето на преносот на гените од родителите врз потомците се означува како **класична, трансмисиска или Менделова генетика**. Воопштено, оваа дисциплина ги проучува наследените разлики во однос на фенотипските карактеристики меѓу различни организми и единки. Сè до развојот на техниките на молекуларната генетика, класичните генетичари главно ги проучувале морфолошките особини, каде разликите меѓу организмите се изразени во однос на бојата, формата, величината или некоја друга мерлива или видлива особина на организмот или на некој негов орган.

### 12.1 Основни концепти и терминологија во генетиката

Како што е претходно појаснето, **генот** е фундаментална структурна и функционална единица на наследувањето која го определува конкретниот фенотип или биолошка функција. На молекуларно ниво, генот е составен од целокупната DNA-секвенца која го кодира полипептидот или функционалниот RNA-молекул (какви што се tRNA rRNA и други). Во состав на генот се и контролните регулаторни секвенци (промотори) неопходни за транскрипција, бочните и непреводливите региони и интроните. Положбата на определен ген во хромозомот се нарекува **локус**. Генетските фактори денес се нарекуваат **алели** (кованица од: алтернативни форми на генот). Изразот алел обично е резервиран само за специфичната верзија на генот, додека изразот **ген** е повоопштен и се однесува на кој било алел од локусот.

Треба постојано да се има предвид дека, кај диплоидните организми, двете алели од локусот се лоцирани на двата хомоложни хромозома од истиот хромозомски пар (**слика 12-1**). На молекуларно ниво, разликата меѓу двете алели е во редоследот на нуклеотидите во регионот од генот, односно во DNA-секвенцата, па, за секој ген може да постојат поголем број различни алели. Од практични причини, само проме-

ните на нуклеотидната секвенца кои предизвикуваат видлива или мерлива промена на кодираниот фенотип во однос на најчестиот (див тип) во дадената популација, се означуваат како посебни алели.



**Слика 12-1:** Приказ на хомологните хромозоми кај диплоидните еукариотски клетки. Прикажани се еднохроматидните хромозоми пред репликацијата. Секоја верзија на определен ген (алел) може да биде идентична или да се разликува на двата хромозома.

Збирот на алелите кои ги поседува клетката или индивидуата се нарекува **генотип**, а за негово означување во генетиката се користат кратенките на имињата или симболите на соодветните алели. Диплоидните организми кои поседуваат по две идентични алели се означуваат како **хомозиготни** за тој локус, а ако двете алели се разликуваат, тогаш се **хетерозиготни** за локусот.

**Фенотипот** се однесува на видливите или на мерливите манифестации на некоја карактеристика какви што се: физичките, биохемиските, физиолошките, психолошките или некои други обележја.

Некои школи на генетика претпочитаат изразот **карактеристика (обележје)** да го користат за општите својства каква што е бојата на очите, додека за конкретната манифестација, каква што е сината или кафената боја на очите, го користат изразот фенотип или **особина**. Со изразот **див тип** се означува фенотипот или генотипот кој е најчест кај определена популација во природата и обично се означува со симболот плус (+) пред соодветната кратенка за алелот. Во големите популации на определени видови организми, може да постои повеќе од еден генотип со висока застапеност, што е основа за феноменот познат како **генетски полиморфизам**. Најчесто, генотипот на дивиот тип е хомозиготен, без генска мутација. Спротивно, индивидуите чиј генотип отстапува од дивот тип се нарекуваат **мутанти**.

Фенотипската особина која останува иста при наследувањето од родителската во првата филијална генерација се нарекува **доминантна**, додека таа која исчезнува се означува како **рецесивна**.

На пример, генотипот прикажан на **сликата 12-1** е хетерозиготен ( $Aa$ ), додека генотипот  $AA$  би бил доминантен хомозигот, а генотипот  $aa$  рецесивен хомозигот.

Кога истовремено е присутен во локусот, манифестацијата на доминантниот алел ја потиснува таа на рецесивниот.

Поедноставено од дидактички причини, фенотипските ефекти од комбинциите на алелите од определен локус на некој диплоиден организам се прикажани на **сликата 12-2**.

	кога дивиот тип е рецесивен, а мутантниот е доминантен		кога дивиот тип е доминантен, а мутантниот е рецесивен	
<b>диплоиден генотип</b>				
<b>фенотип</b>	див тип	мутантен	див тип	мутантен

**Слика 12-2:** Возможни комбинации на двете алели од определен локус кај диплоиден организам и нивниот фенотипски ефект во однос на дивиот и мутантниот тип.

Кусиот преглед на најважните изрази е прикажан во **табелата 12-1**.

<b>Табела 12-1: Дефиниции на основните изрази во генетиката</b>	
<b>ген</b>	DNA секвенца која кодира продукт (протеин или функционален RNA-молекул) и ја определува дадената карактеристика на молекуларно или повисоко ниво
<b>алел</b>	алтернативна форма на генот
<b>локус</b>	специфична положба на алелите во хромозомот
<b>генотип</b>	збир на алели кај индивидуата кои се од интерес за определена генетска анализа
<b>фенотип</b>	видлива или мерлива манифестација на генотипот
<b>хетерозигот</b>	постоење на две различни алели од локусот
<b>хомозигот</b>	постоење на две исти алели од локусот

Во принцип, фенотипот е директна манифестација на определен генотип, но, понекогаш, и надворешната средина има значително влијание. Оттаму е оправдано генотипот да се сфати како извесна рамка која го определува и ограничува фенотипот. Природата на наследувањето се протега во две крајности: некои особини се определени исклучиво со генотипот, па, надворешната средина нема никакво влијание врз нивното манифестирање, додека, спротивно, енвайронменталните фактори имаат голема улога врз други особини. На пример, формата на семињата грашок речиси исклучиво е определена со генотипот на растението. Наспроти тоа, факторите на надворешната средина, какви што се: достапноста на водата, минералите и сончевата светлина, имаат големо влијание врз височината на дабот, на пример, но, сепак, неговиот генотип ја определува крајната граница на особината. Дабот никогаш не може да достигне височина од 300 метри, без оглед на обемената застапеност на наведените фактори. Сепак, кај голем број особини, фенотипските манифестации се резултат на истовременото влијание и на гените и на надворешната средина. Исклучително е важно да се има предвид дека се наследува генотипот, додека фенотипот е само негова манифестација која не се пренесува врз следните генерации. Фенотипот може да биде определен и со комбинацијата на неколку гени, како и со влијанието на надворешната особина.

## Номенклатура на гените

Во однос на номенклатурата на гените, досега се направени повеќе обиди за воспоставување на меѓународно прифатени стандарди за означување на симболите и кратенките на гените. Имајќи предвид дека гените се проучуваат од аспект мна класичната генетика веќе еден век и половина, а од молекуларен аспект повеќе од 50 години, и дека се проучувани огромен број гени кај различни биолошки ентитети (вируси, бактерии, протисти, растенија, животни и луѓето) од страна на армија истражувачи, не зачудува неконзистентноста и разноликоста во номенклатурата. Досега, повеќе меѓународни научни здруженија организирале симпозиуми за оваа цел, а свои прирачници и препораки дале и некои реномирани списанија. На пример, според препораките на Комитетот за номенклатура на хуманите гени при Организацијата за хуманиот геном (HUGO, од англ. Human Genome Organisation), **имињата на гените** треба да се пишуваат со латински букви и со американски правопис, а на нив можат да се додадат и арапски броеви. Од друга страна, **симболите за гените**, т.е. алелите, кај луѓето треба да се пишуваат во накосен фронт (англ. *italic*) и, со големи латински букви или со нивни комбинации со арапски броеви (не со латински), по можност покуси од 6 карактери. Постојат многу дополнителни детали кои ги утврдуваат препораките, но, важно е дека генските симболи треба да се разликуваат од нивните генски продукти (најчесто протеини) кои, пак, треба да се пишуваат со исправени (регуларни) букви. На пример: генскиот симбол *ABCA1* се однесува на генот чие полно име е: АТР-врзувачка касета, супфамилија А (ABC1), член 1 (англ. АТР-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1). Слично, генот: галактозидаза алфа (англ. galactosidase, alpha) се означува со симболот: *GLA*.

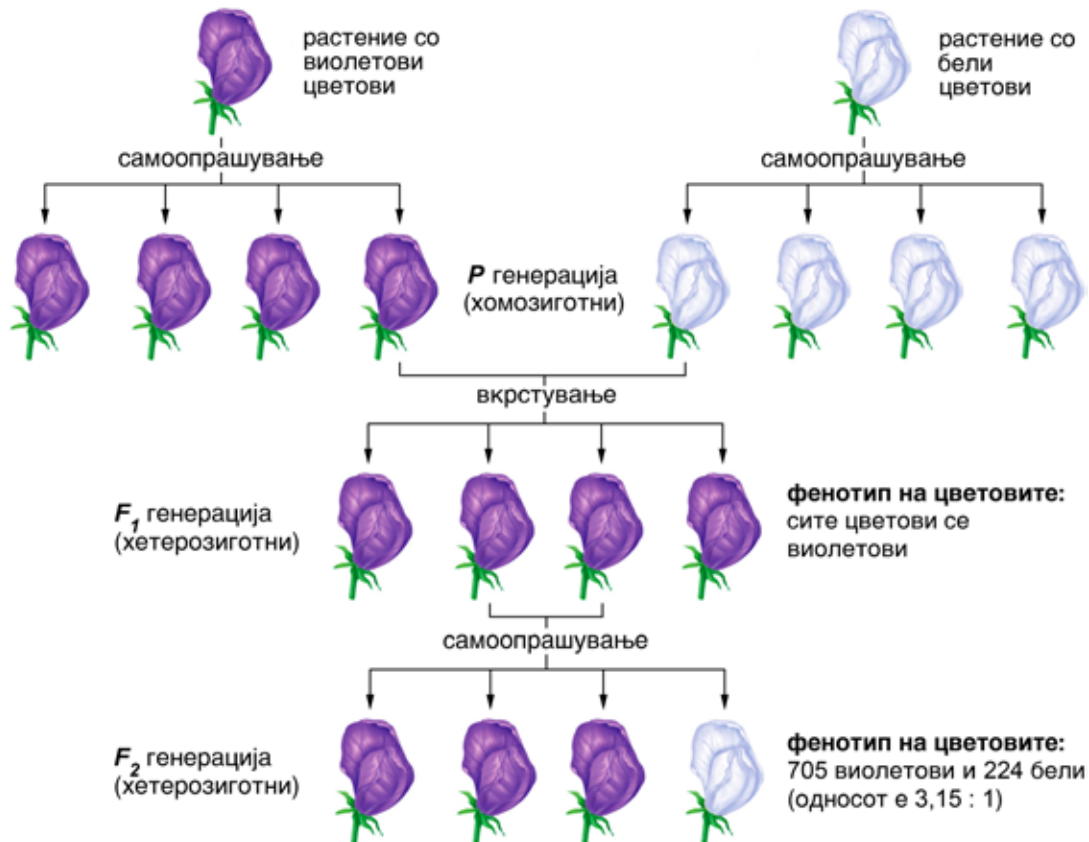
Сепак, постојат разлики во препораките за номенклатурата на симболите на гените според видот или таксономската категорија на организми. На пример, симболот за генот кој духовито е наречен „звучен еж“ (англ. *sonic hedgehog*) и кој е важен за органогенезата на сите вертебрати, кај човекот (*Homo sapiens*) е: *SHH*, кај глушецот (*Mus musculus*): *Shh*, а кај рибата-зебра (*Danio rerio*) е: *shh*. Кодираниот протеин се означува како: SHH, SHH и Shh, кај овие три организми, соодветно.

## 12.2 Монохбридни вкрстувања

Во своите оригинални истражувања, Мендел ги проучувал морфолошките особини на семињата, мешунките, цветовите и стеблата на грашокот (*Pisum sativum*). За да го спречи природното самоопрашување на плодникот од цветот со поленот на истиот цвет, Мендел ги отсекувал прашниците од цветовите на растението, со што обезбедил јасни и недвосмислени услови за експериментално вкрстување. Мендел ги започнал своите испитувања користејќи **монохбридни вкрстувања** меѓу родителски единки кои се разликувале според само една видлива особина. Единките кои се користени при првото вкрстување биле наречени родителска или **парентална** генерација (*P*), додека првата генерација единки **филијална генерација 1** (*F*<sub>1</sub>) (од латинскиот збор *filius* - син), втората како **филијална 2** (*F*<sub>2</sub>) итн. Со оглед на тоа што, при овие експерименти, се следи само една особина, наследувањето е означено како **монохбридно**. Поради тоа што градинарскиот грашок е полово растение, секое вкрстува-

ње може да се врши во две насоки, во зависност од тоа кој фенотип е присутен кај женскиот, а кој кај машкиот родител.

На **сликата 12-3** е прикажано т.н. **реципрочно вкрстување**: опрашувањето на плодникот на женска единка која има мазни семиња со поленот од машка единка со збрчкани семиња.



**Слика 12-3:** Шематски приказ на еден од оригиналните Менделови експерименти со градинарскиот грашок. Соодносот на бројот на единките со доминантен фенотип (виолетова боја на цветовите), наспроти тие со рецесивен фенотип (бели цветови) во втората филијална генерација ( $F_2$ ) е приближно 3 : 1.

Се покажало дека ваквото вкрстување резултира со потомство на единки кои имаат само мазни семиња. Исто така и опрашувањето на плодникот на женска единка со збрчкани семиња со поленот од машка единка со мазни семиња резултира со потомство на единки само со мазни семиња. Со тоа Мендел докажал дека наследувањето на тие особини не е зависно од полот на единките. Оттаму произлегува заклучокот дека ваквото реципрочно вкрстување има еднаков резултат кај потомството: се јавува само фенотипот кој доминира (во овој пример мазните семиња), па, таквиот фенотип се означува како **доминантен**, наспроти фенотипот (во овој пример збрчканите семиња) кој се според Мендел, се губи или потиснува, па, се означува како **рецесивен**.

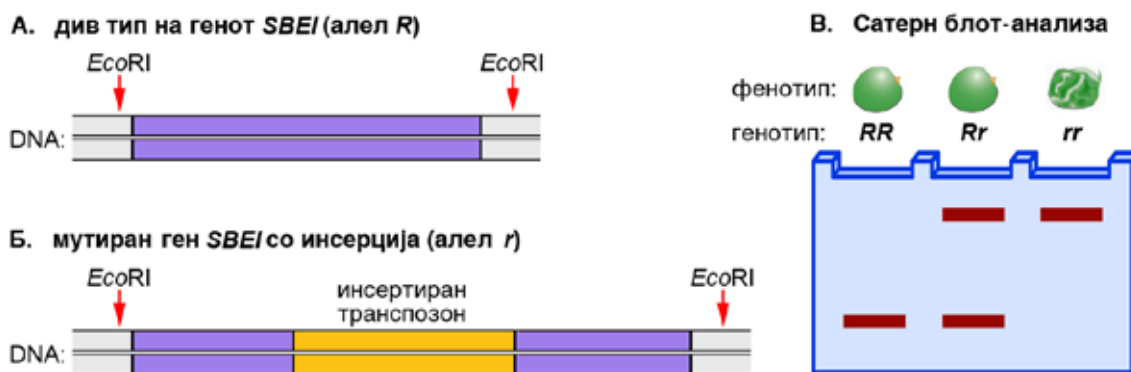


### 12.3 Молекуларен фенотип на формата на семиња грашок

Веројатно најпозната особина која Мендел ја опишал, а која е воедно и еден од најмногу користените примери кои се користат во едукативни цели, е формата на зрната грашок: мазни наспроти збрчкани. Денес е познато дека причината за збрчкувањето на семињата на грашокот е што тие нерамномерно дехидрираат. Наспроти тоа, процесот на дехидратација кај мазните зрна грашок е рамномерен. „Нормалниот“ или див фенотип (означен со голема буква), е резултат на експресијата на немутираниот, функционален алел *R* од генот *SBEI*, што го кодира ензимот SBEI (од англ. *starch-branching enzyme I*). Овој ензим е вклучен во синтезата на разгранетата молекуларна форма на скроб позната како амилопектин. Мутираниот, неактивен алел (означен со мала буква *r*) доведува до фенотип на збрчкани зрна поради отсуство на синтеза на амилопектинот и последователна нерамномерна дехидратација на семињата.

Нормалната функција на генот *SBEI* е нарушена со вметнување (инсерција) на DNA-секвенца означена како **транспозон** (мобилен елемент или „скокачки“ ген). Таквите DNA-секвенци се мобилни, т.е. се способни да се движат од едно на друго место во геномот, процес кој се означува како транспозиција. Молекуларните аспекти на мобилните елементи и механизмите на транспозицијата се објаснети подетално во главата 16: Геномика, а за целите на овој пример, најважно е дека инсерцијата на транспозоните во некој ген може да предизвика негова инактивација.

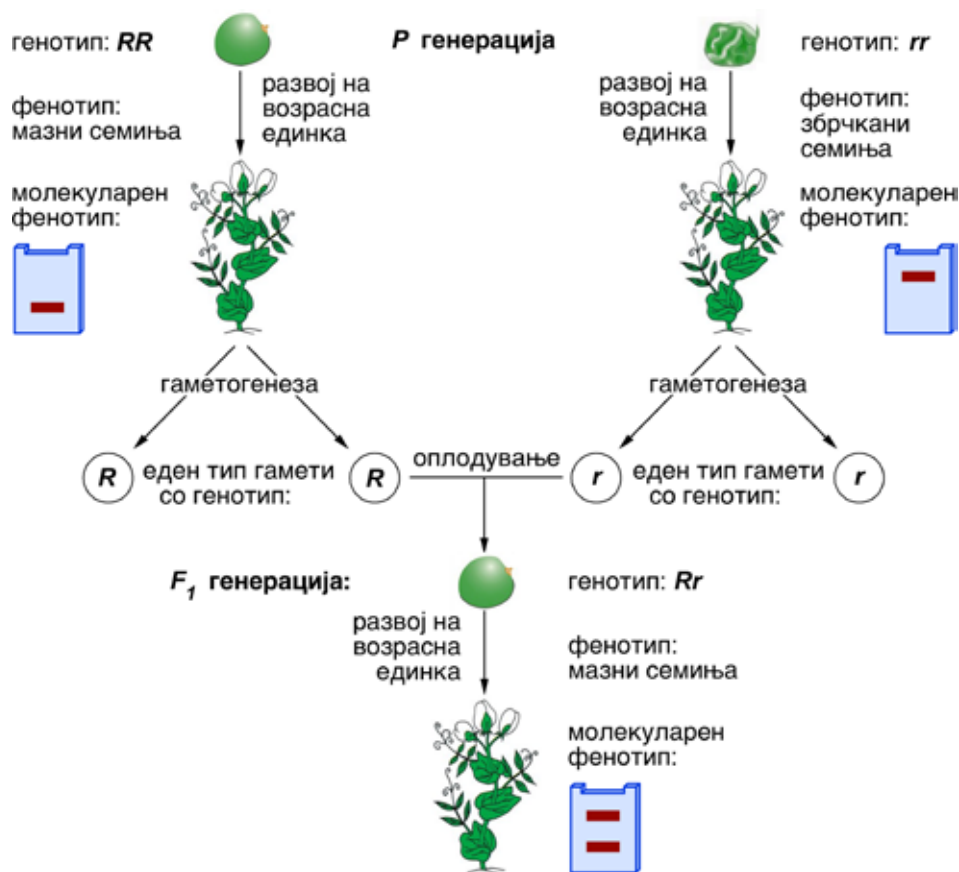
На **сликата 12-4** шематски е прикажана двоверижната DNA на која се наоѓа генот *SBEI* со немутираниот алел *R* и нефункционалниот, мутиран алел *r*. Означени се местата кај кои пресекува рестрикциската ендонуклеаза *EcoRI*, како и регионот кој е комплементарен со хибридациската DNA-сонда користена за Сатерн блотинг. При Сатерн блотинг анализата (опишана понатаму), се врши дигестија на ге-



**Слика 12-4:** Шематски приказ на генот *SBEI*. **A:** див тип на генот. **Б:** мутирана форма на генот во кој е вметнат транспозон со што е нарушена неговата функција. Со црвени стрелки се означени позициите кај кои пресекува рестрикциската ендонуклеаза *EcoRI*. **В:** шема на Сатерн блот анализата на DNA примероци од единка која е доминантен хомозигот (*RR*), хетерозигот (*Rr*) и рецесивен хомозигот (*rr*). Прикажани се фенотиповите на формата на семињата и соодветните генотипови. Молекуларниот фенотип се однесува на присуството на 1брзатав и на 1бавнатав електрофоретска лента поради разликите во должината на DNA-фрагментите со кои хибридува специфичната сонда.

номската DNA со ензимот *EcoRI*, по што DNA-фрагментите се раздвојуваат со електрофореза. Покусите DNA-молекули, т.е. фрагментите со помал број базни парови, патуваат кон анодата побрзо во однос на подолгите молекули. По електрофорезата, раздвоените DNA-молекули се пренесени врз нитроцелулозна или најлонска мембрана и детектирани преку хибридизација на соодветно обележана DNA-сонда која е комплементарна со регион од генот *SBE1*. На прикажаните Сатерн-блот анализи можат да се забележат DNA-фрагментите кои ги содржат алелите *R* или *r* (слика 12-4).

Поради инсерцијата, должината на DNA-фрагментот од алелот *r* е значително поголема, па, тој патува побавно во текот на електрофорезата, отколку DNA-фрагментот од немутираниот алел *R* кој е покус и електрофоретски побрз. На сликата 12-5 се гледа дека мазните семиња со генотип *RR* (доминантен хомозигот), имаат



**Слика 12-5:** Шематски приказ на генотиповите, морфолошките и молекуларните фенотипови на формата на семињата на грашокот при вкрстување на дивиот и мутираниот тип. Прикажани се и Сатерн блот анализите од секоја единка. Поради помалата должина на дивиот тип на генот *SBE1*, на Сатерн блотот од растението со генотип *RR* постои „брза“ електрофоретска лента, додека, спротивно на тоа, кај инактивираниот ген (инсерција) кај растението со генотип *rr* видлива е „бавната“ лента. При анализата на хетерозиготните растенија (*Rr*) се јавуваат и двете електрофоретски ленти.

молекуларен фенотип со само една „брза“ електрофоретска лента (англ. *band*). При Сатерн блот анализата, мазните семиња со генотип  $Rr$  (хетерозиготи), имаат две електрофоретски ленти на, кои одговараат и на двете алелни форми: на дивниот тип и на мутираниот алел (во кој е инсертиран транспозонот). Збрчканите семиња, кои се генотипски рецесивни хомозиготи ( $rr$ ), имаат молекуларен фенотип со само една „бавна“ електрофоретска лента. Според морфолошкиот фенотип (мазни или збрчкани семиња), алелот  $R$  е доминантен, па, се манифестира и во хомозиготна ( $RR$ ) и во хетерозиготна состојба ( $Rr$ ), наспроти рецесивниот алел  $r$ , кој се манифестира само во хомозиготна состојба ( $rr$ ). Споредувањето на морфолошкиот и молекуларниот фенотип е дидактички многу корисно при проучувањето на Менделовите закони на наследувањето.

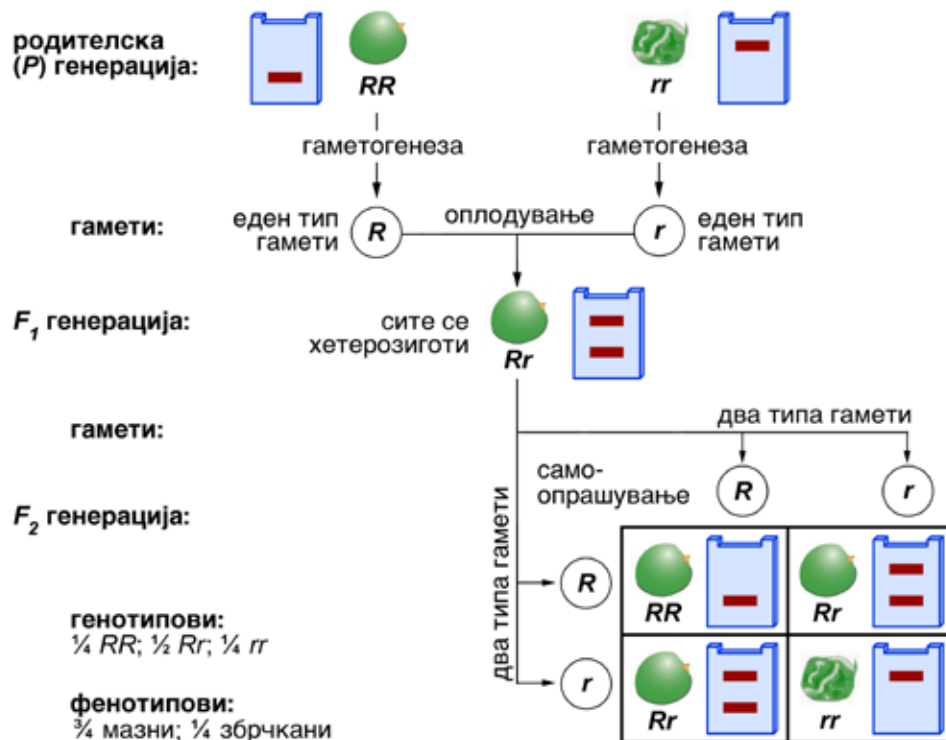
## 12.4 Принцип на сегрегација - прв Менделов закон

Во претходниот пример (слика 12-5), сите единки во генерацијата  $F_1$  се со доминантен фенотип (мазни семиња). Генотипски, тие се хетерозиготи, а исто така се хетерозиготи и во однос на молекуларниот фенотип (присутни се и двете електрофоретски ленти). При оригиналните Менделови експерименти, кога единките од генерацијата  $F_1$  се развиле во возрасни, полово зрели, растенија, тој извршил вештачкото опрашување меѓу нив. Во така добиената генерација  $F_2$ , забележал дека бројот на единки со доминантниот фенотип е приближно 3 пати поголем од бројот на единките со рецесивен фенотип. Соодносот на фенотиповите бил 5474 : 1850 (приближно 3 : 1). Ваквиот математички сооднос е толку многу прецизен само доколку се следат фенотиповите кај статистички значаен број на единки од генерација  $F_2$ . Во спротивно, случајноста доведува до големи отстапувања од очекуваниот сооднос, па, затоа ваквите експерименти имаат смисла само кај видови кои можат да создадат многу-бројно потомство, какви што се цветните растенија и некои инсекти, на пример.

Соодносот 3 : 1 на доминантниот, наспроти рецесивниот, фенотип во генерацијата  $F_2$  е главна карактеристика на монохбридното Менделово наследување. Споредувањето на фенотипот на формата на семињата грашок, со молекуларниот фенотип, како и на гаметогенезата и на оплодувањата кај генерациите  $F_1$  и  $F_2$ , се прикажани шематски на слика 12-6. Важно е да се забележи дека во гаметите на диплоидните организми секогаш има само по една од двете алели (во овој пример или  $R$  или  $r$ ), а никогаш двете истовремено, затоа што во гаметите има само по еден хромозом (хроматида) од секој хромозомски пар. Оттаму, постои 50% статистичка веројатност дека во секоја гамета од единките на  $F_1$  генерацијата може да се најде една од алелите кои се следат кај монохбридното наследување.

Генотиповите и фенотиповите на единките во генерацијата  $F_2$  се прикажани во табеларна форма која се нарекува Панетова мрежа, во чест на Британскиот математичар и генетичар Панет (Reginald Punnett). Таквиот табеларен приказ е особено корисен кога има поголем број можни комбинации на вкрстување на гаметите (на пример, 16 комбинации).

Поради повторната појава на рецесивниот морфолошки фенотип (збрчкани семиња) во генерацијата  $F_2$ , Мендел заклучил дека алелот за оваа особина бил прикриен во единките од генерацијата  $F_1$ . Еднакви резултати се добиваат и при вкрстено оплодување (доминантна особина кај машката и рецесивна особина кај женската ин-



**Слика 12-6:** Шематски приказ на резултатите од монохбридното оплодување во  $F_1$  и во  $F_2$  генерација. Прикажани се генотиповите, морфолошките фенотипови на семињата грашок и нивните молекуларни фенотипови (Сатерн блот анализи).

дивидуа, како и обратно), па, на претходните слики не е означен полот на единките од родителската генерација.

Мендел претпоставил дека, иако растенијата од првата филијална генерација го наследуваат фенотипот од само едниот родител, тие сепак мораат да ги содржат генотиповите и од двата родители. Само така е возможно овие родители да ги определат фенотиповите на потомците од  $F_2$  генерацијата. Имено, појавата на единки со мазни семиња грашок, но, и со збрчкани, во втората филијална генерација, можела да се објасни само под претпоставка дека единките од  $F_1$  генерацијата поседуваат генетски фактори (алели) и за мазни и за збрчкани семиња. Оттаму произлегува дека гените (според Мендел - наследните фактори или детерминанти) се присутни во парови, т.е. секоја индивидуа има по две копии (алели) од секој поединечен ген. Од тие причини, Мендел заклучил дека секое растение мора да поседува по два генетски фактора за секоја особина.

Оттаму, произлегува и **принципот на сегрегација**, кој понекаде се означува и како **прв Менделов закон**: при создавањето на гаметите, алелите (според Мендел - херeditарни фактори или детерминанти) се **раздвојуваат (сегрегират)** на таков начин што секоја гамета има еднаква шанса да содржи по една од двата типа алели. Имено, секоја репродуктивна клетка (гамета) од една индивидуа содржи само по еден алел

од секој ген (т.е. или  $R$  или  $r$ , од претходниот пример). При процесот на создавање на гаметите (гаметогенеза), секоја поединечна гамета има еднаква веројатност да содржи која било од двете алели од определен ген (статистички, половина од гаметите содржат  $R$ , а половина  $r$  алели, од претходниот пример). Спојувањето на машките и женските репродуктивни клетки (гамети) е случаен процес кој повторно ги здружува алелите во парови.

За верифицирање на своите заклучоци, Мендел направил и контролни вкрстувања на рецесивен  $rr$  со хетерозиготен родител  $Rr$  и забележал дека половина од потомството има доминантен фенотип (мазни семиња), а половина рецесивен (збрчкани семиња). Ваквите контролни вкрстувања се екстремно корисни во генетиката.

## 12.5 Принцип на независна распределба - втор Менделов закон

Покрај формата на семињата грашок, Мендел ја испитувал и нивната боја која е определена со ген што може да има три комбинации алели. Генотипот на растенијата со жолти семиња може да биде или доминантен хомозигот ( $YY$ ) или хетерозигот ( $Yy$ ), додека тие со зелени семиња се рецесивни хомозиготи ( $yy$ ). Оттаму произлегува дека жолтата боја на семињата е доминантна, наспроти зелената која е рецесивна.

Од денешен аспект, секвенционирањето на двете алели  $Y$  и  $y$  покажува дека тие се речиси идентични, односно дека од неколкуте илјади базни пара кои ги содржи овој ген, двете алели се разликуваат само со по една или по неколку базни парови.

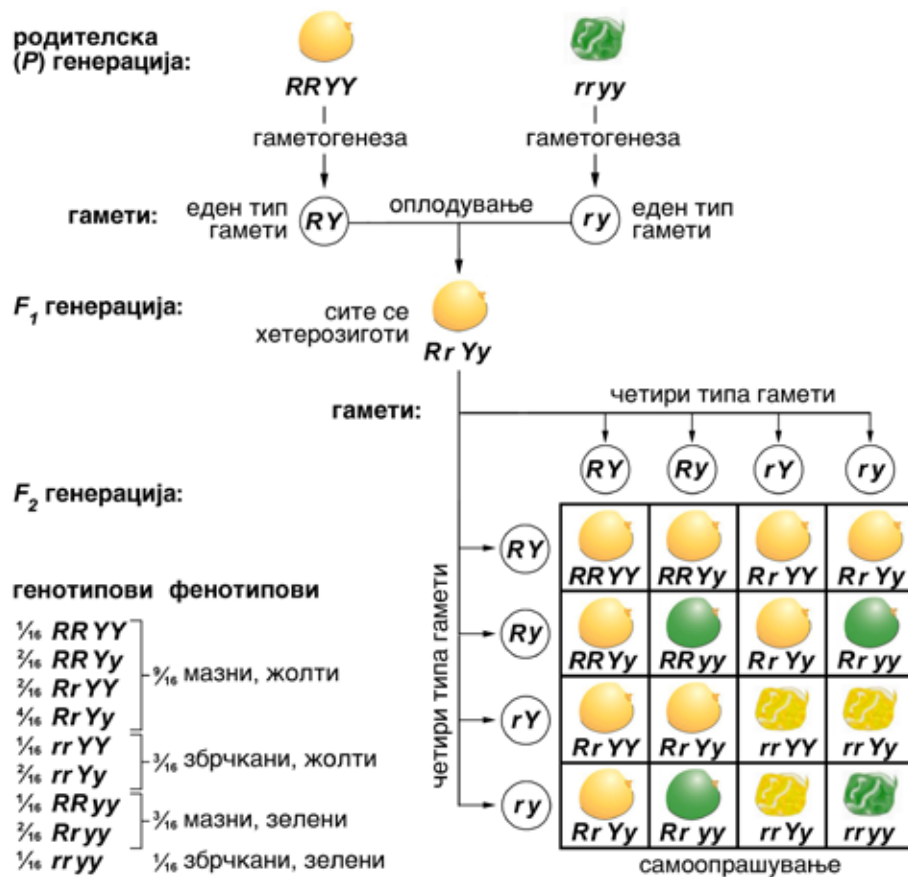
Откога Мендел утврдил дека алелите на секој од испитуваните гени сегрираат независно една од друга во текот на вкрстувањата, се заинтересирал дали истиот принцип се однесува и кога истовремено се следат две наследни карактеристики (два гена). За да го испита тоа со својот генетски модел на грашок, Мендел најпрво одгледал чисти сорти на грашок кои се разликувале само по две фенотипски карактеристики, при што биле следени растенија кои биле хомозиготни и за двете својства: едниот родител фенотипски бил со мазни и жолти семиња (генотип  $RRYY$ ), а другиот родител фенотипски бил со збрчкани и зелени семиња ( $rryy$ ).

Ваквите вкрстувања се означуваат и како **дихибридни**, а потомците во  $F_1$  генерација се нарекува **дихибриди** и сите се хетерозиготни за двата следени гена ( $RrYy$ ). За да го испита наследувањето во генерацијата  $F_2$ , Мендел меѓусебно ги вкрстувал хетерозиготите од генерацијата  $F_1$  при што се добиле повеќе комбинации на фенотипови. Наследувањето при кое истовремено се следат овие две особини на семињата грашок (форма и боја) се прикажани шематски на **слика 12-7**.

Како што и се очекувало, сите индивидуи од  $F_1$  генерацијата биле хетерозиготи, со фенотипски карактеристики на доминантните особини определени од двата гена. Но, нумеричката и математичката анализа на единките од двете генерации на дихибридно вкрстување во  $F_2$  генерацијата покажале покомплицирани соодноси на фенотиповите и генотиповите.

Од Панетовата мрежа може да се забележи дека односот на броевите на единки чии семиња фенотипски се: мазни и жолти, збрчкани и жолти, мазни и зелени, и збрчкани и зелени е  $9 : 3 : 3 : 1$ . Ваквиот сооднос на фенотиповите е карактеристика

за  $F_2$  генерацијата при дихибридно наследство. Независната сегрегација на  $R$  и  $r$ , и на  $Y$  и  $y$  алелите во текот на гаметогенезата овозможува еднаква статистичка веројатност од постоење на сите комбинации во половите клетки. Оттаму произлегува дека алелите од секој од двата гена чии особини се следат, независно се распределуваат во гаметите, според случајно комбинирањето. Гените кои, при гаметогенезата, се распределуваат независно еден од друг, се нарекуваат **неврзани гени**, спротивно на гените кои, поради физичката близина на истиот хромозом, се наследуваат врзано еден со друг.



**Слика 12-7:** Шематски приказ на резултатите од дихибридно наследство во  $F_1$  и во  $F_2$  генерацијата. Прикажани се генотиповите и морфолошките фенотипови на семињата грашок, како и нивниот броен сооднос.

Растенијата кои се двојни хетерозиготи продуцираат четири типа на гамети (во однос на двата следени гена):  $RY$ ,  $Ry$ ,  $rY$  и  $ry$ , и тоа со еднаква фреквенција, додека рецесивниот хомозигот создава само еден тип на гамети:  $ry$ . Оттаму, можните генотипови на потомството се:  $RrYy$ ,  $Rryy$ ,  $rrYy$ , и  $rryy$ , и исто така имаат еднаква статистичка веројатност.



Од овие експерименти, изведен е уште еден фундаментален принцип на наследувањето, кој во чест на Мендел се означува и како **втор Менделов закон** или **принцип на независна распределба**: различните парови на алели (од два различни гена) се **распределуваат независно** еден од друг во гаметите. Овој закон важи само за гени кои се наоѓаат на различни (нехомологни) хромозоми. Тие гени можат независно да се рекомбинираат во текот на мејозата. Веројатно е чиста случајност што, при своите експерименти, Мендел испитувал парови на гени кои се лоцирани на различни хромозоми, кои независно се рекомбинираат и раздвојуваат при мејозата во текот на гаметогенезата. Современото преформулирање на вториот Менделов закон би било дека гените кои се лоцирани на различни хромозоми се распределуваат независно во текот на мејозата. Хипотезата за независната распределба може да се провери со контролно вкрстување меѓу двоен хетерозигот и рецесивен хомозигот.

## 12.6 Молекуларни аспекти на доминантноста и рецесивноста

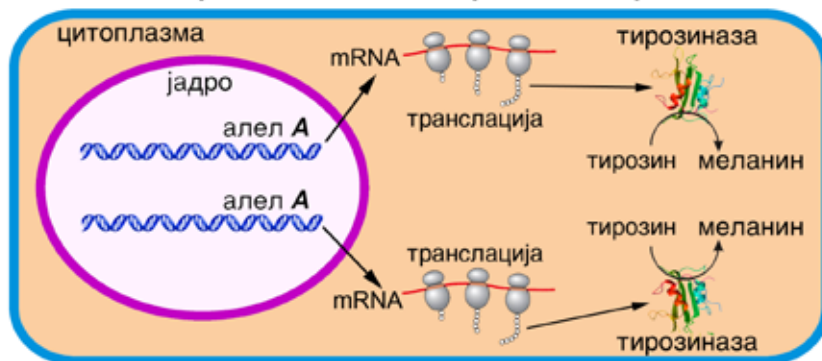
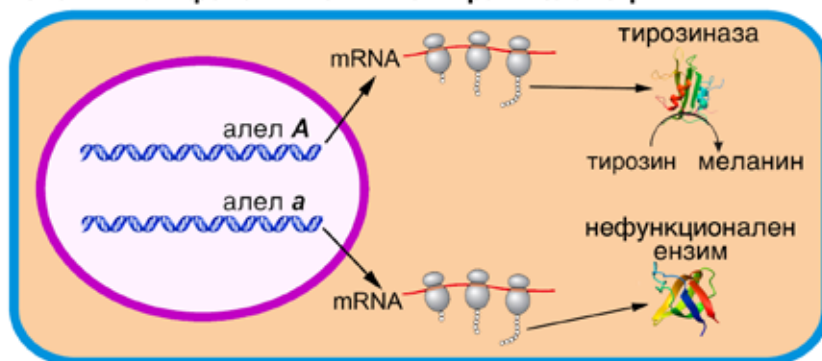
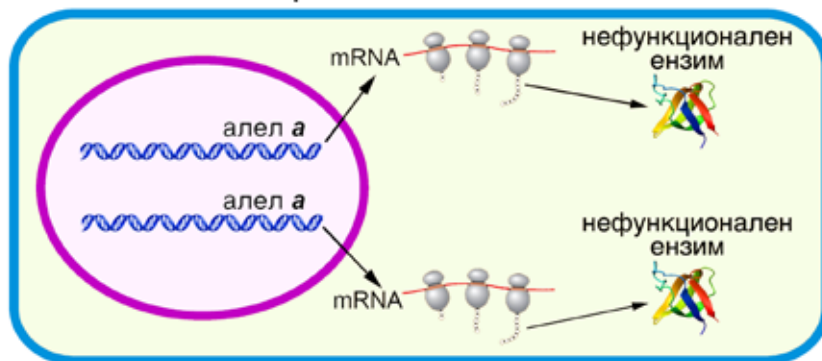
Во 1905 година, Гарод (Archibald Garrod), за првпат претпоставил дека генотипот е на некој начин поврзан со протеините, односно правилно заклучил дека гените кодираат протеини (ензими). За жал, неговата теорија долго била игнорирана, сè до 40-тите години на минатиот век, кога експериментите на Бадл и Татум (George Beadle и Edward Tatum) покажале дека биохемиските патишта кај квасната габа *Neurospora crassa* се определени со соодветни гени. Со тоа е зацртан патот кон истражувањата на наследувањето на молекуларно ниво. Денес е познато дека, кај голем број вродени (хередитарни) заболувања, хетерозиготните индивидуи истовремено продуцираат и нормален протеин и патолошки (мутиран) протеин, кои се кодирани од алелот на дивниот тип и од мутантниот алел, соодветно. Со оглед на тоа што експресијата на едниот од двете алели има доминантен ефект, таквото наследување е определено со него, па, понекогаш се означува и како **целосна доминантност**. Треба да се има предвид дека алелите (т.е. гените) не се доминантни ниту рецесивни, туку такви можат да бидат фенотипските ефекти при нивната експресија.

Сепак, изразите „доминантност“ и „рецесивност“ имплицираат некаква натпреварувачка интеракција меѓу алелите во смисла на тоа која од двете го определува фенотипот. Таквата констатација не е точна од повеќе причини. Алелите не влијаат директно меѓу себе во геномот, туку најчесто се експримираат и двата, па, конечниот фенотип е резултат од нивната истовремена експресија.

Фенотипскиот ефект на поголемиот број гени е резултат на експресијата на ензимите кои ги кодираат и кои се вклучени во некој метаболичен пат. Со анализирање на квантитетот и на другите карактеристики на протеините кодирани од секој алел, може да се забележи дека рецесивните алели, често, кодираат нефункционални, дефектни протеини, или, пак, нивоата на тие протеини се многу ниски. Ако другиот алел кодира нормален, функционален протеин и ако организмот може да преживее со количество на протеинот двојно помало од нормалното ниво (или може да го зголеми производството), тогаш дефектниот алел нема да има ефект врз фенотипот, и поради тоа е рецесивен.

На пример, алелот кој кодира нефункционален ензим кој е клучен во метаболичниот пат за синтеза на пигментот меланин предизвикува албино-фенотип (отсу-



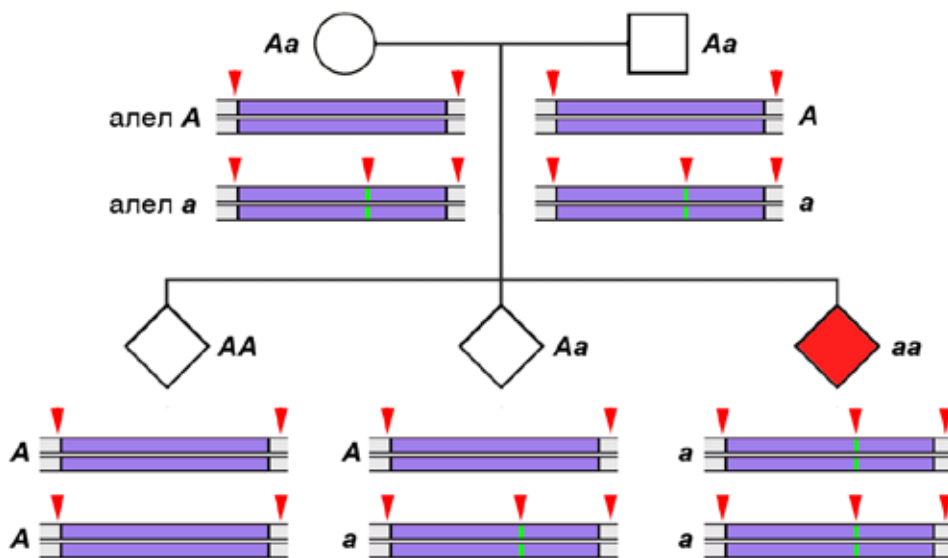
**А** Генотип AA и фенотип на пигментиран меланоцит**Б** Генотип Aa и фенотип на пигментиран меланоцит**В** Генотип aa и албино фенотип

**Слика 12-8:** Молекуларниот аспект на рецесивниот фенотип претставен со примерот за пигментот меланин. Шематски се прикажани три меланоцити чии генотипови, во однос на мутираниот алел, се: доминантен хомозигот (**A**), хетерозигот (**B**) и рецесивен хомозигот (**B**). Фенотипски, првите две клетки создаваат доволни количества на пигментот меланин, додека третата е албино (без меланински пигмент). Само алелот A кодира функционална тирозиназа, додека мутацијата во алелот a предизвикува експресија на нефункционален ензим. Ова е пример за фенотипскиот ефект од мутациите со кои се губи функцијата на протеинскиот продукт.

ство на пигментација на кожата, косата и очите). Ваквиот мутантен алел е рецесивен, односно патолошкиот фенотип се манифестира само во хомозиготно рецесивна состојба. Од друга страна, епидермалните клетки сè уште можат да продуцираат доволно меланин за кожата да биде нормално пигментирана и со само еден функционален алел, па, затоа ваквиот нормален алел (од „див“ тип) е доминантен (слика 12-8).

На молекуларно ниво, **рецесивните алели** можат да се следат со анализа на полиморфизмот на должината на рестрикциските фрагменти (*RFLP*, од англ. *restriction fragment length polymorphism*). Оваа техника е објаснета понатаму во главата 21: Генетски инженеринг. Ако некоја рестрикциска ендонуклеаза ја препознава нукле-

### А Родословно стебло со прикажани алели од локусот



### Б Сатерн блот анализи на примероци од трите потомци



**Слика 12-9:** Молекуларен аспект на автосомното рецесивното наследување.

**А:** прикажано е родословно стебло на два родители и нивните три потомци. Симболот на ромб ги означува потомците кај кои полот е нерелевантен за генетската анализа. Симболот на заболениот член е обоен со црвена боја. Под симболот на секоја индивидуа од родословното стебло, шематски се прикажани двете алели од локусот кој е предмет на истражувањето. Регионот од двоверижната DNA кој го опфаќа секој алел е прикажан со сина боја, позициите кај кои пресекува употребената рестрикциска ендонуклеаза се означени со црвени стрелки, а мутациите со зелена боја. **Б:** шематски се прикажани Сатерн блот анализи кај трите потомци. Во овој пример, мутацијата создава ново место за пресекување со ендонуклеазата, па, рецесивните алели (a) предизвикуваат појава на две дополнителни електрофоретски ленти.

отидната секвенца на мутацијата во некој алел (на пример, во алелот *a*), но, такво место не постои во немутираниот алел *A*, тогаш ензимот може да се користи за молекуларна детекција на мутацијата (слика 12-9).

Местото е случајно лоцирано асиметрично во однос на бочните позиции за пресекување. На модифицираното родословно стебло се прикажани два родители со хетерозиготен генотип за дадената состојба (*Aa*) и се само преносители, но, не и заболени. Преставени се трите типа на можни потомци: здрав хомозигот (*AA*), фенотипски здрав преносител хетерозигот (*Aa*), и заболен хомозигот (*aa*). Шематски се прикажани и типовите на алелите (со и без мутација), како и резултатите од Сатерн блотинг анализата.

Кај ваквата анализа, по ензимската дигестија на испитуваната DNA, се врши хибридизација со обележана DNA-сонда која е комплементарна со регион од алелот кој го вклучува и местото на мутацијата. Сатерн блот анализата во овој пример открива три различни шаблони на рестрикциски фрагменти. Кај хомозиготната здрава индивидуа (генотип *AA*), има само една електрофоретска лента поради тоа што ендонуклеазата не препознава рестрикциско место на местото на мутацијата, туку само ги пресекува бочните места на немутираните алели. Причина за тоа е разликата во нуклеотидната секвенца (често само во еден базен пар) меѓу алелот од див тип и мутираниот алел. Кај хомозиготната рецесивна индивидуа (*aa*), се јавуваат две ленти поради тоа што и двете алели се идентично мутирани, па, се пресечени на исти места, но, имаат различна должина поради асиметричното пресекување со ендонуклеазата. Кај хетерозиготите (*Aa*) се јавуваат три ленти, поради тоа што се присутни два рестрикциски фрагменти од мутираниот алел и еден непресечен фрагмент од немутираниот алел.

Претходниот пример е мутација која предизвикува **губење на функцијата** на протеинот кој го кодира (уште наречена и **хипоморфна мутација**). Ваквите мутации се должат на намалена експресија (на кое било ниво: транскрипциско, посттранскрипциско, транслациско и посттранслациско), на намалената биолошка функција на протеинот поради мутација во кодирачкиот дел од генот или на губење на способноста за интеракција со други протеини.

## Хипоморфни мутации кои имаат полза за организмот

Треба да се има предвид дека не сите генски мутации кои предизвикуваат губење на функцијата на кодираниот протеин се штетни за организмот, дури и кога се во хомозиготна состојба. Некои мутации (како што е опишано во главата 14: Мутации и нивната поправка) не предизвикуваат промена на аминокиселинската секвенца на кодираниот протеин, или пак последиците од промената се незначителни за неговата биолошка функција. Покрај тоа, клетката може да поседува и ефикасни механизми за компензирање на некои вакви генски мутации.

Уште поинтересно е што некои мутации со кои се губи функцијата можат да имаат и непосредна полза за организмот, било во хетерозиготна или во хомозиготна состојба, но, и да имаат подолгорочна, еволуциска, предност за носителите на мутациите. Така, на пример, мутацијата со која се губат 32 нуклеотида во генот *CCR5* во лимфоцитите кај луѓето (т.н. делеција *CCR5-Δ32*) ги прави поотпорни кон инфекција

со вирусот HIV. Имено, протеинскиот продукт на овој ген е мембрански рецептор на лимфоцитите кој не е критичен за нивната функција, но, е корецептор за вирусот HIV. Индивидуите кои се хетерозиготни, а особено, тие кои се хомозиготни за присуството на оваа мутација, потешко се инфицираат со вирусот (потребна е повисока доза на вирусни честички) или пак, инкубацијата на болеста трае значително подолго. Инаку оваа мутација е почеста кај лицата од Европско потекло. Повеќе детали за делециите на молекуларно ниво, како и за вирусот HIV се дадени понатаму во главата 15: Молекуларна генетика на бактериите и вирусите.

# ОТСТАПУВАЊА ОД МЕНДЕЛОВИТЕ ПРИНЦИПИ И ДРУГИ ТИПОВИ НАСЛЕДУВАЊЕ

## Глава 13

Денес е позната точната хромозомска локација на седумте гени кои Мендел ги анализираше кај грашокот. Паровите гени кои Мендел **истовремено** ги следел при дихибридните вкрстувања, се лоцирани на различни (нехомологни) хромозоми. Тоа објаснува зошто дел од истражувачите кои подоцна се обидуваале да ги потврдат Менделовите експерименти следејќи други фенотипски карактеристики, добивале проблематични, неконзистентни и нерепродуцибилни резултати. Имено, експресијата на фенотиповите често била покомплицирана и повеќе пати не се совпаѓала со соодносите кои биле очекувани според Менделовите закони. Освен наследувањето при кое се следат две или повеќе особини кодирани од врзани гени (кои се лоцирани блиску на истиот хромозом), постојат и други причини кои доведуваат до крупно отстапување од соодносот на фенотипови каков што се очекува според Менделовите принципи. Во натамошниот текст ќе бидат прикажани некои од причините за овие отстапувања, како и другите поважни типови на наследување.

### 13.1 Отстапувања од целосната доминантност

Мутациите со кои се губи функцијата се основа на концептот за рецесивен тип на наследување. Имено, кај диплоидните организми, мутираниот алел не кодира функционален протеински продукт, но, другиот (немутиран) алел е доминантен поради тоа што кодира нормален (див-тип) на протеинот. Оттаму, доминантните хомозиготни и хетерозиготните клетки, односно единки, немаат нарушен фенотип поради компензирањето на недостатокот на нормален продукт синтетизиран според мутираниот алел. Токму тоа е и основата за молекуларниот механизам на доминантноста и рецесивноста. Но, постојат и битни исклучоци кои доведуваат до отстапување од очекуваниот принцип на доминантно или рецесивно наследување.

Еден таков исклучок се јавува кога протеинот кодиран од нормалниот алел е застапен само со половина од нормалното количество во клетката или во некоја

нејзина органела, поради мутација во другиот алел. Во определени случаи, таквата половична концентрација може да биде недоволна за нормалната функција, па, овој феномен се нарекува **хеплоинсуфициенција**. Поради тоа што фенотипските особини кај се манифестираат кај рецесивните хомозиготи, но, и кај хетерозиготите, хеплоинсуфициенцијата може да се смета и како пример за **нецелосна доминантност**.

Втор тип на исклучоци е кога доминантниот фенотипски ефект од мутираните или дефектните протеини не може да се компензира со експресија на другиот немутиран алел од локусот, па, има **доминантен ефект** дури и во хетерозиготна состојба. Имено, кај некои генски мутации со кои се губи функцијата, а кодираниот мутантен протеин е дел од некој мултипротеински комплекс, мутацијата во само еден ген предизвикува нарушување на целосноста на комплексот. Иако останатите гени кои ги кодираат другите протеински компоненти од комплексот се немутирани, протеинскиот комплекс е неактивен, па, ваквите мутации предизвикуваат **доминантно-негативен** ефект.

Примери за такво наследување се повеќе заболувања кај кои е нарушена колагенската структура кај луѓето. Како што е веќе претходно објаснето, колагенот е најзастапен и најважен структурен протеин во телото и е критичен за формирањето на коските во текот на ембриогенезата и, подоцна, при нивниот раст. Дефектот во само една од бројните субединици од колагенот предизвикува низа на доминантни нарушувања кои се јавуваат кај синдромот *osteogenesis imperfecta* кој е карактеризиран со екстремно кршливи коски, низок раст и други телесни абнормалности. Покрај тоа, дефектни протеински продукти кодирани од мутираните алели можат да имаат и токсичен ефект врз клетката.

Постојат и мутации кои предизвикуваат целосно инактивирање, т.н. „**генски нокаут**“ (англ. *gene knockout*) на експресијата на афектираниот ген, па, понекаде се означуваат и како **нул-мутации**.

Спротивно, мутациите со кои се **зголемува функцијата на протеинот (хиперморфни мутации)** се резултат на зголемено ниво на експресија или, пак, на зголемена функционалност на протеинот поради изменетата аминокиселинска секвенца.

**Неоморфните мутации** се тие со кои се **стекнува нова функција на протеинот** со што и се добива нова фенотипска карактеристика. Еден од механизмите за појава на новиот фенотип е мутација во кодирачкиот регион од генот со која се менува аминокиселинската секвенца на протеинот кој поприма нова тридимензионална конформација и нова биолошка функција. Вториот можен механизам е експресија на протеинот во ткиво или во време во кое не би требало да има негова експресија поради мутација со која промоторот на еден ген се преместува до кодирачката секвенца од друг ген. Третиот механизам за појава на нов фенотип е фузија на два протеин-кодирачки гена (т.е. создавање на хибриден ген) со која се кодира единствен полипептид со нови структурни и функционални својства.

Експресијата на **леталните алели** предизвикува смрт во раните стадиуми на развојот на организмот, кај луѓето и животните, често пати и пред раѓањето. Поради тоа што потомството кое ги носи ваквите алели не ни преживува за да биде опсервирано, леталниот генотип не може ни да се најде во потомците, па, често доведува до отстапувања во експерименталните податоци за фреквенциите на алелите и нивните комбинации.

Повеќе детали за генските мутации се опишани во главата 14: Мутации и нивна поправка.

## Интермедиерно наследување

Наследувањето кај кое изразеноста на фенотипот на организмот со хетерозиготен генотип се наоѓа на средината меѓу фенотиповите на доминантниот и на рецесивниот генотип се нарекува **интермедиерно наследување**. Класичен пример е бојата на цветовите кај повеќе растенија каква што е петунијата, на пример. Кај цветовите од дивиот генотип, низа ензимски реакции доведуваат до синтеза на црвено обоениот пигмент антоцијанин. Каталитичната активност на соодветниот ензим од дивиот тип кој е кодиран од алелот  $A$  е ограничена со брзината на ензимската реакција, па, количеството на црвениот пигмент е определено со концентрацијата на ензимот. Хомозиготно-доминантните растенија со генотип  $AA$  имаат црвени цветови (**слика 13-1**). Алтернативниот (мутиран) алел  $a$  кодира неактивен ензим, па, растенијата со хомозиготно рецесивниот генотип  $aa$  имаат речиси бела боја поради отсуство на црвениот пигмент. Поради тоа што кај хетерозиготните растенија ( $Aa$ ) концентрацијата на овој ензим е намалена, исто така е редуцирано и количеството на антоцијанинот во цветовите, па, тие имаат розова боја. Ваквиот тип на наследување не се коси директно со Менделовите принципи. При вкрстување на индивидуите од  $F_1$  генерацијата, во  $F_2$  се добиваат цветови со црвена, розова и речиси бела боја во однос  $1 : 2 : 1$ . Ваквиот фенотип кај хетерозиготните единки е од интермедиерен тип, односно алелот  $A$  не е целосно доминантен.



**Слика 13-1:** Нецелосна доминантност кај бојата на цветовите на петунијата. Хетерозиготното растение со генотип  $Aa$  (во средината) има розова боја на венечните ливчиња, наспроти виолетовите цветови на хомозиготите со генотип  $AA$  (лево) или белите цветови на хомозиготните растенија со генотип  $aa$  (десно).

## Кодоминантно наследување

Кај **кодоминантното наследување**, единката со хетерозиготен генотип се јавуваат фенотипските карактеристики кодирани од двете различни алели во локусот, наследени од двата родитела. Таквите кодоминантни алели подеднакво се експримирани во хетерозиготна состојба, но, ниту едниот не влијае врз особината определена од другиот алел. Пример за кодоминантен фенотип е крвната група АВ кај луѓето, кај која истовремено постојат антигените А и В. Молекуларните аспекти на системот на крвни групи АВО е даден подолу во текстот. Голем број фенотипски особини кај луѓето, животните и растенијата се кодоминантни на молекуларно ниво.



### 13.2 Полигени, мултифакторијални и комплексни особини

Повеќето фенотипски карактеристики кај вишите организми се резултат на комплексни интеракции меѓу разни протеини, метаболити, како и на разновидните функционални односи меѓу клеточните и ткивните структури и органите. Се смета дека височината, телесната тежина, интелигенцијата и други карактеристики кај луѓето, се резултат на такви комплексни влијанија. Особините кои можат да имаат низа на дискретни вредности се нарекуваат континуирани особини, какви што се телесната височина и тежината. Многу особини го рефлектираат и влијанието на животната околина врз организмот, а не само на генската експресија, па, затоа се нарекуваат **комплексни особини**. Иако поединечните гени можат да се опишуваат во контекст на доминантност или рецесивност, поврзаност со половите хромозоми и други категории на наследување, генските продукти често пати имаат многу посуптилно и посложено влијание врз клеточните функции и структури. **Полигените особини** се комплексни типови наследување кои се определени од алелите на два или повеќе гена, но, без влијание на околината. За разлика од нив, **мултифакториските особини** се комплексни типови наследување кај кои постои значително влијание на околината, каква што е интелигенцијата или склоноста кон срцевата артериска болест, на пример.

### 13.3 Плеотропен ефект

Експресијата на поединечниот алел може да има повеќе од еден фенотипски ефект, односно еден ген може истовремено да влијае врз повеќе фенотипски ефекти, кои навидум не се поврзани. Оваа состојба се нарекува **плеотропија** и е спротивна од полигенијата, кај која повеќе гени влијаат врз една иста особина. Пример за плеотропен ефект е **цистичната фиброза**, автозомно рецесивно заболување предизвикано со мутација во генот кој кодира трансмембрански канал за хлоридни јони (*CFTR*, од англ. *cystic fibrosis transmembrane-conductance regulator*). Мутираниот протеин на клеточната мембрана во потните жлезди, како и во ткивата на панкреасот и белите дробови, предизвикува абнормално високи концентрации на хлоридните јони во потта, прекумерно густ секрет во белодробните патишта, нарушување на функцијата на панкреасот, црниот дроб и низа други симптоми, кои во најголем број случаи предизвикуваат смрт на заболените деца. Во овој пример, единечната мутација во само еден ген предизвикува голем број неповрзани симптоми. Оттаму и потекнува изразот плеотропија (старогрчка кованица од: *πλειο*-повеќе и *τροπείν*-влијание). Следен школски пример за плеотропијата е појавата на глувост кај околу 40% од мачињата со бело крзно и сини очи. Иако механизмот на наследување на овие состојби е непознат, поврзаноста на бојата на крзното и очите со глувоста е пример за плеотропен ефект.

### 13.4 Влијание на еден ген врз друг - епистаза

Генската активност на некој локус не мора да биде ограничен само на доминантни или на кодоминантни ефекти. Експресијата на некој ген може да ја маскира

или да ја потисне експресијата на **други гени** лоцирани на истиот или на други хромозоми. Ваквиот феномен се нарекува **епистаза** (зборот е старогрчка кованица и значи: „стои врз“) и не треба да се меша со доминантноста, кај која експресијата на рецесивниот алел е потисната од доминантниот алел од **истиот** locus. Во таква констелација, генот чиј фенотип е експримиран се означува како **епистатичен ген**, додека тој чија експресија е потисната или изменета се нарекува **хипостатичен ген**.

Пример за епистаза е промената на фенотипот при мутација во генот кој што кодира ензим вклучен во некоја сложена метаболична реакција. Имено, најголемиот број биохемиски патишта се одвиваат во низа на поврзани реакции во текот на кои прекурзорното соединение се конвертира во интермедиерно, сè до крајниот продукт на таа низа ензимски реакции. Секој од ензимите кои учествуваат во тие врзани (каскадни) реакции е кодиран од различен ген, кој кај еукариотите, често се наоѓа на различни хромозоми. Генската мутација во кој било од овие гени предизвикува експресија на нефункционален ензим со што се прекинува и целата ензимска каскада. На пример, повеќе ензими учествуваат во синтезата на црвениот пигмент кај венечните ливчиња од цветовите на некои растенија. Епистазата може да се прикаже сликовито низ поедноставениот пример на три каскадни ензимски реакции низ кои безбојниот прекурзорен молекул се преобразува во црвено обоен пигмент (**слика 13-2**). Тоа го определува дивниот фенотип на црвени цветови кај растението. Мутацијата во кој било од трите гени (*A*, *B* или *B*) кој го кодира соодветниот ензим, ја нарушува каскадната реакција и ја оневозможува синтезата на крајниот продукт, независно што преостанатите два гена се немутирани, па, се функционални ензимите кои ги кодираат. Со тоа се менува и фенотипот на бојата на цветот во бела, наместо црвена.

Од шемата може да се заклучи дека генот *A* е епистатичен на генот *B* и на генот *B* поради тоа што, при мутација, ја потиснува нивната нормална експресија. Од исти причини, генот *B* е епистатичен на генот *B*. Терминолошки, гените *B* и *B* се **хипостатични** во однос на генот *A*,

како што и генот *B* е хипостатичен на генот *B*. Од практичен аспект, не може со сигурност да се заклучи дали и кој од гените *B* и *B* се интактни, доколку постои молекуларен дефект во генот *A* што предизвикува отсуство на крајниот продукт.



**Слика 13-2:** Шематски приказ на каскадни ензимски реакции вклучени во конверзија на прекурзорниот молекул во краен продукт.

### 13.5 Енвирументални влијанија

Познати се многу примери за влијанија на факторите на околината врз генската експресија. Кај некои мутации, фенотипскиот ефект може да се манифестира

само при **рестриктивни услови** (определена температура на надворешната средина, или присуство на некое соединение во хранливата подлога, на пример). Спротивно, фенотипскиот ефект од мутацијата отсуствува при **пермисивни услови**. Таквите мутации се нарекуваат **условни (кондиционални)**.

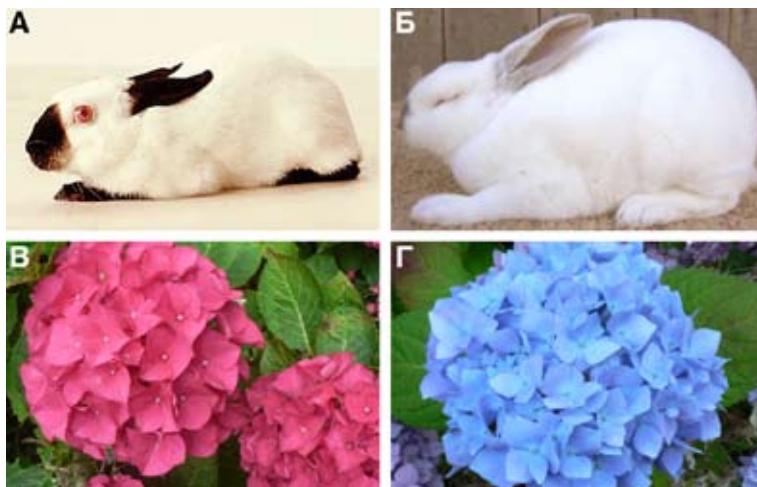
Кај бактериските генетски модели, изолирани се повеќе температурно-зависни условни мутанти кои можат нормално да растат при пермисивни температури, на пример 30°C, но, не и при рестриктивни температури од 37°C, на пример. Мутантните алели од ваквите соеви често кодираат ензими чија терциерна структура е нестабилна при рестриктивните температури со што истите се инактивираат.

Алетот *ch* кај Хималајските зајаци и кај Сијамските мачки кодира температурно-зависна варијанта на тирозиназата, еден од ензимите кој е вклучен во синтезата на пигментот меланин. Верзијата *ch* на ензимот е ја губи активноста при температура повисока од 33°C, веројатно поради делумна денатурација, додека е активна при пониски температури. Затоа врвовите на опавчињата, ушите и нозете, кои се постудени во текот на зимската сезона во дивината, кај овие животни имаат многу потемна боја на влакната, во однос на преостанатото крзно (**слика 13-3, А-Б**).

Интересен е и ефектот на киселоста на почвата врз бојата на цветовите кај хризантемата, на пример. Цветовите имаат виолетова боја кога рН вредноста на почвата во која е засадено растението е поголема од околу 5,5, додека се сини при пониска рН (**слика 13-3, В-Г**).

Покрај овие примери, амбиенталната температура може да влијае врз определувањето на полот кај некои влечуги, што е објаснето понатаму.

Посебен феномен наречен **фенокопија**, може да се јави кога надворешните



**Слика 13-3:** Примери за влијание на надворешната средина врз фенотипот. Влијание на температурата врз бојата на крзното на врвните делови од телото на Хималајските зајчиња при температури пониски од 33°C (**А**) и при повисоки температури (**Б**). Влијание на рН вредноста на почвата врз бојата на цветовите на хризантемата. Цветовите се виолетови при рН вредности повисоки од 5,5 (**В**), додека се сини при покисела средина (**Г**).

влијанија предизвикуваат фенотипски ефект сличен или ист како при експресијата на определен генотип. Во тој случај, надворешниот фактор ја имитира активноста на сосем различен ген. На пример, автозомно рецесивната мутација наречена *eyeless* (на англ.: без очи), предизвикува развој на ситни очи кај *Drosophila*. Но, истиот фенотип може да се предизвика и при третирање на ларвите на нормалните мушчици со натриум метаборат, без каква било мутација во овој ген.

### 13.6 Импринтирање

Во некои случаи на наследување, експресијата на алелот е различна во зависност од тоа дали потекнува од таткото или од мајката. Ваквите алели се наоѓаат на автозомните хромозоми, но, се „впечатени“ со полот на родителот од кого потекнуваат, па, се нарекуваат **импринтирани** (од англ. *imprinting* - впечатени). Во молекуларните механизми на импринтингот е вклучена метилацијата, т.е. ковалентното додавање на метил групи ( $-CH_3$ ) кон нуклеотидите од секвенцата на алелот. Се смета дека со тоа се потиснува експресијата на генот, односно се предизвикува генско стивнување. За некои гени, со импринтингот се стивнуваат алелите од мајката, а за други, пак, алелите од таткото. Кога детето ги наследува тие алели, се задржуваат и нивните „впечатени“ генски секвенци, независно од полот на детето. Но, подоцна, при гаметогенезата кај детето, неговата сопствена машинерија за импринтирање ги „впечатува“ алелите така што тие кореспондираат со полот на детето. Поради тоа, експресијата на определен алел може да се потисне или активира како што истиот се пренесува низ последователните генерации, од машките на женските, и обратно. На пример, кај некои доминантни заболувања, определен алел е активен кога е наследен од мајката, но, е потиснат кога е наследен од таткото. Тогаш болеста се манифестира кај синовите и кај ќерките на мајката, односно заболуваат децата на ќерката, но, не и децата на синот, и покрај тоа што го имаат истиот генотип. Поедноставено, **епигенетското влијание** (стивнување или активирање) на алелот, а не самата нуклеотидна секвенца, е пресудна за појавата или отсуството на заболувањето.

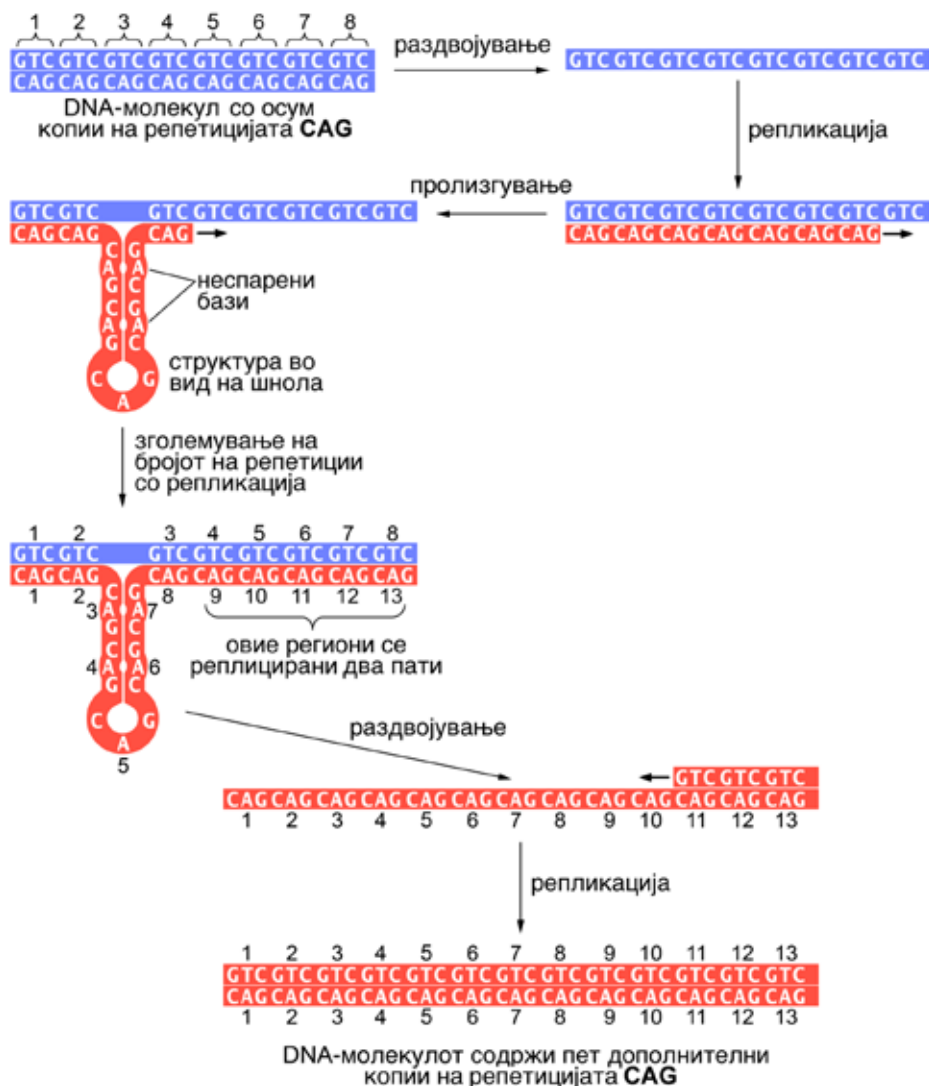
### 13.7 Пенетрантност и експресивност

Фреквенцијата на застапеност на индивидуите со определен генотип во некоја популација, кај кои реално се забележува очекуваниот фенотип, се означува како **пенетрантност**. На пример, доколку очекуваниот фенотип е најден кај 15 лица во група од 100 индивидуи кои го имаат определенениот генотип, тогаш пенетрантноста изнесува 15 %. Кај некои генотипови, фенотипските особини (често пати заболувања) може да бидат застапени кај сите индивидуи, па, пенетрантноста е целосна (100 %).

Од друга страна, еден ист алел може да има различен интензитет на експресија кај различни индивидуи. Во некој случај фенотипскиот ефект може да биде силно изразен, а во друг, да биде незабележителен или, пак, целосно да отсуствува. Степенот на фенотипска изразеност на определен генотип во индивидуата се нарекува **експресивност**. Варијабилна експресивност имаат оние фенотипски карактеристики чиј интензитет се разликува меѓу индивидуите со ист генотип. На пример, кај некои вродени заболувања, интензитетот на клиничките симптоми или возраста на која заболувањето почнува да се манифестира, можат да се разликуваат меѓу индивидуите кои имаат ист генотип. Причините за тоа се недоволно јасни, но, се смета дека барем делумно се должат на преостанатите генотипски разлики на индивидуите, односно дека постојат интеракции меѓу продуктите на тие алели и други од навидум неповрзани гени.

### 13.8 Феномен на генетско предвидување

Особено интересен е феноменот на **генетско предвидување (антиципација)** при некои вродени невролошки заболувања, каде со секоја генерација, возраста на заболениите индивидуи се намалува прогресивно. Опишани се случаи кога истата болест започнала кај дедото на возраст од 60 години, кај неговиот син на 40, а кај внукот на 20 години. Наместо возраста, кај некои заболувања прогресивно се зголемува интензитетот на симптомите со секоја следна генерација. Пример за такво наследување е спиноцеребеларната атаксија, автозомно доминантно заболување кое предизвикува карактеристични проблеми со рамнотежата и движењето.

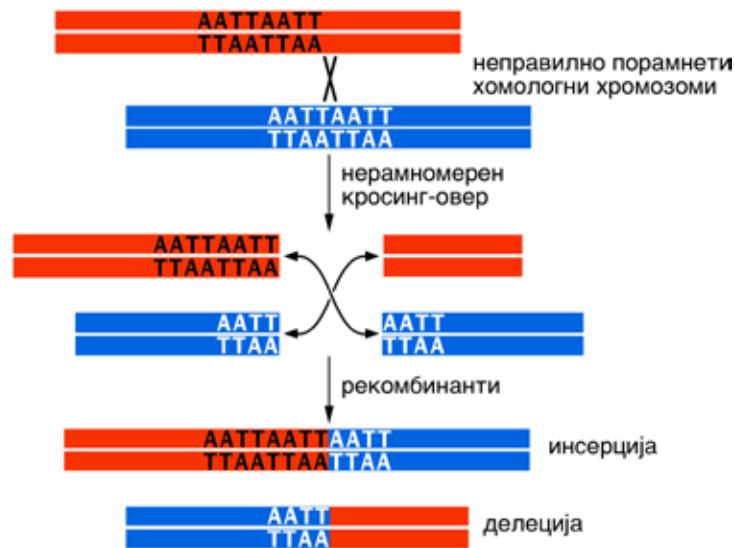


**Слика 13-4:** Случајното пролизгување на едната од двете вериги (на новосинтезираната верига, во овој пример) во текот на репликацијата предизвикува експанзија на репетитивната секвенца: 5'-CAG-3'. Урнек-веригата е обоена со сина, а новосинтезираната со црвена боја.

Се смета дека најголем број заболувања, ако не и сите, кај кои постои феноменот на генетско предвидување се предизвикани од т.н. **динамички мутации** кај кои се менува бројот на репетитивни секвенци во определен ген или во негова непосредна близина. Ваквата нестабилност, односно промената на бројот на репетитивни секвенци веројатно се случува во текот на мејотската делба при гаметогенезата со механизмите на пролизгување на едната од двете комплементарни DNA вериги во текот на репликацијата (слика 13-4). Покрај тоа, промената на бројот на репетитивни секвенци (т.е. нивната делеција и инсерција) може да се случи и преку механизмот на нееднаквиот кросинг-овер (слика 13-5).

Експанзијата или редукцијата на репетитивните нуклеотидни секвенци во кодирачкиот дел од генот доведуваат до промена на бројот на кодираните аминокиселински остатоци што влијае врз структурата и биолошката функција на кодираниот протеин. Тако е случајот со ретката фатална Хантингтонова болест, која се наследува автозомно-доминантно. Индивидуите кај кои генот **хантингтин (HD)** содржи до 35 повторувања на секвенцата: 5'-CAG-3' едно по друго и кои ја кодираат аминокиселината глутамин, не покажуваат никакви симптоми на болеста. Индивидуите кај кои постои експанзија на оваа тринуклеотидна секвенца и тоа од 36-39 повторувања имаат полесни симптоми или воопшто ги немаат, кај индивидуите со повеќе од 40 репетитивни секвенци се јавува целосна клиничка изразеност на оваа болест во поодмината возраст, додека кај лицата со над 50 репетитивни секвенци во *HD* генот, заболувањето се манифестира во пораната возраст. Се претпоставува дека зголемениот број на глутамински остатоци во цитоплазматскиот протеин Хантингтин делува токсично за определени неврони и ги предизвикува знаците на заболувањето.

Индивидуите кај кои постои експанзија на оваа тринуклеотидна секвенца и тоа од 36-39 повторувања имаат полесни симптоми или воопшто ги немаат, кај индивидуите со повеќе од 40 репетитивни секвенци се јавува целосна клиничка изразеност на оваа болест во поодмината возраст, додека кај лицата со над 50 репетитивни секвенци во *HD* генот, заболувањето се манифестира во пораната возраст. Се претпоставува дека зголемениот број на глутамински остатоци во цитоплазматскиот протеин Хантингтин делува токсично за определени неврони и ги предизвикува знаците на заболувањето.



**Слика 13-5:** Шематски приказ на промената на бројот на повторувања на определена DNA-секвенца при рекомбинација со нееднаков кросинг-овер.

### 13.9 Мултипли алели

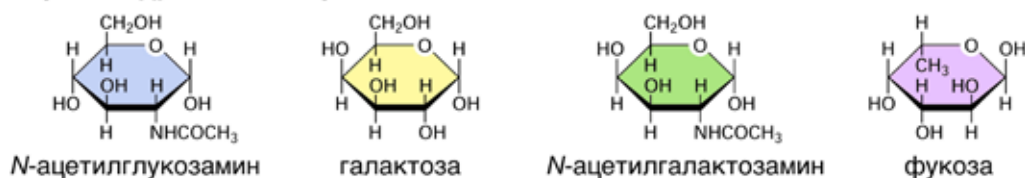
Кај овој тип на наследување постојат повеќе од две алели за секој генски locus во популацијата и тоа доведува до разлики во експресијата на определени особини (на пример, кафени наспроти сини очи). Генот кој постои со најмалку две алели се означува како полиморфен, а кога во популацијата се јавуваат три или повеќе



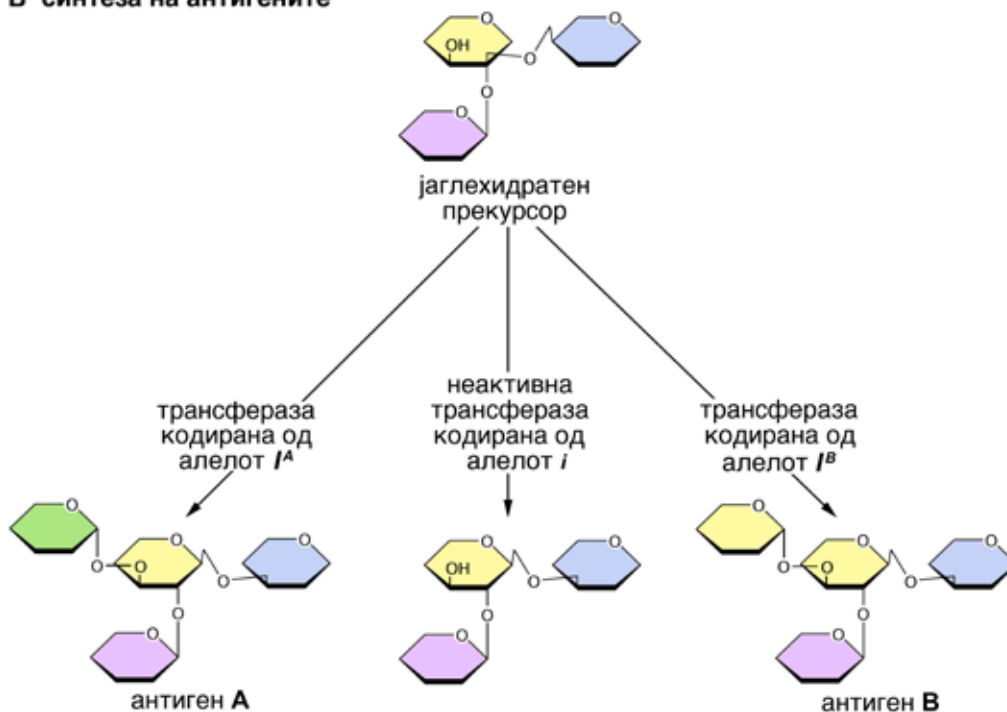
алелни форми, тогаш се нарекуваат мултипли алели. Треба да се истакне дека таквите различни алели се однесуваат на популацијата, додека во секоја поединечна индивидуа може да се најдат само по две алели на соодветниот локус на хомологниот пар хромозоми. Наследувањето на мултиплите алели предизвикува поголема варијабилност во генотиповите и во соодветните фенотипови во популацијата, во споредба со монохбридното наследување.

Често користен пример за мултиплите алели во хуманата популација е системот на крвни групи АВО. Овој систем е определен од страна на три алели, кои кодираат соодветни ензими (трансферази) за синтеза на олигосахаридни антигени. Овие олигосахаридни молекули се врзуваат на површината на еритроцитната мембрана и можат да бидат препознаени од соодветни антитела, што е и основата на принципите на компатибилност меѓу крвните групи од системот АВО. Ова има клучно значење во трансфузиологијата. Трите алели обично се означуваат како  $I^A$ ,  $I^B$ , и  $i$ , при што

### А јаглехидратни молекули



### Б синтеза на антигените



**Слика 13-6:** А, В и H антигените кај АВО системот на крвни групи. **А:** прекурсорни јаглехидратни молекули. **Б:** ензимска синтеза на антигените. Заради појасен приказ, хетероцикличните прстени се означени со различни бои.



буквата „ $I^c$ “ е кратенка за антигенот изохемаглутиин. Алелите  $I^A$  и  $I^B$  ги определуваат антигените **A** и **B**, соодветно, на површината од еритроцитната мембрана. Експресијата на овие алели е **кодминантна**, па, нивното заедничко присуство во локусот предизвикува истовремена појава и на двата антигена A и B на еритроцитната мембрана.

Алелите  $I^A$  и  $I^B$  кодираат различни варијанти на ензимот гликозил трансфераза кои се разликуваат со четири аминокиселински остатоци во протеинската верига. Таквите разлики ја менуваат специфичноста за супстратот и поради тоа двете трансферази додаваат различен шеќерен остаток на прекурзорниот јаглехидратен молекул. Поради мутација, рецесивниот алел  $i$  не кодира функционална гликозил трансфераза, па, неговата експресија не резултира со синтеза на антиген од овој систем на крвни групи (**слика 13-6**).

Комбинациите на јаглехидратниот прекурзор и соодветните остатоци ја определуваат хемиската структура и типот на антигените на еритроцитните мембрани. Крвната група на која било индивидуа може да биде A, B, AB или O, во зависност од типот на комбинации од наведените алели (**табела 13-1**).

Табела 13-1: Генотипови и фенотипови на АВО системот на крвни групи кај луѓето			
фенотип	антиген	генотип	јаглехидратни групи додадени на прекурзорот
<b>A</b>	<b>A</b>	$I^A I^A$ или $I^A i$	галактозамин
<b>B</b>	<b>B</b>	$I^B I^B$ или $I^B i$	галактоза
<b>AB</b>	<b>A и B</b>	$I^A I^B$	галактозамин и галактоза
<b>O</b>	нема	$i i$	ниту една

Индивидуите чиј генски локус ги содржи алелите  $I^A I^A$  имаат само антигени од типот A на еритроцитната мембрана. Кога само еден алел е функционален, а другиот кодира нефункционален ензим кој не го менува прекурзорот (генотип  $I^A i$ ), индивидуите сè уште имаат само антигени A на еритроцитните мембрани, а со тоа и фенотипски крвна група A. Кај луѓе со генотип  $I^B I^B$  или  $I^B i$ , се синтетизира само антигенот B, па, и крвната група е B. Кога локусот е хетерозиготен, т.е. се наоѓаат и двете алели ( $I^A I^B$ ), тогаш се синтетизираат и двата антигена, па, индивидуите имаат крвна група AB. Хомозиготните индивидуи со генотип  $i i$  немаат ниту антиген A ниту антиген B на еритроцитната мембрана, па, имаат крвна група O (нулта).

### 13.10 Родословни стебла

За прикажување на фенотипските карактеристики кај поголем број членови од некое семејство, во хуманата генетика се користат симболичен шематски приказ кој се нарекува **фамилијарно** или **родословно стебло** (англ. *pedigree*). Родословните стебла најчесто се користат за прикажување на наследувањето на херeditарните заболувања, но, и на нормалните особини кои се од интерес за генетското истражување.

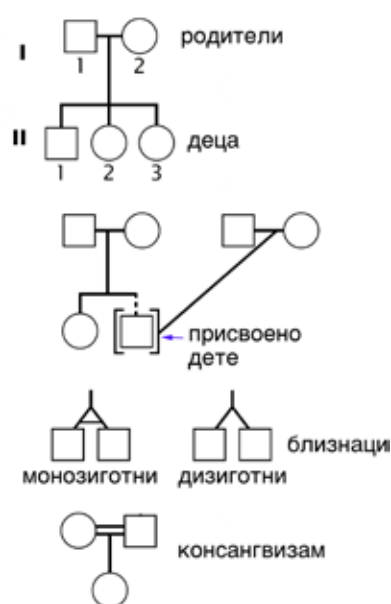
Стандардните симболи се празни (необоени) крукчиња за женските лица и коцки за машките (**слика 13-7, A**). Симболот на ромб се користи за индивидуите со

непознат или неопределен пол, како и кога полот не е релевантен за испитувањето. Овие симболи се користат за **неафектираните членови** на семејството, т.е. за оние кај кои не е присутно заболувањето или конкретниот фенотип. Наспроти нив, членовите кај кои е изразена фенотипската карактеристика која е од интерес за генетското испитување, како и определено заболување или некој симптом, се означуваат со затемнето (засенчено) поле на кругот, квадратот или на ромбот. Индивидуата поради која е започнато генетското испитување, се означува како **пропозитус** и се посочува со стрелка покрај симболот во родословното стебло, а честопати се запишува и латинската буква *P* до стрелката. Починатите членови се означуваат со истите симболи за соодветниот пол, прецртани со коса црта. Незаболените членови или оние кои ја немаат фенотипската особина од интерес, но, се преносители за неа, се означуваат со половично засенчување на симболот или со мало крукче во средината на соодветниот симбол.

### А. основни симболи

машки	женски	неопределен пол	
			неафектирани членови
			афектирани членови
			преносители без фенотипот од интерес
			починати индивидуи
			пропозитус

### Б. поврзувања на симболите

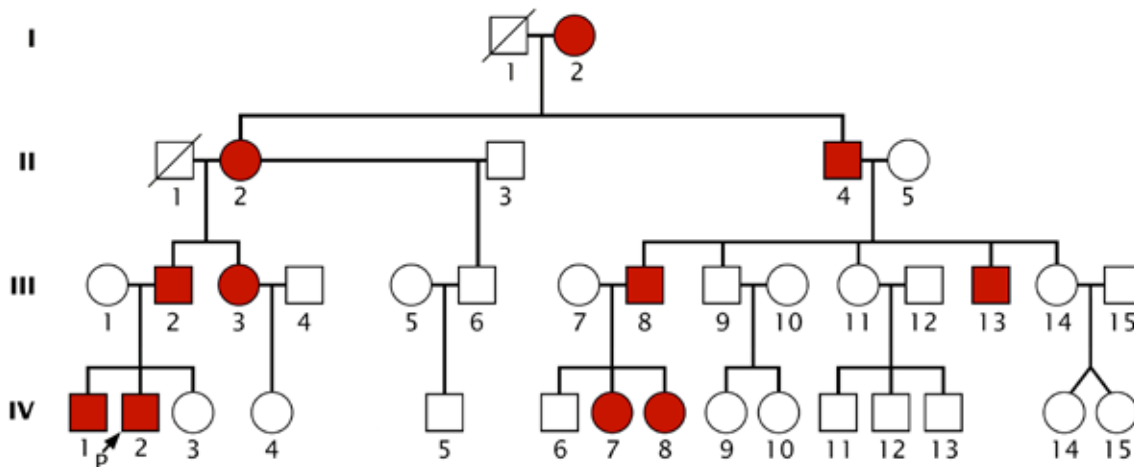


**Слика 13-7:** Симболи кои се користат при изработката на родословните стебла и нивно меѓусебно поврзување.

Самото родословно стебло се конструира со поврзување на поединечните симболи на членовите од семејството со соодветни линии, според нивниот однос кој е релевантен за наследувањето (**слика 13-7, Б**). Имено, со хоризонтална линија се спојуваат двете индивидуи (мајката и таткото) со чие оплодување се родило едно или повеќе деца, додека децата се поврзуваат со симболите на своите родители со вертикални линии. Индивидуите од секоја генерација се порамнуваат во една вертикална позиција. Членовите на најстарата генерација во родословното стебло се означуваат со римски број „I“, по што се користат последователни броеви за следните, помлади генерации, кои се цртаат надолу во стеблото. Во секоја од генерациите, симболите на единките се означуваат со последователни арапски броеви, од лево кон десно, без разлика на крвното сродство.

### 13.11 Наследување на заболувањата и типови родословни стебла

За илустрирање на конкретен пример, на **слика 13-8** е прикажано родословното стебло на семејство во кое се следи наследувањето на Варденбурговиот (Waardenburg) синдром. Основните фенотипски особини на ова заболување се: глувоста, бледа кожа, појавата на бело перче коса во предниот дел од скалпот и нарушување на видот, а наследувањето е автозомно доминантно. Прикажани се четири генерации од семејството, обележани со римски бројки од најстарата (I) до најмладата (IV) генерација.



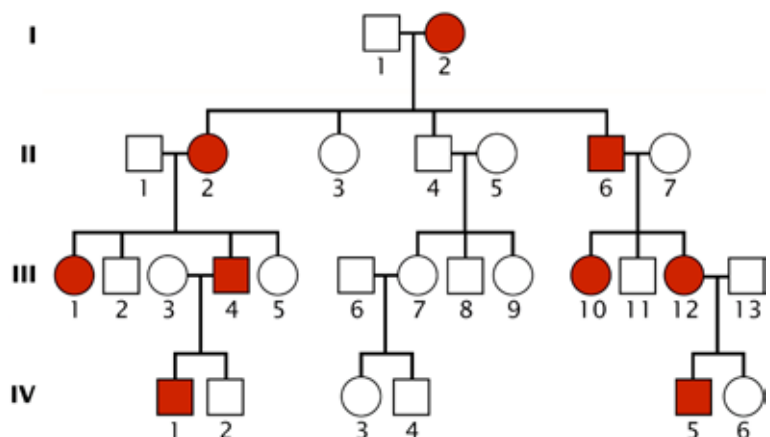
**Слика 13-8:** Пример за родословно стебло кај Варденбурговиот синдром (автозомно доминантно заболување).

Од шемата е видно дека, на пример, индивидуата (III-1) е фенотипски здрава (во однос на ова заболување) мајка на три деца: два заболени сина (IV-1 и IV-2) и една здрава ќерка (IV-3). Второродениот син (IV-2) е воедно и пропозитус. Татко на овие деца (III-2) е крвен член на испитуваното семејство. Индивидуите (II-1 и II-2) се баба и дедо, соодветно, на посочените деца и тоа од страна на таткото. Во ова родословно стебло, починати се индивидуите (I-1 и II-1) кои немале манифестно заболување. Индивидуите (IV-14 и IV-15) се фенотипски здрави дизиготни близначки. Се забележува дека фенотипот на заболувањето е присутен во сличен број машки и женски членови од семејството.

### Родословни стебла кај автозомното наследување

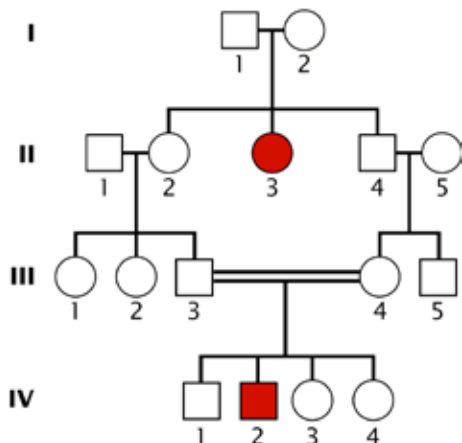
Кај семејствата со **автозомно доминантно наследување**, состојбата се манифестира кај индивидуата кај која настанала новата мутација и се јавува во сите последователни генерации (**слика 13-9**). Статистички, афектирани се подеднакво машките и женските индивидуи. Од потомството на родителот кај кој е манифестирана фенотипската состојба, 50% (веројатност 0,5) има шанса да биде заболено. Незаболе-

ните членови на семејството не ја пренесуваат состојбата врз потомството, односно заболениите имаат барем еден афектиран родител. Оттаму, нема прескокнување на генерациите. Кај некои автозомни доминантни заболувања, многу ретко може да се појави, веќе споменатиот, феномен на непенетрантност при што мутацијата не предизвикува манифестно заболување кај определени индивидуи. Покрај тоа, и степенот на изразеност на заболувањето може да варира од една до друга индивидуа или меѓу цели семејства.



**Слика 13-9:** Родословно стебло кај **автозомно доминантното** наследување.

Наспроти тоа, кај семејствата со **автозомно рецесивно наследување**, хетерозиготните родители теоретскиот ризик од афектирано потомство изнесува 25%, па, се забележува прескокнување на генерациите (**слика 13-10**). Очекуваната распределба на генотиповите кај децата на хетерозиготните родители е 1 : 2 : 1, односно: 25% здрави хомозиготи, 50% фенотипски здрави хетерозиготи (но, преносители на заболувањето) и 25% заболени хомозиготи со мутацијата. Статистички, состојбата има еднаква шанса за манифестирање и кај двата пола. Консангвизмот (оплодување на блиски крвни сродници), значително ја зголемува веројатноста од наследување на состојбата кај потомството.



**Слика 13-10:** Родословно стебло кај **автозомно рецесивното** наследување. Двојната хоризонтална линија означува консангвистичко оплодување меѓу првите братучеди (III-3 и III-4, во овој пример).

## 12.12 Наследување врзано со половите хромозоми

Кај повеќето виши животни и растенија, сите хромозоми кои не се вклучени во определувањето на полот и кои се еднакво присутни и кај женските и кај машките индивидуи се означуваат како **соматски (автозомни)** хромозоми, наспроти **половите** хромозоми. Определувањето и диференцирањето на полот се одвива кај речиси сите посложени организми, но, клеточните и молекуларните механизми значително се разликуваат меѓу анималните класи, па, дури и меѓу различните вертебрати. Кај најголем број диплоидни организми, парот полови хромозоми се разликува од соматските, па, може или да биде составен од два исти хромозоми (хомогаметен пол) или од два различни хромозоми (хетерогаметен пол).

Кај птиците, мажјациите се хомогаметични, односно имаат два исти полови хромозоми (ZZ), додека женките се хетерогаметични (ZW). Кај многу рептили, клучниот определувачки фактор за полот се енвиронменталните услови, а не генетските фактори. Имено, температурата на која се инкубираат јајцата го определува полот кај некои видови на гуштери, желки и алигатори. Кај винската мушичка (*Drosophila melanogaster*) и кај микроскопската нематода (*Caenorhabditis elegans*), примарниот пол е определен од односот на бројот на X-хромозоми со бројот на автозомните (неполови) хромозоми.

Кај цицачите, хомогаметичните женки имаат по два X-хромозома, па, кај нив се развиле генетски механизми за преполовување на нивото на генска експресија. Кај луѓето, едниот од X-хромозомите се инактивира со механизам кој претставува специјална форма на импринтирање. Кај некои нематоди, каква што е *C. elegans*, преполовено е нивото на генската експресија на сите гени и од двата X-хромозома.

### Полови хромозоми кај луѓето

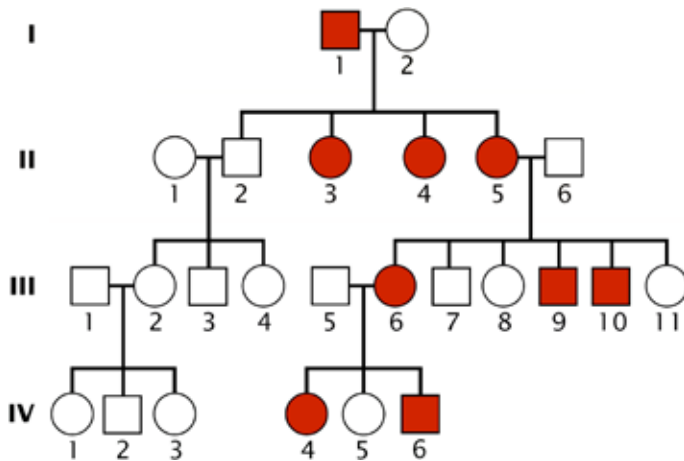
Кај луѓето, во нормални случаи, X- и Y-хромозомот се наоѓаат кај машките индивидуи со само по една копија во секоја соматска клетка, додека женските индивидуи имаат по два X-хромозома (генотипот на половите хромозоми често се означува како: ♀ XX за женските и ♂ XY за машките индивидуи). Оттаму произлегува дека машките индивидуи се **хемизиготни** во однос на Y-хромозомот. Поради оваа фундаментална генетска разлика, заболувањата предизвикани од гените лоцирани на половите хромозоми различно ги афектираат машките и женските индивидуи. Затоа и кај заболувањата поврзани со половите хромозоми може да се забележи карактеристичен дисбаланс на фенотиповите меѓу женските и машките индивидуи во родословните стебла.

X-хромозомот зафаќа околу 5% од човековиот геном и содржи околу 2000 гени, за разлика од Y-хромозомот кој е многу помал и содржи околу 30 до 50 гени. За да се зачува соодветното генско дозирање, едниот X-хромозом кај женските индивидуи мора да биде инактивиран со посебен процес.

## Наследување врзано со X-хромозомот

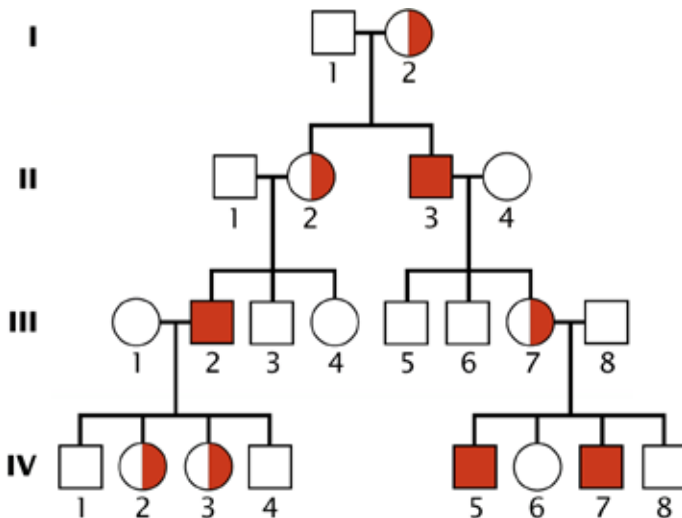
X-хромозомот има особена важност во мамалискиот геном. Заедно со Y-хромозомот, X-хромозомот го определува полот кај цицачите и содржи околу 2000 гени.

Од родословното стебло на хипотетично доминантно-наследено заболување пренесено преку X-хромозомот, може да се забележи дека застапеноста е речиси еднаква и кај двата пола (слика 13-11).



**Слика 13-11:** Доминантно наследување врзано со X-хромозомот.

машките деца. Женските деца можат да бидат преносители, а фенотипски здрави, од причина што имаат две копии од X-хромозомот, за разлика од машките кои имаат само една, па, постоењето на мутација во овој хромозом е секогаш изразена.



**Слика 13-12:** Рецесивно наследување врзано со X-хромозомот.

Заболените машки индивидуи (I-1) ја пренесуваат состојбата врз сите свои ќерки (II-3; II-4 и II-5), но, не и врз синовите (II-2). Заболените женски членови од семејството го пренесуваат заболувањето врз, статистички, половина од нивните синови и половина од нивните ќерки. Нема прескокнување на генерациите.

Кај луѓето постои поголем број рецесивни заболувања кои се резултат на мутации во X-хромозомот. Тие се наследуваат преку мајката, а не преку таткото, а ги афектираат

Најпознат пример за рецесивно заболување врзано со X-хромозомот е хемофилијата А. Главна карактеристика на ова заболување е драстично намалената способност за коагулирање на крвта што резултира со продолжени и опасни крвавења, дури и по банални повреди. Хемофилијата во Британското кралско семејство е еден од најчесто користените примери во литературата. Проучувањето на обемното родословно стебло на кралско-

то семејство го потврдува постоењето на наследување на заболувањето врзано со X-хромозомот уште од Кралицата Викторија. Заболени се само машките членови на семејството, кај кои постои мутација во генот за коагулацискиот фактор VIII, протеин кој е есенцијален за коагулацијата. Родословно стебло на кое шематски се прикажани членовите од хипотетично семејство во кое има заболени од хемофилија е прикажано на **слика 13-12**.

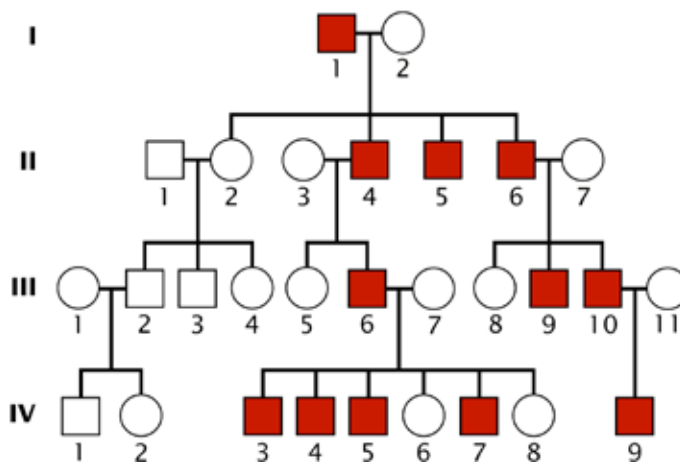
Во прикажаното родословното стебло, видно е дека почесто се афектирани машките индивидуи. Тие не ја пренесуваат состојбата врз своите синови, иако можат да ја пренесат врз ќерките (III-7, на пример). Ќерките се најчесто само преносители (III-7, на пример), но, ја пренесуваат состојбата врз синовите кои заболуваат (IV-5 и IV-7, на пример). Прескокнувањето на генерациите е често кај родословните стебла при ваквиот тип наследување.

Постојат и многу други заболувања кои се наследуваат и на сличен начин: слепилото за бои (далтонизам), ихтиозата (синдром на сува кожа со многу кератин, што доведува до изглед на крлушки од риба) и многу други.

### Наследување врзано со Y-хромозомот

Примарна улога на овој хромозом е определувањето на машкиот пол кај цицачите, а со тоа и кај луѓето. Најмногу проучен и најважен е генот **SRY** (од англ. *sex-determining region Y*), понекогаш наречен фактор за определување на тестисот или попопуларно „ген на машкоста“. Во постарата литература овој ген се нарекува и **TDF** (од англ. *testis-determining factor* - фактор за определување на тестисот). Поради тоа што само машките индивидуи имаат Y-хромозом, само во сперматозоидите може да се распредели и Y-хроматидата, па, произлегува дека таткото го определува полот на ембрионот.

Освен во мали региони кои покажуваат хомологност, нема спарување и не се одвива кросинг-овер рекомбинација меѓу X- и Y-хромозомите во текот на мејозата. Интересно е што некои форми на машка стерилност се предизвикани со мутација или делеција на овој ген, но, татковците на ваквите момчиња имаат нормални Y-хромозоми, од што произлегува дека овие мутации се новонастанати, т.е. ги нема кај машките индивидуи од претходните генерации. Тоа е во спротивност со повеќето хромозомски мутации, кои се наследуваат од една генерација на друга. Поради тоа што се наоѓа само кај машките, Y-хромозомот се користи и во истражувањата на молекуларната антропологија и во форензиката.



**Слика 13-13:** Родословно стебло кај наследувањето врзано со Y-хромозомот.

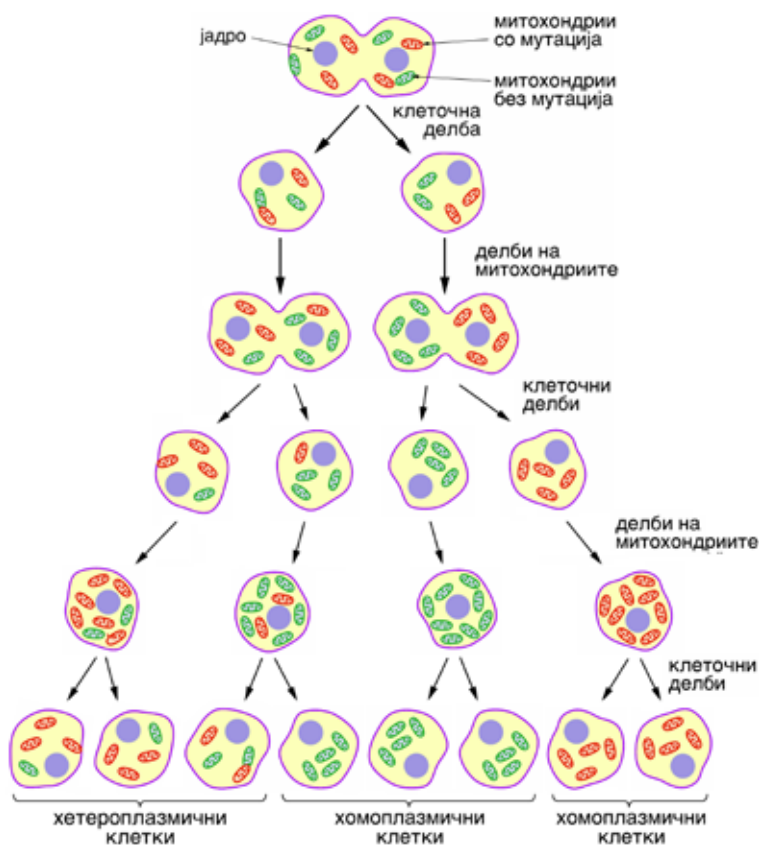


Карактеристично е што при **наследувањето врзано со Y-хромозомот** се афектирани исклучиво машките членови од семејството (слика 13-13). На приложеното родословно стебло може да се забележи дека татковците ја пренесуваат состојбата врз своите синови, па, не се јавува прескокнување на генерациите. Сепак, поради малиот број гени лоцирани на Y-хромозомот, ваквото наследување на заболувањата е ретко.

### 13.13 Цитоплазматско наследување

Митохондриите се наоѓаат кај речиси еукариотски клетки, додека хлоропластите се присутни само во растителните клетки кои се специјализирани за фотосинтеза. Клетките содржат голем број на митохондрии, па, секоја клетка содржи голем број митохондриски геноми, кои можат да бидат идентични или меѓусебно да се разликуваат. Најголемиот број наследни особини се кодирани од јадрениот геном, но, клетките поседуваат и специјализирани органели кои и самите содржат екстрахромозомска DNA. Молекуларните аспекти на митохондрискиот и на хлоропластниот геном се поопширно изнесени во главата 16: Геномика.

Растот и репликацијата на митохондриите главно не се поврзани со клеточниот циклус туку се одвиваат според енергетските потреби на клетката. Се смета дека ми-



**Слика 13-14:** Случајно распределување на митохондриите при клеточната делба, како и репликацијата на самите митохондрии, може да предизвика ниво асиметрично присуство во десцендентните клетки.

тохондриите се делат со проста делба (бинарна фисија) слично како и бактериските клетки, со таа разлика што по намалувањето на клеточните потреби од енергија, некои митохондриии можат и меѓусебно да фузионираат, со што се намалува нивниот број. При делбата на клетката (попрецизно при цитокинезата), митохондриите се распределуваат во клетките ќерки по пат на случајност, па, со текот на нивното умножување, можно е акумулирање на митохондриите со мутации во некои клетки (слика 13-14).

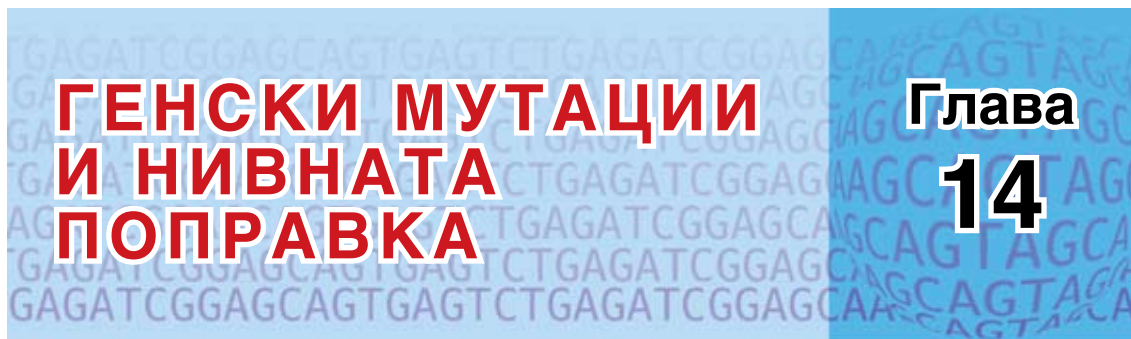
Наследувањето на митохондриските гени е различно од тоа на гените лоцирани во јадрениот геном. При оплодувањето кај најголемиот број животни (вклучувајќи ги и луѓето), митохондриите се наследуваат само од цитоплазмата на ооцитата, т.е. од мајката, но, не и од таткото. Оттаму, состојбите кои се наследени преку **митохондриите** се јавуваат и кај двата пола, но, се пренесуваат само преку мајката. Сепак, кај некои таксони, какви што се некои видови на скриеносемени растенија, митохондрискиот геном се наследува од машкиот родител.

Познати се неколку вакви заболувања, какви што се некои ретки митохондриски миопатии (мускулни болести), синдроми на наглувост, дегенерација на оптичкиот нерв и други невролошки и невромускулни заболувања. Тие се наследуваат исклучиво од мајката, а се предизвикани од соодветни мутации во митохондриската DNA.

### 13.14 Наследување кај близнаците и конкорданција

Споредбите на совпаѓањето на некоја особина кај близнаците можат да укажат на важноста на генетските и на енвайронменталните фактори при појавата на разликите кај некоја карактеристика. Доколку таа особина се јавува и кај двата близнаци, тие се конкордантни за особината. Спротивно на тоа, доколку дадената особина е присутна само кај едниот од двата близнаци, тие се нарекуваат дискордантни за истата. Изразот **конкорданција** се однесува на веројатноста од постоење определена особина кај близнакот, доколку таа е веќе забележана кај другиот близнак. Конкорданцијата е повисока меѓу монозиготните близнаци кај кои, теоретски, геномот е идентичен, отколку меѓу дизиготните, кај кои, статистички, само околу 50% генските алели се идентични. Некои заболувања кај кои постои генетска предиспозиција покажуваат такви разлики. На пример, според некои студии, доколку едниот од еднојачните близнаци има ревматоиден артритис, веројатноста и другиот да е заболен изнесува 32%, додека кај дизиготните близнаци оваа вредност е само 6%. Сличните епидемиолошки студии и статистички податоци кај близнаците имаат голема важност во хуманата генетика.



The header features a blue background with a repeating DNA sequence (GAGATCGGAGCAGTGAGTCTGAGATCGGAGCAAGCAGTAGCA) in a lighter blue font. Overlaid on this is the chapter title in large, bold, red letters with a white outline: "ГЕНСКИ МУТАЦИИ И НИВНАТА ПОПРАВКА". To the right of the title, the word "Глава" is written in white, and the number "14" is written in large white digits.

# ГЕНСКИ МУТАЦИИ И НИВНАТА ПОПРАВКА

## Глава 14

**И**зразот мутација е користен многукратно низ досегашниот текст во контекст на наследувањето. Во оваа глава ќе бидат објаснети молекуларната природа на мутациите, причината за нивното создавање и механизмите за поправка на мутираната и оштетена DNA во клетките.

Како што е претходно опишано, репликацијата на DNA се одвива со зачудувачки висока прецизност. Но, и покрај големиот број механизми задолжени за одржување на стабилната примарна структура, секвенцата на DNA-молекулите е подложна на промени, не само поради грешките во текот на репликацијата, туку и поради многу други причини.

На молекуларно ниво, генските мутации (лат. *mutto, muttare* - променува) се дефинираат како промени на нуклеотидната секвенца на DNA-молекулот од некоја клетка или организам во целина, а самиот процес на промена се означува како **мутација**. Независно од причините (за кои понатаму поопширно се зборува), мутациите во DNA-молекулите се пренесуваат по репликацијата и делбата во клетките-ќерки. Кај едноклеточните организми, доколку механизмите за поправка на мутациите не успеат да ја коригираат, целото потомство кое настанува со последователни делби на клетката во која се појавила мутацијата ја содржи истата. Ситуацијата е посложена кај повеќеклеточните, а особено кај вишите организми. Имено, при појава на мутација во геномот на некоја телесна (соматска) клетка, мутацијата се пренесува на клетките кои настануваат со делби, но, е ограничена само на определено ткиво или дел од орган.

Во зависност од клетките во кои се јавуваат и наследноста на истите, генските мутации можат да се поделат на герминативни и на соматски. **Герминативните** или **херeditарни** мутации се пренесуваат на следната генерација преку половите клетки, следејќи ги опишаните закони на наследувањето или нивните исклучоци. Откривањето на овие мутации е можно со соодветни генски анализи на која било нуклеирана клетка од индивидуата, а кај луѓето, најчесто на геномска DNA изолирана од леукоцитите од венската крв. Во дел од литературата, особено онаа намената за

пониските образовни нивоа, под изразот мутации се подразбираат токму овој тип на наследни промени во генските информации, па, не зачудува што мутациите погрешно се поврзуваат само со наследните заболувања.

Од друга страна, **соматските** мутации се појавуваат во телесните (соматски) клетки на индивидуата во тек на животот и можат да се идентифицираат само со генска анализа на афектираните (зафатени) клетки, на пример од туморското ткиво. Од посебен интерес се соматските мутации кои доведуваат до неконтролиран клеточен раст и делба и кои се вклучени во настанувањето на разните форми канцер, додека некои соматски мутации не мораат да предизвикаат заболувања, туку само создаваат популации клетки чии геноми ја содржат таквата мутација. Важно е што соматските мутации не се пренесуваат врз потомството.

Генските мутации, за разлика од хромозомските, не можат да се откријат со морфолошките цитогенетски методи, па, хронолошки, откриени се и опишани се многу подоцна. Прецизното дефинирање на генската мутација е извонредно тешко и покрај екстензивното користење на овој термин во разбирлив контекст. Воопштено е прифатено дека нормалните индивидуални разлики во нуклеотидната секвенца на определен генски алел, присутни кај повеќе од 1% од популацијата, се означуваат како **полиморфизми**, а определен тип на мутација е присутна кај помалку од 1% од популацијата. Но, и полиморфизмите можат да предизвикаат непредвидлив ефект врз стабилноста на RNA-транскриптитот и посттранскрипциските процеси, а со тоа да влијаат врз експресивноста на генот, како и уште понепредвидливи влијанија при генската рекомбинација во гаметите. Тешко е да се предвиди евентуалниот фенотипски ефект кој би можел да настане како последица на која било промена на нуклеотидната секвенца во DNA-молекулот. Мутациите во кодирачките секвенци на гените не мора секогаш да предизвикаат значаен фенотипски ефект, т.е. можат по дефиниција да се нарекуваат полиморфизми.

Во научната литература, а по препорака на меѓународното Здружение за варијации во хуманиот геном (HGVS, од англ. Human Genome Variation Society), се користат и изразите **секвентни варијанти** и **алелни варијанти** како описни и неутрални алтернативи кои ги опфаќаат и мутациите и полиморфизмите. Сепак, пред сè поради дидактички причини, во оваа книга се преферираат изразите мутација и полиморфизам.

Важно е и што мутациите можат да се јават и во регулаторните генски секвенци и во местата за препознавање при преспојувањето на протеин-кодирачките гени. Покрај кодирачките секвенци на гените, мутациите се јавуваат и во **регулаторните** DNA-региони каде можат да предизвикаат разни нарушувања во нивото на експресија на афектираниот ген, неговата транскрипцијата и процесирањето на RNA-транскриптитот. Притоа, мутациите во граничните региони меѓу интроните и егзоните на некој ген можат да создадат дополнителни позиции за RNA-преспојување. Исто така, присуството на мутации низводно (во 3'-насока) од кодирачките региони на некој ген, може да интерферира со полиаденилацијата (додавањето на поли-А опашка) на RNA-транскриптитот, и да има влијание врз неговата стабилност или натамошниот транспорт низ јадрените пори.

Покрај тоа, треба да се има предвид дека мутациите се случуваат и во гените за функционалните RNA-молекули, како и во нивните регулаторни секвенци.

### 14.1 Класификација на мутациите на ниво на DNA-молекулите

Генските мутации можат да се поделат според различни аспекти. Хромозомска мутација е опсолетен израз кој се користи за промените на DNA-секвенцата кои се толку опсежни, што се видливи со светлосен микроскоп и опфаќаат хромозомски транслокации, делеции и инверзии, а се предмет на проучување на класичната генетика. **Точкестите мутации** вклучуваат промени на единечен нуклеотиден пар во DNA-веригата (слика 14-1).

#### А немутирана DNA-секвенца



#### Б нуклеотидна супституција



#### В делеција



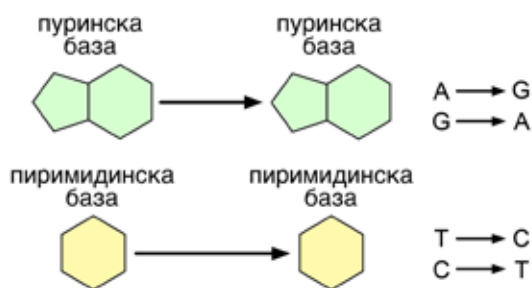
#### Г адиција (инсерција)



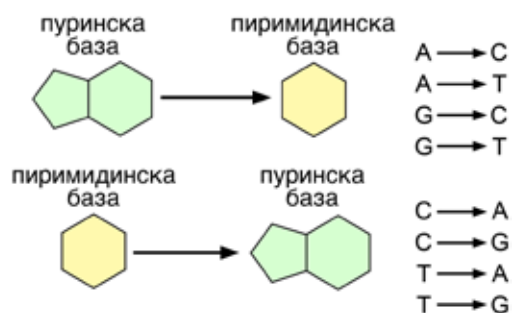
**Слика 14-1:** Основни типови на точкестите мутации. **А:** немутирана (нормална) DNA-секвенца. **Б:** супституција на нуклеотид (базен пар). **В:** делеција (отстранување) на еден базен пар. **Г:** инсерција (вметнување) на базен пар.

Од историски аспект, под терминот точкести се вбројувале сите генски мутации кои не биле видливи со микроскопските цитогенетски методи, односно мутациите кои не опфаќаат повеќе од неколку стотици до неколку илјади нуклеотидни пара во DNA-молекулот. Со натамошното усовршување на молекуларните техники за анализа на DNA, терминот постепено го попримил современото значење - промени на единечен нуклеотиден пар.

#### А транзиции



#### Б трансверзии



**Слика 14-2:** Класификација на супституциските мутации. **А:** замената на една пуринска со друга, но, сепак пуринска база, се означува како транзиција. **Б:** мутацијата при која пуринска база се заменува со пиримидинска, или обратно, се нарекува трансверзија. Прикажани се можните супституции на базите.

На ниво на DNA-секвенцата, супституциите (замената) на еден пиримидински нуклеотид (тимин или цитозин) со различен, но, исто така пиримидински, нуклеотид (тимин со цитозин, или цитозин со тимин), се означуваат како **транзиции** (слика 14-2). При замена на пурина нуклеотидна база со пиримидинска и *vice versa* (аденин со тимин или цитозин со гуанин, на пример), супституциските мутации се означуваат како **трансверзии**.

## 14.2 Класификација на мутациите на ниво на протеинскиот продукт

Во зависност од ефектот врз протеинот кој го кодираат, точкастите мутации во протеин-кодирачките гени можат да се поделат на неколку типа (слика 14-3).

Замената на триплетот (кодонот) која не резултира со промена на аминокиселината во протеинскиот продукт на генот, се нарекува **синонимна**, „тивка“ или **конзервативна** мутација. Тоа е последица на дегенерираноста на генскиот код, односно постоењето на неколку кодона за една иста аминокиселина. Како што е претходно објаснето, редувантноста варира во релативно широк дијапазон, од еден единствен кодон за аминокиселината метионин, па, сè до 6 кодона за аргинин. Од тоа произлегува дека при мутација на кодонот CGC, на пример, кој ја кодира аминокиселината аргинин, во кодон со која било од секвенците: CGA, CGT, CGG, AGA или AGG, сè уште ќе се кодира истата аминокиселина и полипептидната верига ќе остане непроменета. Иако тоа не ја менува примарната структура на протеинскиот продукт на генот, промената на секвенца на RNA-транскриптот може да има влијае врз нејзината термодинамичката стабилност или да предизвика други ефекти.

Кај **неутралните** мутации, изменетиот кодон специфицира различна, но, функционално еквивалентна аминокиселина со слични физичко-хемики особини и во голем број случаи, воопшто не влијае врз функцијата или тридимензионалната структура на кодираниот протеин. На пример, при промената на кодонот AAA во AGA, се менува аминокиселинскиот остаток од лизин во аргинин, но, и двете се базни и слични аминокиселини.

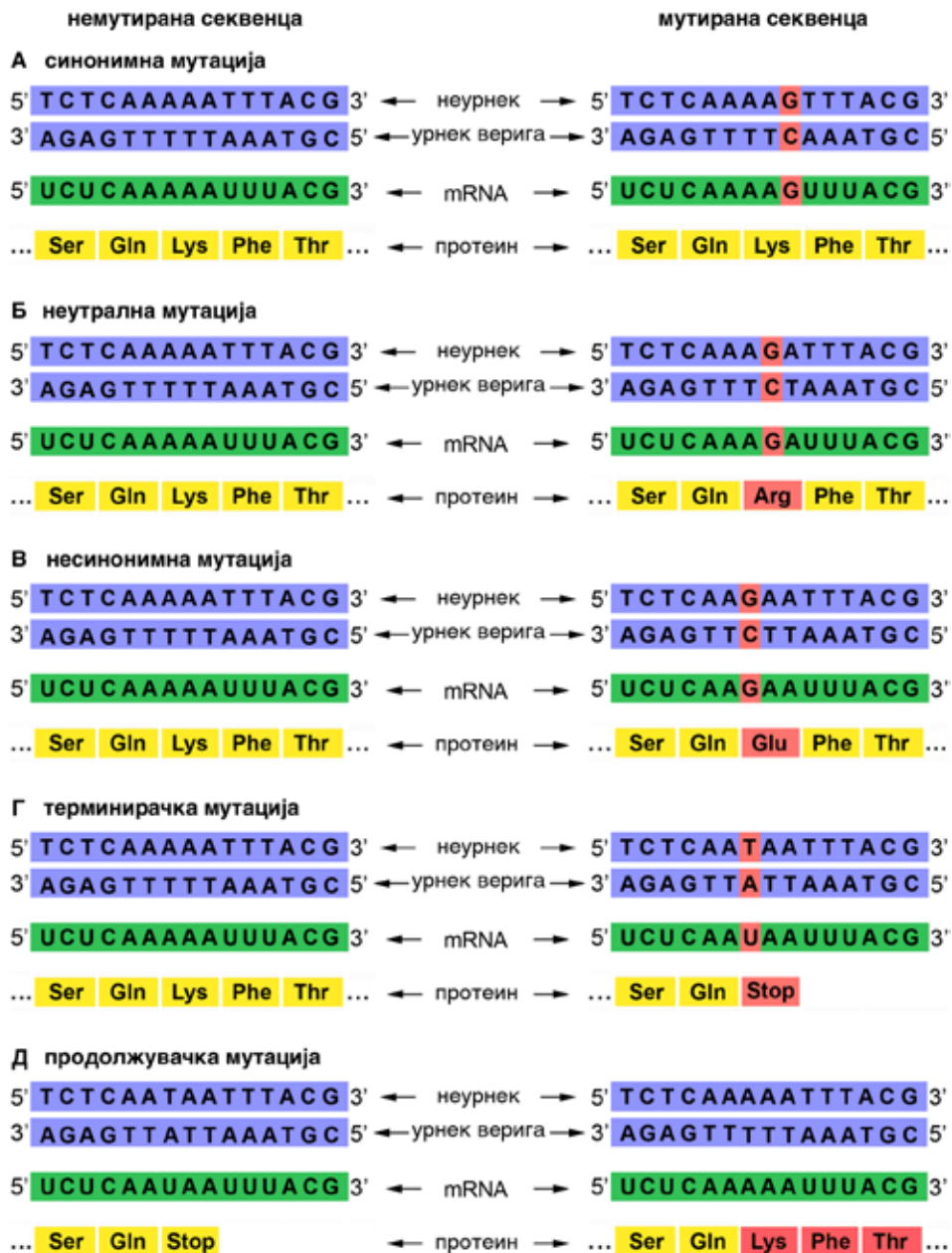
Најчести се т.н. **несинонимни мутации** (на англ. *missense*) при кои промената на базата кодира различен, погрешен аминокиселински остаток. Ефектот е особено негативен во критичните позиции на рецепторите, активните центри кај ензимите или местата за врзување со регулаторните протеини.

Мутираниот триплет може да кодира терминациски сигнал, наместо соодветен аминокиселински остаток. Овие мутации се нарекуваат **терминирачки** (на англ. *nonsense*) и предвремено ја **терминираат транслацијата** која запира на тој кодон, па, настанатата полипептидна верига е покуса.

Спротивно на тоа, **продолжувачките мутации** (англ. *sense*) резултираат со промена на терминацискиот кодон во кодирачки, при што транслацијата продолжува сè до следниот терминациски кодон и настанува абнормално долга полипептидна верига.

**Реверзните мутации** се јавуваат многу поретко кога, претходно веќе мутираните нуклеотидни секвенци, повторно мутираат во нормална секвенца од дивниот тип, што е статистички малку веројатен процес. **Инверзиските мутации** настануваат со инверзија на сегмент од DNA во тек на рекомбинација, а не како последица на директна мутагенеза.

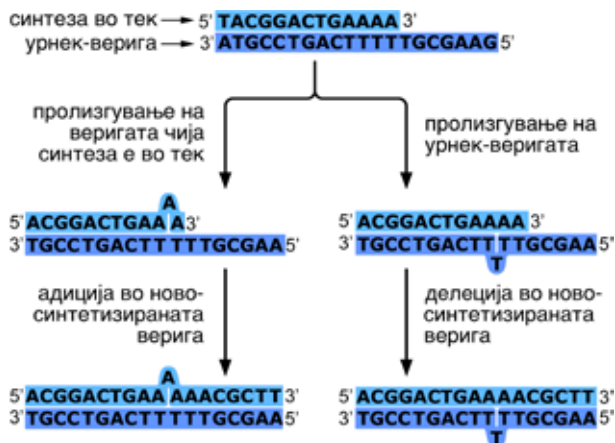




**Слика 14-3:** Поделба на супституциските мутации според кодираниот протеински продукт. **А:** синонимна е точкестата мутација која не доведува до промена на кодираниот аминокиселински остаток во протеинскиот продукт се нарекува. **Б:** неутрална е мутацијата која предизвикува замена на друга, но, структурни и функционално, слична аминокиселина. **В:** промената во различна (погрешна) аминокиселина се нарекува несинонимна мутација. **Г:** кај терминиращката мутација, кодирачкиот триплет е конвертиран во стоп-кодон, па, наместо да кодира соодветен аминокиселински остаток предизвикува прекин на транслацијата. **Д:** спротивно, продолжувачката мутација го конвертира стоп-кодонот во кодирачки, па, полипептидот е подолг за толку остатоци, колку што има кодони до следниот стоп-кодон. Мутираните нуклеотиди и аминокиселински остатоци се обоени црвено.

## Адиции или делеции на еден до неколку нуклеотидни пара

Кусите делеции или инсерции можат да се појават спонтано преку два независни механизми: со пролизгување на едната верига во текот на репликацијата или поради нееднаков кросинг-овер во текот на мејотската делба при гаметогенезата. Кај првиот механизам, пролизгувањето во текот на самата репликација создава куса



**Слика 14-4:** Предизвикување на делеции или инсерции со пролизгување на една од веригите во текот на DNA-репликацијата. Комплементарната верига создава куса јамка.

ција или адиција) или делецијата на еден или на неколку базни парови чиј број е различен од 3 (или од производот на бројот 3), предизвикува поместување на рамката на читање на кодонот (англ. *frameshift*). Ова може да се претстави со губење на смислата при читање на следната реченица на македонски јазик, напишана со зборови од по три букви:

„немутирана“ реченица: ЦЕЛ ДЕН ТОЈ СОК ПИЕ ИЛИ ОЧИ МИЕ  
адиција на буквата „О“: ЦЕЛ ДЕН ОТО ЈСО КПИ ЕИЛ ИОЧ ИМИ Е  
делеција на буквата „Т“: ЦЕЛ ДЕН ОЈС ОКП ИЕИ ЛИО ЧИМ ИЕ

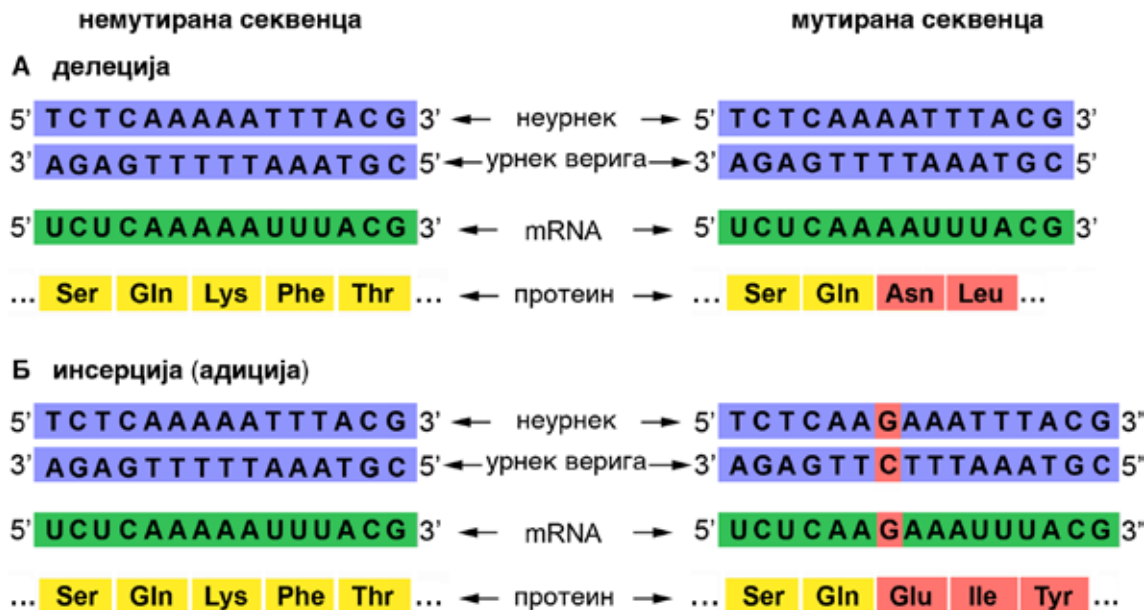
По аналогича, последица на ваквата промена во некој ген е што сите следни аминокиселински остатоци во кодираниот протеински продукт, вклучувајќи ја и тој на мутациската позиција, се различни од немутираниот протеин. Пример за инсерција на еден базен пар во DNA-секвенцата на некој протеин-кодирачки ген е прикажан на **сликата 14-5**.

Слично и делецијата на еден или на неколку базни парови чиј број е различен од 3 или од производот на бројот 3 резултира со поместување на рамката на читање, па, почнувајќи од таа позиција, сите следни аминокиселински остатоци во кодираниот протеински продукт ќе бидат различни од немутираниот, див тип на протеинот.

јамка и, во зависност од тоа кај која од двете вериги (урнекот или новосинтетизираната) дошло до пролизгување, можат да се предизвикаат адиции или делеции на неколку нуклеотиди во едната DNA верига (**слика 14-4**).

Кај вториот механизам, делециите или инсерциите се појавуваат поради погрешно порамнување на хомологните региони од DNA-молекулите од хомологните хроматиди во текот на кросинг-оверот. Репетитивните секвенци се особено склони кон ваков тип на грешки. Поради тоа, ваквиот нарушен процес резултира со кусок или вишок на нуклеотиди во рекомбинираниите молекули.

Независно од механизмот со кој настанале, вметнувањето (инсер-



**Слика 14-5:** Мутации кои доведуваат до нарушување на рамката на читање при транслацијата, при што погрешна е секвенцата на сите следни аминокиселински остатоци, вклучувајќи го и тој што е кодиран од мутираниот кодон.

Овие мутации најчесто имаат драстичен структурен или функционален ефект врз протеинот кодиран од мутираниот ген.

Наспроти тоа, делецијата или адицијата на 3 или повеќе базни парови чиј број е производ на 3, предизвикува губење или додавање на аминокиселински остаток во протеинскиот продукт, но, ја остава интактна рамката на читање на кодонот (т.н. делеции или инсерции **во рамка**). На пример, најчестата мутација при цистична фиброза е делеција на трите нуклеотиди од кодонот 508 на генот *CFTR*, што ја остава интактна рамката на читање, но, предизвикува губење на аминокиселинскиот остаток во критична позиција од полипептидот и го предизвикува заболувањето.

### 14.3 Номенклатура на генските мутации

Генските мутации екстензивно се проучуваат подолго од еден век, па, не зачудува постоењето на разлики во нивното означување во учебниците и во научната литература. Според Комитетот при споменатото Здружение за варијации во хуманиот геном, воспоставени се стандарди за означување на мутациите во секвентните варијанти (т.е. мутациите и полиморфизмите) кај луѓето и се препорачува нивно користење во научната литература.

Нуклеотидните супституции се означуваат со симболи во кои се користат комбинации од арапски броеви и од две букви. Бројот се однесува на нуклеотидната позиција сметано низводно (во 3'-насока) од првиот нуклеотид во генот според документот во некоја од генските банки на податоци. Првата буква го означува нук-

леотидот кај дивиот тип, додека втората буква е мутираниот нуклеотид. На пример: 176A>T е ознака за мутација или полиморфизам на 176. нуклеотид од генот од интерес при што аденозинот се заменува со тимидин. Ваквиот стандард се препорачува за означување на мутациите во геномската DNA.

За разлика од геномските мутации, се препорачува тие во митохондриската DNA да се означуваат со пишување на „m.“ пред мутацијата (на пример m.99G>T). Симболите за мутациите во RNA-молекулите треба да се означуваат со додавање на „r.“ пред мутацијата (на пример r.1238c>u) при што за нуклеотидите треба да се користат мали букви.

За означување на промената на аминокиселинскиот остаток во мутираниот полипептид, се препорачува користење на почетна буква која е симбол за аминокиселината од дивиот тип, по што следи број кој се однесува на позицијата на аминокиселинскиот остаток во полипептидот (од N- кон C-крајот) и, на крајот, буква која е симбол за заменетата аминокиселина. Буквите кои се симболи за аминокиселините се според стандардниот систем на кратенки за нивно означување со една буква (прикажани се во главата 6: Протеини, како и во прилозите). На пример: A118G е симбол за промената на аланин во глицин на позицијата 118 во полипептидот. Терминирачките мутации се означуваат со пишување на буквата „X“ на местото на симболот за мутираната аминокиселина (пример: V378X е симбол за терминирачката мутација со која наместо валин на позицијата 378, синтезата на полипептидот е прекината на таа позиција и има само 377 аминокиселински остатоци). Делециите (во рамка) на три нуклеотиди со кои се губи еден аминокиселински остаток се означуваат со старогрчката буква „Δ“ пред бројот на аминокиселинската позиција во дивиот тип (пример: погоре опишаната делеција Δ508 на 508. кодон во генот *CFTR*).

Во бактериската генетика се користат поразлични симболи за генските мутации, а повеќе такви примери се прикажани во главата 15: Молекуларна генетика на бактериите и вирусите.

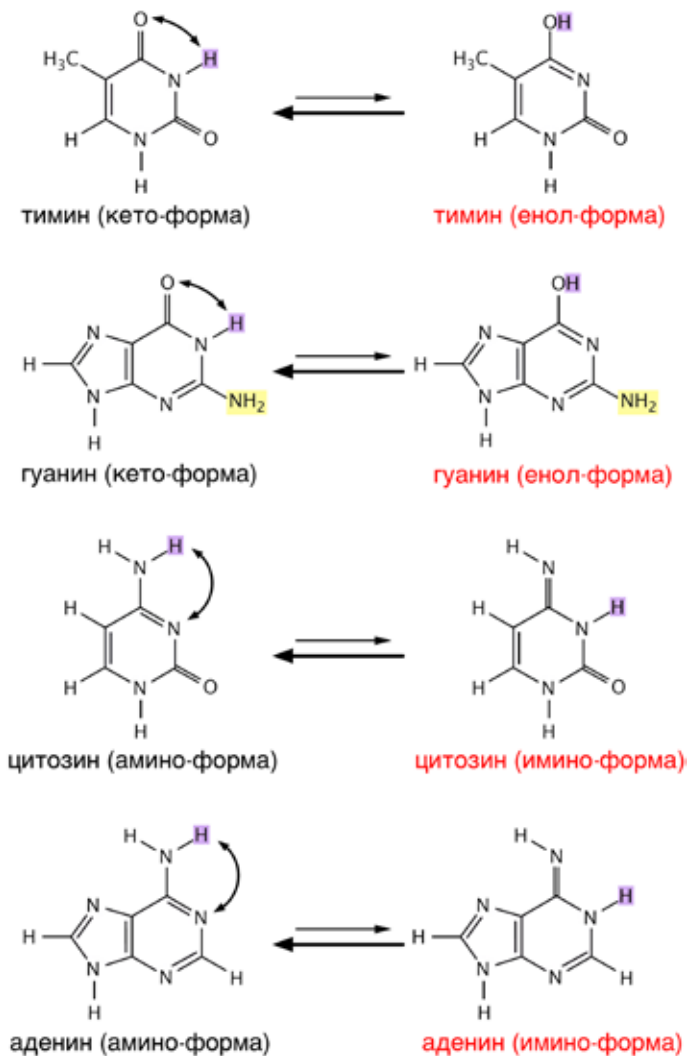
## 14.4 Причини за мутациите

Врз основа на причината, генските мутации можат да се поделат на **спонтани** и на **индуцирани**.

### Спонтани мутации

Појавата на мутации како последица на грешките при репликацијата на DNA се претходно опишани повеќе пати. Покрај тоа, мутациите можат да се појават и како резултат на спонтани хемиски лезии на DNA-молекулот.

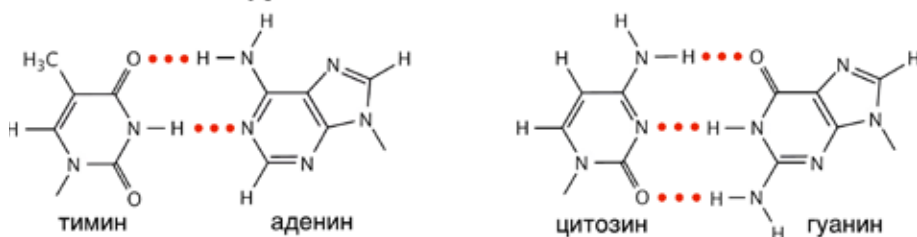
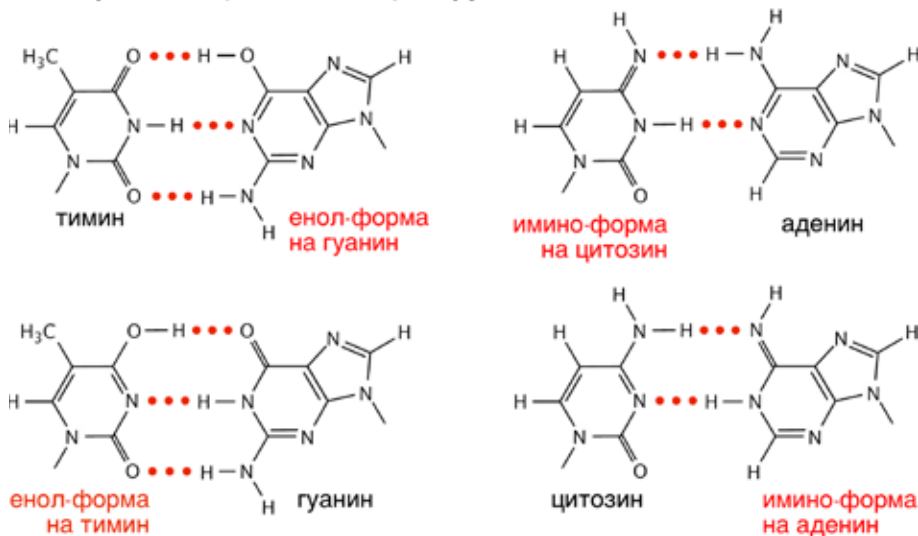
Во физиолошки услови, секоја од нуклеотидните бази на DNA-молекулот е присутна во една од неколкуте можни таутомерни форми, т.е. изомери кои се разликуваат по позициите на нивните атоми и атомски врски. Таутомерниот еквилибриум резултира со далеку повисока присутност на amino- наспроти imino-изомерите на аденин и цитозин, и на многу повисок процент на keto- наспроти enol-изомерите на гуанин и тимин во единица време (**слика 14-6**).



**Слика 14-6:** Структурни формули на „нормалните“ на базите од комплементарните DNA-вериги и на соодветните таутомерни форми.

Нормалното спарување на комплементарните бази од двете вериги на DNA-молекулот, често пати означено како Вотсон-Криково базно спарување, се одвива меѓу базите аденин и тимин, и меѓу гуанин и цитозин. Изместувањето на таутомерната рамнотежа предизвикува погрешно спарување меѓу нуклеотидните бази и појава на следните парови: имино-формата на цитозин со вообичаената, amino-таутомерна форма на аденин, енол-формата на тимин со гуанин, имино-формата на аденин со цитозин и енол-формата на гуанин со доминантната, кето-форма на тимин (слика 14-7).

Грешките при репликацијата на DNA настануваат како последица на нелегитимно спарување на нуклеотидите од двете комплементарни вериги на DNA-хеликсот и поради јонизација на една од нуклеотидните бази.

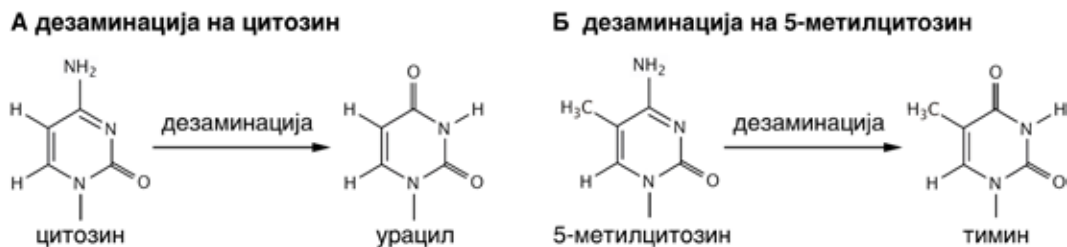
**А вообичаено спарување на базите****Б алтернативно (нелегитимно) спарување на базите**

**Слика 14-7:** Нелегитимно спарување на „нормалните“ кето- и amino-форми, наспроти таутомерните имино- и енол-форми на бази меѓу комплементарните DNA вериги.

**Депуринацијата** претставува прекин на гликозидната врска меѓу пуринската база и деоксирибозата со последователно губење на аденинскиот или гуанинскиот остаток од DNA-молекулот. Пресметано е дека, во нормални околности, клетките на цицачите спонтано губат просечно по околу 10000 пурински бази од геномската DNA во текот на клеточен циклус од 20 часа при 37°C. Во текот на репликацијата, DNA-полимеразата не може да специфицира коректна комплементарна база наспроти апуринската позиција во DNA-молекулот. Присуството на поголем број апурински позиции во клеточниот геном при репликацијата би предизвикало значително генетско оштетување, но, DNA-репарацискиот систем ефективно ги отстранува апуринските места од DNA-молекулот.

Спонтаната **деаминација** (отстранувањето на amino-групата) е хемиски процес при кој цитозинот се преобразува во урацил кој е комплементарен со аденинот, па, во тек на репликацијата настанува конверзија на G-C парот во A-T пар (транзиција GC → AT) (слика 14-8).

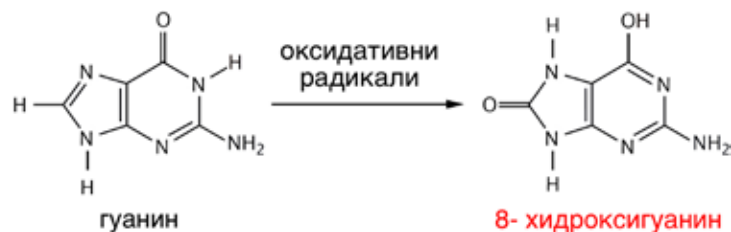




**Слика 14-8:** Промена на комплементарната база при DNA-репликацијата предизвикана од деаминација.

**Оксидативното оштетување** на нуклеотидните бази претставува трет тип на спонтани хемиски лезии на DNA-молекулот кои се инволвирани во мутагенезата.

Активните форми на кислород како супероксидниот радикал ( $O_2 \cdot$ ), водород пероксидот ( $H_2O_2$ ) и хидроксилниот радикал ( $OH \cdot$ ) се нормални нуспродукти на аеробниот метаболизам и можат да предизвикаат оштетување на DNA-молекулот или на неговите нуклеотидни прекурзори. Еден од продуктите на оштетување на гуанинот



**Слика 14-9:** Конверзија на гуанинот во 8-хидроксигуанин (попрецизно: 8-окси-7, 8-дихидродеоксигуанин) под дејство на слободните радикали.

со кислородни радикали е **8-хидроксигуанинот** (слика 14-9) кој е комплементарен со аденинот, па, при репликација на DNA може да доведе до трансверзии  $G \rightarrow T$ .

## Индуцирани мутации

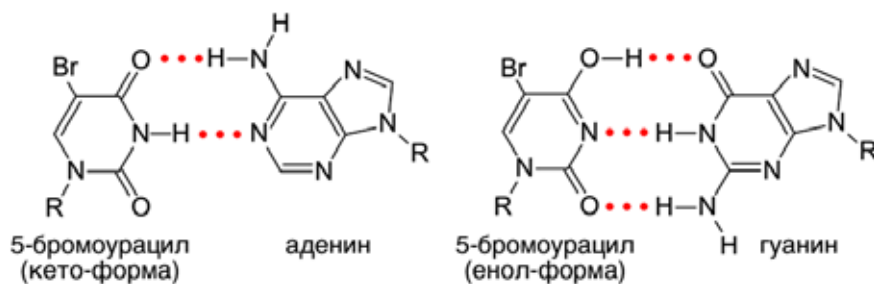
Агенсите кои доведуваат до зголемување на бројот на мутации над спонтаната фреквенција се означуваат како **мутагени**. Индуцираните мутации можат да настанат со дејствување на хемиски, физички и биолошки агенси, а кои имаат природно или артифициелно, антропогено потекло. Мутагените агенси покажуваат специфичност кон индуцирање на определени мутации (на пример, кон транзиции од типот:  $AT \rightarrow GC$ ) или кон специфични нуклеотидни секвенци во DNA-молекулот. Имено, обемните истражувања покажале дека точкестите мутации не се расфрлани по пат на случајност низ испитуваните гени, туку честопати, се застапени на определени позиции во нуклеотидната секвенца кои се нарекуваат мутациски „жешки“ точки (на англ. *hot spots*). За дел од нив се претпоставува дека се должат на постоењето на метилирани цитозински остатоци (метилцитозин) во генот, но, за повеќето не постои прецизно објаснување.

**Хемиските мутагени агенси** можат да се поделат врз основа на механизмот на дејствување на најмалку три категории: аналози на пуринските и пиримидинските бази, агенси кои реактивни со DNA-молекулот и на алкилирачки агенси.



Молекуларниот механизам на дејствување на **базните аналози** ја опфаќа нивната физичко-хемиска сличност со нормалните пурински и пиримидински бази и консеквентна инкорпорација во тек на репликацијата на DNA. Но, за разлика од нормалните бази, пуринските и пиримидинските аналози поседуваат различна комплементарност, па, доведуваат до мутации преку погрешно спарување во тек на репликацијата, односно до инкорпорирање на погрешен комплементарен нуклеотид. Со тоа, оригиналниот базен аналог перзистира само во едната верига од DNA-молекулот, а во комплементарна верига се наоѓа погрешно спарениот нуклеотид.

Агенсот **5-бромоурацил** се разликува од тиминот по присуството на бром наместо метилна група на С-5 позицијата (**слика 14-10**). Оваа разлика не предизвикува промена при воспоставувањето водородни врски со базата аденин од комплементарната верига. Но, присуството на бром атом значително го менува распоредот на електроните во овој базен аналог, па, 5-бромоурацилот е почесто присутен во јонизирана (енол-) форма, погрешно спарувајќи се со гуанин, наместо со аденин. Тоа, речиси по правило, доведува до мутации од типот на транзиции.



**Слика 14-10:** Спарување на модифицираната база 5-бромоурацил, како и нејзината јонизирана форма, со аденин и гуанин, соодветно.

Некои мутагени агенси доведуваат до хемиска измена, односно модификација на пуринските или на пиримидинските бази од DNA-молекулот, предизвикувајќи соодветни мутации. Алкилирачките агенси можат да доведат до адиција на алкилен радикал на постојните нуклеотидни бази во DNA-молекулот.

**Етил метан-сулфонатот**, на пример, врши адиција на етилна група, а **нитрозо-гуанидинот** на метилна група на кислородниот атом на позиција С-6 во молекулот на гуанин или на позицијата С-4 кај тиминот, создавајќи ги дериватите *O*<sup>6</sup>-метилгуанин и *O*<sup>4</sup>-метилтимин, соодветно. Овие модифицирани бази погрешно се спаруваат со нормалните бази при репликација на DNA. За разлика од гуанинот кој е комплементарен на цитозинот, дериватот *O*-6-метилгуанин е способен да создава пар со тиминот и со тоа да доведе до транзициски мутации GC → AT при репликацијата (**слика 14-11**). Голем број други соединенија исто така можат да предизвикаат хемиски модификации на базите од DNA-молекулот и да резултираат со погрешно спарување при неговата репликација, а со тоа и до соодветни мутации.

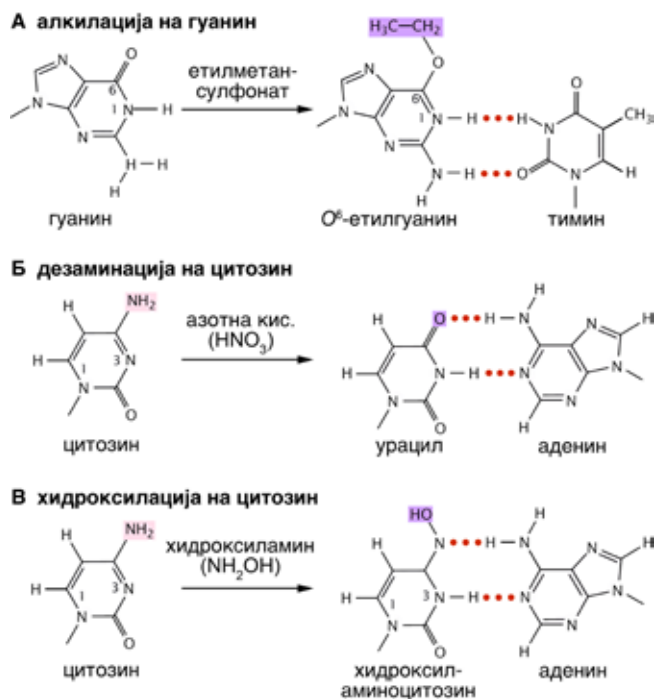
Така, **хидроксиламинот** доведува до хидроксилација на азотниот атом од аминоксигрупата на позиција С-4 кај цитозинот, формирајќи го дериватот N-4-хидроксицитозин, кој има изразена тенденција за спарување со аденин, наместо со гуанин (**слика 14-11**).

**Бисулфитните јони и азотната киселина** го конвертираат цитозинот во урацил кој е комплементарен со аденинот, наместо со гуанинот, па, предизвикуваат транзиции од типот: C → T. Азотната киселина може да го деаминира аденинот до хипоксантин, базен аналог кој доведува до погрешно спарување со цитозин во тек на репликацијата на DNA, и со тоа до A → C трансверзиски мутации (слика 14-11).

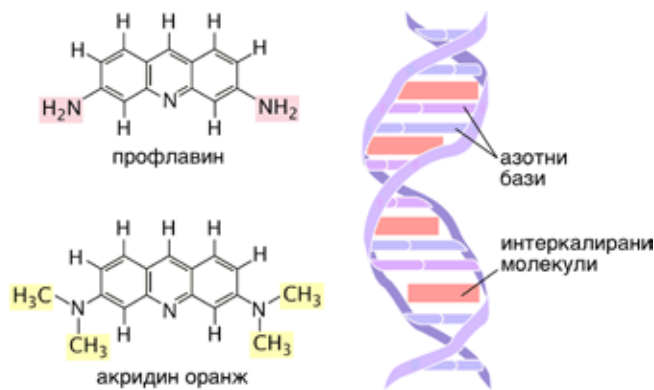
Во категоријата на агенси кои доведуваат до модификација на нуклеотидните бази спаѓаат и **интеркалирачки агенси** какви што се: профлавинон, бојата акридин оранж, етидиум бромид, класата агенси наречени IRC соединенија и други. Овие агенси се планарни молекули кои се вметнуваат (интеркалираат) меѓу азотните бази во внатрешноста на двојниот хеликс на DNA (слика 14-12).

Во таква интеркалирана положба овие агенси доведуваат до дисторзија на тридимензионалната структура на DNA-молекулот и појава на инсерции или делеции на единечен нуклеотиден пар, а со тоа и до „frameshift“ мутации при репликацијата.

Во **физичките мутагени агенси** спаѓаат **електромагнетното** (ултравиолетовата светлина) и **јонизирачкото зрачење** (космичките, гама и X-зраците). Овие потентни мутагени дејствуваат со различни механизми. Уште во 1927 година Милер (Henry Muller) забележал дека икс-зраците (X-зраци) предизвикуваат мутации кај винската мушичка. Подоцна е докажано дека со нив ефективно можат да се индуцираат мутации кај сите испитувани организми. Причината за таквите ефекти е тоа што X-зраците, како и гама- и космичките зраци се високоенергетски форми на радија-

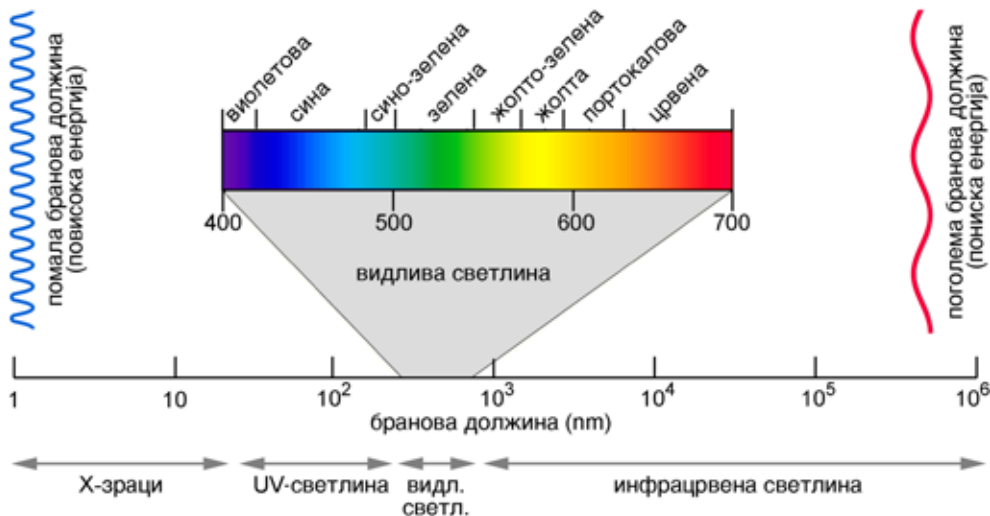


**Слика 14-11:** Некои хемиски промени на нуклеотидните кои предизвикуваат погрешно спарување со нормалните бази при DNA-репликацијата.



**Слика 14-12:** Интеркалирачки агенси и нивна интеракција со DNA-молекулот.

ција (слика 14-13), кои лесно пенетрираат во клетките и ткивата на организмите и предизвикуваат јонизација на молекулите на водата.



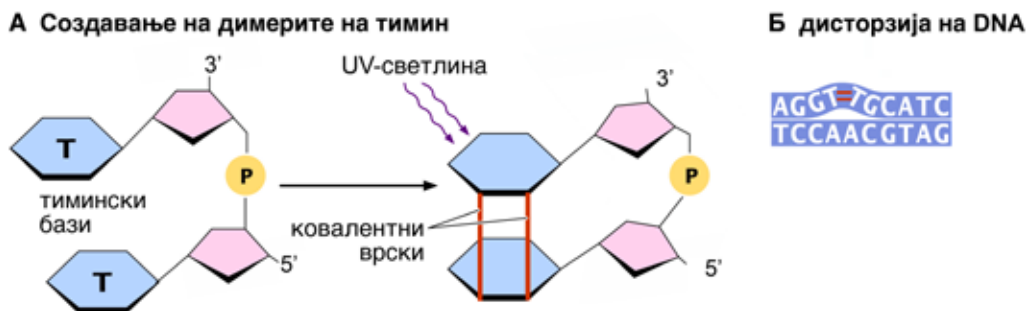
**Слика 14-13:** Дел од спектарот на електромагнетната радијација. Заради прегледност не се прикажани деловите од спектар кои се однесуваат на гама- и на космичките зраци (со положба кон лево од прикажаните на сликата), како и микробрановите и радио-брановите (кои се во спротивна насока, кон десно од прикажаниот дел на спектарот). Светлината која е видлива за човеково око опфаќа само мал сегмент од електромагнетниот спектар.

Токму јонизацијата на водата, како и другите молекули и слободните радикали кои се формираат интрацелуларно под дејство на ова зрачење се причина за мутагениот ефект од јонизирачкото зрачење. Слободните радикали, особено хидроксилниот радикал (OH<sup>•</sup>), реагираат со клеточните макромолекули и можат да ги оштетат. Нуклеотидите на DNA-молекулот можат да претрпат различни хемиски модификации под дејство на слободните радикали, а настанатите нуклеотидни деривати можат да предизвикаат погрешно спарување при репликацијата. Под дејство на јонизирачко зрачење, како во *in vitro*, така и во *in vivo* услови, најчесто настануваат точкестите мутации.

Голем број експерименти извршени врз широк дијапазон на растителни и анимални организми, како и податоците добиени при инциденти во нуклеарни центри и подморници, покажале дека, во определен опсег, индукцијата на точкестите мутации е линеарно пропорционална со експозицијата на јонизирачка радијација. Радијацииските мутагени ефекти се кумулативни, па, освен неколку исклучоци, фреквенцијата на мутации при повторуваното изложување на зрачење е во корелација со вкупното количество апсорбирана радијација.

Пуриноските и пиримидинските бази од DNA-молекулот ја апсорбираат ултравиолетовата (UV) светлина и тоа со апсорпциски максимум при бранова должина од 260 nm. Еден од најмногу проучените ефекти на UV-светлината е индуцирање на фотопродукти од типот на пиримидински димери преку формирање на ковалентна циклобутанска врска. Присуството на овие димери предизвикува несоодветно пре-

познавање од страна на DNA-полимеразата и дисторзија на DNA-молекулот, што предизвикува прекин на репликацијата (слика 14-14).



**Слика 14-14:** Создавање на фотопродукт (тимински димер) под дејство на UV-светлината. **А:** ковалентни циклобутански врски можат да се создадат меѓу две соседни тимински бази. **Б:** искривување (дисторзија) на DNA-молекулот поради создавањето на димерот.

Присуството на овие димери предизвикува несоодветно препознавање од страна на DNA-полимеразата и консеквентно вметнување на погрешен нуклеотид при репликацијата.

## Мутации предизвикани со мобилни гени

При процесот на транспозиција, односно при прескокнувањата на транспозоните во нови региони, нивната случајна инсерција во некој ген може да предизвика нарушување на интегритетот и функцијата на тој ген. Со тоа, транспозицијата дејствува мутагено, т.е. резултира со инсерциска мутација на генот при што истиот најчесто се инактивира. Многу поретко се случува при повторно прескокнување транспозонот да го „напушти“ афектираниот ген и со тоа тој да си ја врати функцијата. Мутациите предизвикани со транспозони се случувале екстремно често во текот на еволуцијата на човекот. Интересно е дека со молекуларни испитувања е покажано дека некои форми на хемофилија се предизвикани со инсерција на мобилни генски елементи. Транспозоните и механизмите за нивната репликација и мобилност низ геномот се опишани во главата 16: Геномика.

## 14.5 Мутациска стапка

Мутациската стапка се дефинира како број на мутации во една индивидуа (или гамета) во определен временски интервал, најчесто изразен преку некоја биолошка единица за време, какво што е времетраењето на клеточниот циклус, клеточната генерација или генерацијата на некој организам. Во хуманата генетика, пресметувањето на стапката на определена мутација се однесува речиси исклучиво

на релативно ретките рецесивни автозомни заболувања или за тие кои се врзани со X-хромозомот. Прецизното определување е отежнато и поради фактот што некои фенотипски карактеристики или заболувања можат да се резултат на повеќе од една мутација во определен ген, а обратно, некои мутации не предизвикуваат каков било детектибилен фенотипски ефект.

Единствено директното секвенционирање на DNA е ултимативна метода за утврдување на генските мутации, а со тоа и на прецизната мутациска стапка. Со оглед на ограничената применливост на оваа метода за помасовен скрининг, во генетиката почесто се користи определувањето на веројатноста за настанување на определена мутација со статистички методи, што е *Poisson*-овата дистрибуција, според следната равенка:

$$P_n = m^n e^{-m} / n!$$

каде  $P_n$  е веројатноста од настанување на  $n$  број на мутации во специфични локуси во определена популација на клетки или индивидуи, а  $m$  е опсервираниот број на мутации во истата популација

Пресметано е дека стапката на мутации од типот на нуклеотидните супституции се во ред на величина од 1 во 100000000 (односно  $10^{-7}$ ) нуклеотидни пара во DNA-молекулот по гамета.

Во пракса, реалното определување на мутациската стапка е многу тешко да се постигне. Фреквенцијата на постојните мутации во некоја популација не ја одразува најдобро мутациската стапка, поради тоа што една мутација може да се пренесе врз повеќе индивидуи од потомството. Покрај тоа, често постои и селективен притисок кој ја зголемува или намалува фреквенцијата на некоја мутација во определена популација. Мутациските стапки значително варираат меѓу различните гени кај еден ист организам, меѓу различните индивидуи, како и меѓу видовите. Пресметано е дека хаплоидниот хуман геном, кој содржи околу 3 милијарди нуклеотидни пара, секоја гамета поседува околу 30 нови мутации од типот на нуклеотидни супституции. Во однос на појавата на мутации во протеин-кодирачките гени, современите испитувања укажуваат дека мутациската стапка изнесува просечно по една мутација на секои 10000 гени. Под претпоставка дека во човековиот геном има најмалку 30000 гени, секоја индивидуа има околу 3 нови мутации во гените кои кодираат протеини. Се претпоставува дека најголемиот број на нови мутации во герминативните клетки кои се пренесуваат врз потомството настануваат кај машките индивидуи.

Причините за поголемиот број мутации во текот на сперматогенезата, наспроти оогенезата, се сè уште нејасни, иако се верува дека се должат на разликите во бројот на клеточни делби неопходни за создавање на зрели сперматозоиди во споредба јајните клетки. Покрај тоа, сперматозоидите се произведуваат многу подолго во текот на животот на индивидуата, во споредба со ооцитите кои настануваат рано кај женските лица.

Интересна е споредбата на мутациските стапки кај различни организми, особено при споредба на вредностите според определена должина од геномот, а уште повеќе во однос на вкупниот геном и на кодирачката DNA (**табела 14-1**).

**Табела 14-1: Мутациски стапки во геномите на разни организми**

организам / вирус	должина на геномот (kb)	мутациска стапка		
		по 1 kb *	по геном **	во однос на кодирачката DNA ***
бактериофаг M13	6,4	$7,2 \times 10^{-4}$	0,005	0,005
бактериофаг $\lambda$	49	$7,7 \times 10^{-5}$	0,004	0,004
<i>Escherichia coli</i>	4600	$5,4 \times 10^{-7}$	0,003	0,003
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12000	$2,2 \times 10^{-7}$	0,003	0,003
<i>Caenorhabditis elegans</i>	80000	$2,3 \times 10^{-7}$	0,018	0,004
<i>Drosophila</i>	170000	$3,4 \times 10^{-7}$	0,058	0,005
човек	3200000	$5,0 \times 10^{-8}$	0,160	0,004

\* мутирани бази во DNA со должина 1 kb врз генерација

\*\* мутирани бази во вкупниот геном врз генерација

\*\*\* мутирани бази во кодирачката DNA од вкупниот геном врз генерација

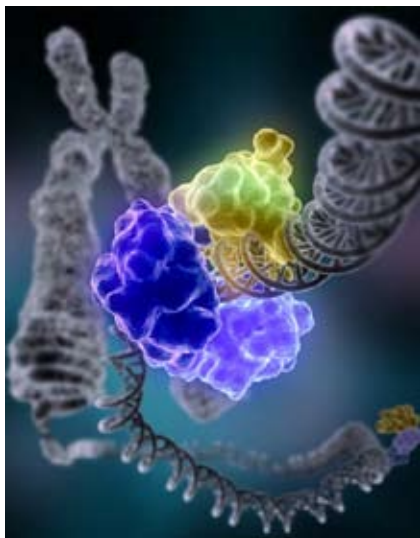
Имено, како што се гледа од табелата, мутациските стапки значително варираат меѓу организмите ако се изразат во однос на целосниот геном. Изразени врз фиксна должина од илјада нуклеотиди, мутациските стапки се намалуваат обратно пропорционално со комплексноста на организмите. Ако, пак, се изразат според вкупната должина на геномот, генерално, се зголемуваат пропорционално со должината на геномот кај организмите. Но, ако фреквенциите на мутациите се определат во однос на кодирачката DNA во секој од испитуваните геноми, тогаш се добиваат запрепаствувачки слични мутациски стапки кај широк дијапазон на биолошки ентитети.

## 14.6 Биолошка репарација на DNA-мутациите

Коригирањето на генските мутации е неопходен услов за опстанокот на организмите кои под влијание на спонтаната, како и енвиронментално индуцираната мутагенеза се изложени на постојани оштетувања на геномската DNA. Организмите, под еволуцискиот притисок, се стекнале со серија на ензимски системи за репарирање на оштетените DNA-молекули. Во нормални околности репарациските механизми отстрануваат голем дел од настанатите мутации во DNA-молекулот со ефективност која резултира со соодветна, еволуциски прифатлива, стапка на мутации. Нарушувањата на некои од клучните репарациски системи предизвикува и соодветен пораст на стапката на мутации. Некои хумани хередитарни заболувања, главно од автозомно-рецесивен карактер, се должат на дефекти во гените чии продукти учествуваат во DNA-репарациските системи. Всушност, многу од сознанијата за репарациските механизми се добиени токму од проучувањата на вродените заболувања каде овие механизми се нарушени.

Сите клетки поседуваат неколку системи за поправка кои можат да препознаат и да извршат репарација на различни видови на мутации во DNA-молекулите. Секој репарациски систем е составен од еден или од повеќе протеини кои имаат определена улога во соодветниот механизам на поправка. Во повеќето случаи, ре-

парацацијата на DNA е процес кој се одвива низ повеќе чекори (слика 14-15). Пред да се прикажат поединечните системи за корекција на мутациите, важно е да се има предвид дека, во голема мерка, тие се редундантни, односно мутациите можат да се коригираат со повеќе различни механизми и системи.



**Слика 14-15:** Компјутерски цртеж на DNA-лигизата која како обрач ја опфаќа едната верига во тек на репарацијата. Сликата е во јавен домен на интернет и е достапна на [www.wikimedia.org](http://www.wikimedia.org).

Интересно е што мутациите во транскрипциски активните региони од геномот се поправаат многу побрзо и поефективно отколку во хетерохроматинските региони.

Определени ензимски системи делуваат превентивно така што ги неутрализираат потенцијално штетните соединенија уште пред да реагираат со DNA-молекулот. Ензимот **супероксид дисмутаза** ги детоксифицира супероксидните радикали со конверзија до водороден пероксид, кој под дејство на **каталазата** се конвертира до вода, со тоа спречувајќи го оксидативното оштетување на DNA и на другите макромолекули. Протеинскиот продукт кодиран од *mutT* генот го превенира инкорпорирањето на 8-хидроксигуанинот, настанат под дејство на слободни радикали.

## Транслезиска DNA-синтеза

Доколку во текот на репликацијата DNA-полимеразата наиде на определени оштетувања во DNA-веригата какви што се пиримидинските димери, апуриински или апириимидинските места може да се примени репарациски механизам кој се нарекува **транслезиска синтеза**. Репарацијата се заснова на премостување на оштетувањето преку продолжување на DNA-синтезата низ регионот со оштетената урнек-верига „на сила“, по што и го добила името транслезиска: т.е. DNA-синтеза низ регионот со лезија (оштетување). Ваквата репарација ја вршат посебен тип на полимеразии (IV и V кај *E. coli* и Pol  $\zeta$ , Pol  $\eta$ , Pol  $\kappa$  и Pol  $\lambda$  кај луѓето). Овие полимеразии се способни за транслезиска синтеза, но, се склони кон грешки при вградувањето на нуклеотидите во новосинтетизираните вериги, па, воведуваат нови мутации во регионот на оштетувањето на DNA-молекулот кое го реплицираат. Со овој репарациски механизам, успешното извршување на репликацијата го оптоварува геномот на клетката со до-



полнителни мутации, кои, по целосното довршување на репликацијата, можат да се коригираат со другите репарациски механизми.

Репарацијата со механизмите на **рекомбинација** и **системот SOS** ги коригираат оштетувањата на DNA-молекулот кои доведуваат до запирање на репликацијата, а не на супституциските мутации. Оштетувањата од овој тип предизвикуваат активација на системот SOS и низа други клеточни механизми кои се вклучени во репарацијата на оштетена DNA. Рекомбинациската репарација ги препознава едноверижните прекини непосредно по репликацијата и ги коригира преку рекомбинантна замена користејќи го неоштетениот сестрински двоверижен DNA-молекул. SOS-системот е екстремна форма на транслезиска синтеза кај бактериите. Имено, овој систем ги репарира лезиите кои ја блокираат репликацијата на тој начин што на нивно место го вметне неопходниот број на (најчесто погрешни) нуклеотиди. Слично како при механизмот на транслезиска синтеза, и самиот систем SOS е одговорен за настанување на генски мутации. Овој систем, како и рекомбинаторните механизми, не доведуваат до вистинска корекција на оштетените DNA-секвенци, туку само го овозможуваат довршувањето на репликацијата. Заостанатите лезии мораат да се коригираат со другите репарациски механизми.

## Пострепликациска репарација

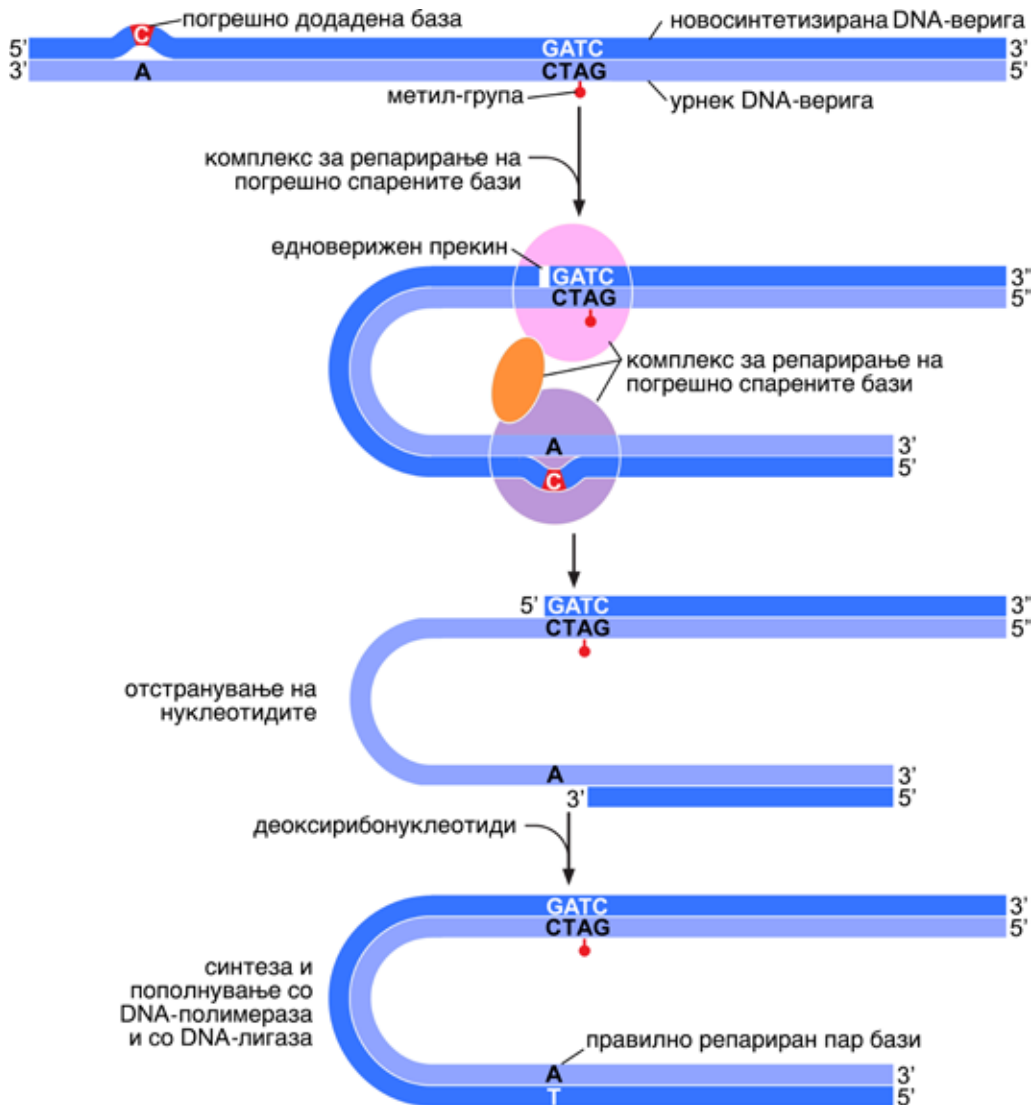
Овие механизми се однесуваат на три различни системи: репарација на погрешно спарените бази, рекомбинациското репарирање и на т.н. SOS--одговор.

Имено, иако репликацијата се карактеризира со мошне висока прецизност, грешките неизбежно се случуваат и предизвикуваат мутации кои, ако не се поправат, можат да се пренесат на следната генерација клетки. Непосредно по репликацијата, нелегитимно спарените бази, односно тие кои не се повинуваат на Вотсон-Криковото комплементарно спарување, се коригираат со претходно споменатата 3'→5' егзонуклеазна „лекторска“ (англ. *proofreading*) активност на соодветната DNA-полимераза, која ги отстранува нелегитимно спарените нуклеотиди. Кај бактериите, се смета дека со ваквата активност се отстрануваат околу 99% од репликациските грешки.

Погрешно инкорпорираните нуклеотиди кои ја избегнале егзонуклеазната 3'→5' корекција во текот на самата репликација, се коригираат со **репарација на погрешно спарени бази**. Овој систем се заснова на препознавање на погрешно спарените бази и нивна замена со помош на посебен комплекс на протеини и ензими. Покрај тоа, се коригираат и куси јамки во едната DNA верига настанати поради пролизгување во текот на репликацијата кои, како што е веќе објаснето, можат да доведат до делеции или инсерции. За препознавање на погрешно додадените бази во текот на синтезата на новата DNA-верига, овој комплекс мора да ги разликува новосинтезираната од урнек DNA-веригата.

Кај прокариотите, овој репарациски комплекс ги разликува двете комплементарни вериги според присуството на метил-групи на посебни секвенци од старата (урнек DNA-верига). Во определен временски период по репликацијата, новосинтезираната верига од DNA-хеликсот се подвргнува на метилирање на аденинскиот остаток од секвенцата: 5'-GATC-3', и тоа на позицијата C-6 од аденинот. Метилацијата ја извршува ензимот **аденин метилаза** кој е дел од комплексот. Метилраниот

аденин и понатаму е склон да се спарува со комплементарниот тимин, па, оваа измена не влијае врз натамошната репликација на DNA-молекулот. Но, во тек на кусиот временски интервал во кој новосинтетизираната верига сè уште не е метилирана, таквите метил-групи постојат само на наведените секвенци од старата верига и токму така овој репараторен систем ја препознава оригиналната, немутирана секвенца (слика 14-16).



**Слика 14-16:** Принцип на функционирање на системот за репарација на погрешно спарените бази кај *E. coli*.

Поедноставено, 3'-егзонуклеолитичкиот систем ги коригира базите кои не се комплементарни на метилираната старосинтетизирана (урнек-) верига од двојниот DNA-хеликс. Откога комплексот на протеини од овој систем ќе ја идентифицира новосинтетизираната верига со погрешно вметнатата база, ја поставува до DNA ре-

гионот со метилираната секвенца: 5'-GATC-3'. Потоа **ендонуклеазата** од комплексот предизвикува едноверижен прекин на новосинтезираната верига веднаш до неметилираната секвенца, а **егзонуклеазата** ги отстрануваат сите нуклеотиди од оваа секвенца до погрешно спарената база. DNA-полимеразата ги надополнува отстранетите нуклеотиди со стандардна 5'→3' синтеза и **DNA-лигазата** ја воспоставува фосфодиестерската врска. Покрај наведените ензими, во овој репарациски комплекс кај *E. coli* учествуваат и **DNA-полимеразата III**, како и протеинските продукти на гените *MutH*, *MutL* и *MutS*.

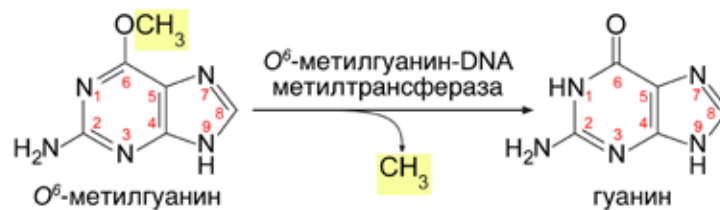
Сличен систем се наоѓа и кај еукариотите, но, тој не вклучува метилација на аденинот. Кај некои еукариотски организми, какви што се *S. cerevisiae* и *D. melanogaster*, не е забележана ваква форма на метилација, но, репарацијата на погрешно спарените бази сепак се случува. Кај луѓето е идентифициран комплекс на протеини за корекција на погрешно спарените нуклеотидни бази, кој е функционално еквивалентен на прокариотскиот систем. Механизмот на дејствување вклучува врзување со определени парови (GC), преку GC-врзувачкиот протеин, препознавање на некорктно спарените бази, нивно отстранување, репарациска синтеза на комплементарен сегмент и соодветно лигирање со околните 5'- и 3'-краеви на оштетената верига.

Важно е што кај луѓето, вродените мутации кај гените кои ги кодираат протеините вклучени во репарацијата на погрешно спарените бази предизвикуваат повисока стапка на соматски мутации и поголема склоност кон малигни тумори, пред сè кон херeditарниот неполипозен карцином на дебелото црево.

## Директна репарација

Со овој механизам се поправаат хемиски променетите нуклеотиди кои предизвикуваат DNA-мутации. Имено, директната репарација не врши замена на оштетените нуклеотиди, туку ги регенерира во нормална нуклеотидна структура. Оттаму некои автори ја нарекуваат и **реверзија на оштетувањето**. Тоа е возможно само кај реверзибилните лезии во DNA, какви што се тиминските фотодимери настанати под дејство на UV-светлина. Кај прокариотите, нижите еукариоти, и некои растенија, идентифициран е ензимот **фотолиаза** кој се врзува за фотодимерот и ја раскинува циклобутанската врска меѓу соседните тимински бази. За активноста на овој ензим неопходна е видлива светлина со бранова должина во опсег на сината боја, по што целиот процес е означен како фотореактивација. Досега, DNA-фотолизата не е најдена кај плаценталните цицачи, па, кај нив, фотодимерите предизвикани од UV-светлината, мораат да се поправаат со други механизми.

Алкилтрансферазите се ензими кои, исто така, се вклучени во директната репарација на мутациите предизвикани од погрешно спарување поради алкилирање на нуклеотидните бази.

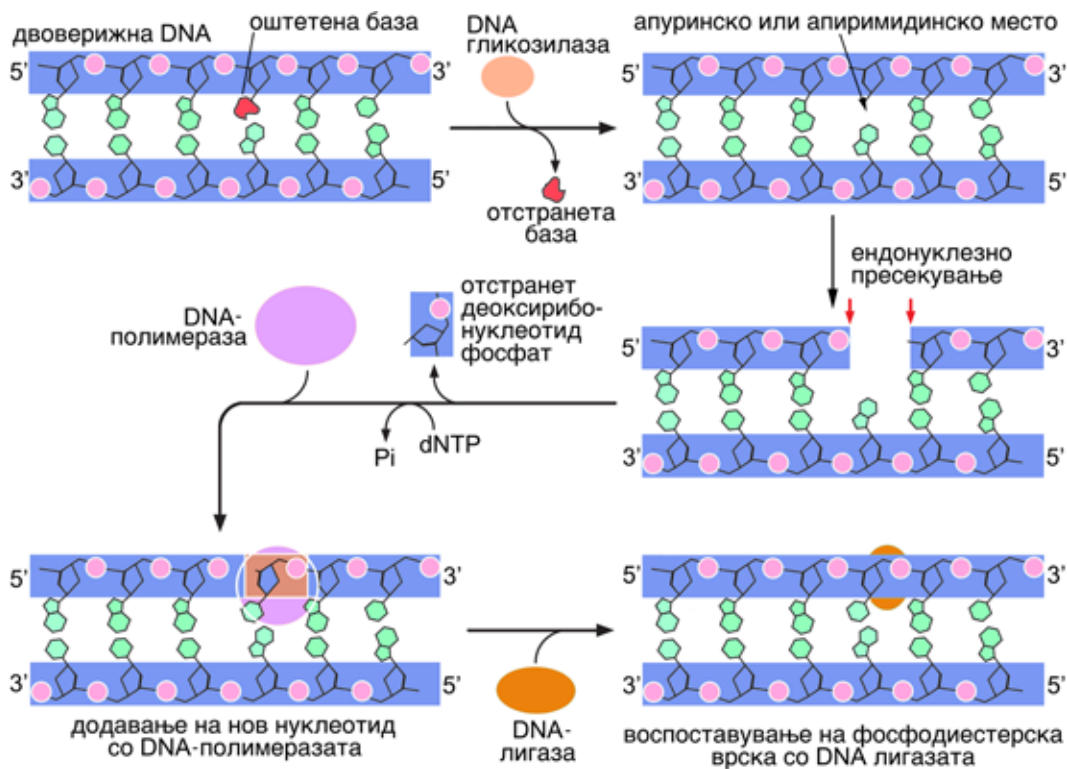


**Слика 14-17:** Пример за конверзија на адуктот метилгуанин во гуанин со еден од ензимите за директна репарација на оштетени база.

На пример, ензимот *O*<sup>6</sup>-метилгуанин-DNA метилтрансфераза може да ја отстрани метил-групата адирана во *O*-6 позицијата на гуанинот под дејство на нитрозогуанидин (слика 14-17).

## Репарација со базна ексцизија

Основната карактеристика на ваквиот репарациски механизам е отсекување-то, т.е. ексцизијата на оштетената база преку пресекување на гликозидната врска со која е поврзана со деоксирибозата, а преку неа и со целиот молекул на DNA (слика 14-18).



**Слика 14-18:** Репарација на хемиски изменетата база преку нејзино отсекување од двоверижната DNA и замена со соодветен нуклеотид.

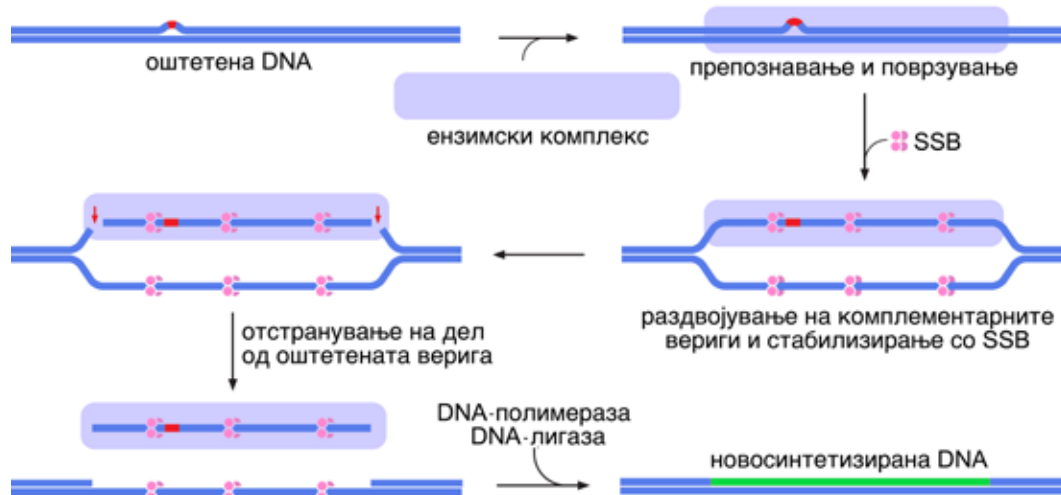
Отстранувањето го вршат ензимите DNA-гликозилази кои ја пресекуваат *N*-гликозидната врска која ја поврзува базата со 1'-C атомот на деоксирибозата од DNA-веригата. Постојат гликозилази специфични за секоја модифицирана, т.е. хемиски оштетена, база. Во зависност од типот на базата која е отстранета, се појавува апуриноско или апириимидинско место во DNA-хеликсот. Посебен тип на ендонуклеази кои препознаваат токму апуриноски или апириимидински места (понекогаш наречени *AP*-ендонуклеази) ги пресекуваат двете фосфодиестерски врски, а други

ензими ја отстрануваат деоксирибозата. Потоа, DNA-полимеразата I (кај *E. coli*) или Pol  $\beta$  (кај еукариотите) додава нов нуклеотид на слободната 3'-хидроксилна група кој се спарува со тој од комплементарната верига. На крајот, DNA-лигазата ја воспоставува и последната фосфодиестерска врска, со што се заменува целиот нуклеотид на местото на кое претходно имало оштетена база.

## Репарација со нуклеотидна ексцизија

Овој репарациски систем е меѓу најважните и еволуциски најконзервираниите, односно присутен е кај речиси сите клеточни организми: од бактериите, па, сè до луѓето. Клетките обично го применуваат при појава на покрупни оштетувања во DNA-молекулот, какви што се пиримидински димери, на пример, кои доведуваат до дисторзија на двојниот хеликс. Во процесот учествуваат голем број протеини кои создаваат големи комплекси за репарацијата според овој механизам (слика 14-19). Репарацијата со нуклеотидна ексцизија започнува со скенирање на двоверижниот DNA-молекул со репарацискиот протеински комплекс кој ги препознава нарушувањата на конфигурацијата на хеликсот предизвикани од присуство на пиримидински димери и други оштетувања. Хеликазната активност на комплексот ги раздвојува двете комплементарни вериги, а во одржувањето на таквата состојба помагаат протеините кои се врзуваат со едноверижна DNA (слично како и при репликацијата). Самата репарација може да се врши со различни молекуларни механизми, но, се заснова на предизвикување на прекини на фосфодиестерските врски од обете страни на регионот од оштетената DNA-веригата, што резултира со негова ексцизија, односно отсекување. Потоа, настанатиот прекин се надоместува преку репарациска синтеза со DNA-полимеразата и лигирање со DNA-лигазата.

Кај вроденото автозомно-доминантно заболување **Xeroderma pigmentosum**, постои хомозиготност за определени мутации во некој од седумте гени чии продук-



**Слика 14-19:** Принцип на репарација со механизмот на нуклеотидна ексцизија. SSB: протеини кои се врзуваат со едноверижна DNA (од англ.: single-strand binding proteins).

ти се протеините вклучени во механизмот на репарација со нуклеотидна ексцизија. Поради тоа што нивните клетки не можат да ги поправаат тиминските димери, заболените лица се екстремно чувствителни кон UV-светлина и имаат околу 2000 пати повисока застапеност на карциноми на кожата во однос на останатата популација.

## Репарација на доверижни прекини

Покрај различните типови оштетувања во едната верига од двојниот DNA-хеликс, можат да настанат оштетувања кои ги опфаќаат двете комплементарни вериги, каков што е доверижниот прекин при експонирање на клетките кон јонизирачко зрачење. Таквите оштетувања на DNA-молекулите се многу опасни и можат да предизвикаат различни хромозомски реаранжирања, малигна трансформација или смрт на клетката. Доверижните прекини се поправаат со поврзување на прекинатите DNA-хеликс со фосфодиестерски врски и за таа цел, кај еукариотските клетки, можат да учествуваат два различни механизми.

Едниот е со **хомологна репарациска рекомбинација** и е многу слична на претходно опишаната хомологна генска рекомбинација. Овој процес вклучува создавање на хетеродуплекс меѓу сестринските хроматиди од хромозомот. По потреба, се врши непосредно по репликацијата (кон крајот на S или почетокот на G<sub>2</sub>-фазата од клеточниот циклус) кога DNA-регионите од нештетената сестринска хроматида можат да послужат како урнек за хомологната рекомбинација.

Вториот механизам за поправка на доверижните прекини се врши преку **нехомологното спојување на краевите** и тоа во G<sub>1</sub> фазата, пред почетокот на репликацијата. Ваквото поврзување го спроведува комплекс на протеини кодирани од различни гени. Протеините од овој комплекс ги препознаваат доверижните DNA-прекини и предизвикуваат скусување на прекинатите вериги, а потоа и нивно поврзување со лигазна активност. Таквиот механизам предизвикува извесно скусување на DNA-молекулот, а со тоа и губење на дел од информациите, па, системот е склон кон воведување на нови грешки во регионот кој го поправа. Покрај тоа, ако се присутни повеќе доверижни прекини, овој систем може да предизвика и покрупни хромозомски реаранжирања.

Сепак, мутациите во гените чии продукти се вклучени во ваквиот репарациски механизам предизвикуваат низа на вродени и други заболувања. Кај луѓето, од особена важност се гените *BRCA1*, и *BRCA2* чии мутации се поврзани со фамилијарна склоност кон почеста појава од карциноми на дојката и овариумите. **Ataxia telangiectasia** е вродено заболување карактеризирано со низа невролошки, васкуларни и имунолошки нарушувања, но, и со висока застапеност на леукемии и лимфоми, а се должи на мутации во определени гени од системот за репарација на доверижните прекини.

## 14.7 Еволуциско и биолошко значење на мутациите

Поединечниот ефект на разните генски мутации врз индивидуите е често пати негативен и може да предизвика сериозни, главно, летални заболувања. Но, генските мутации и покрупните геномски прераспределби се неопходни за еволуцискиот процес, при што воведуваат доволна стапка на индивидуална варијабилност во рамките на видот, а сепак обезбедуваат негово преживување. Имено, мутациите, заедно со генетските рекомбинации и генската имиграција, се т.н. извори на генски варијации и со тоа имаат исклучително значење во создавањето на нови гени и видови организми во текот на еволуцијата. Сепак, иако мутациите се ултимативен извор на варијациите, самиот процес на мутагенеза не ја движи еволуцијата и не е доволен за брзи еволуциски промени и појава на нови видови. Мутациските стапки за повеќето генски локуси и за поголемиот број виши анимални видови како и за човекот, се премногу ниски, а ефектите на мутациите премногу детриментални за да претставуваат еволуциски погон сами за себе. Без рекомбинацискиот процес во текот на сексуалната репродукција и без имигрирањето на гените во други популации, мутациите се недоволни за еволуциските потреби за варијација.

Важно е да се има предвид дека, кај повеќеклеточните организми кои се размножуваат сексуално, само герминативните мутации (т.е. тие во половите клетки) имаат еволуциско значење, но, соматските мутации се важни за самиот индивидуален организам.

Имено, доколку во клетката се акумулираат преголем број на мутации, односно оштетувања на DNA-молекулот, ако тие се наоѓаат во критични гени или ако репарациските механизми не успеат да ги поправат, кај клетките на вишите метазојски организми можат да се случат три сценарија: сенесценција (неповратна состојба на намалување на метаболизмот и излегување од клеточниот циклус ( $G_0$  фаза), апоптоза (програмирана клеточна смрт) или малигна трансформација на клетката. Сите овие три процеси се објаснети поопширно во натамошниот текст.





# МОЛЕКУЛАРНА ГЕНЕТИКА НА БАКТЕРИИТЕ И ВИРУСИТЕ

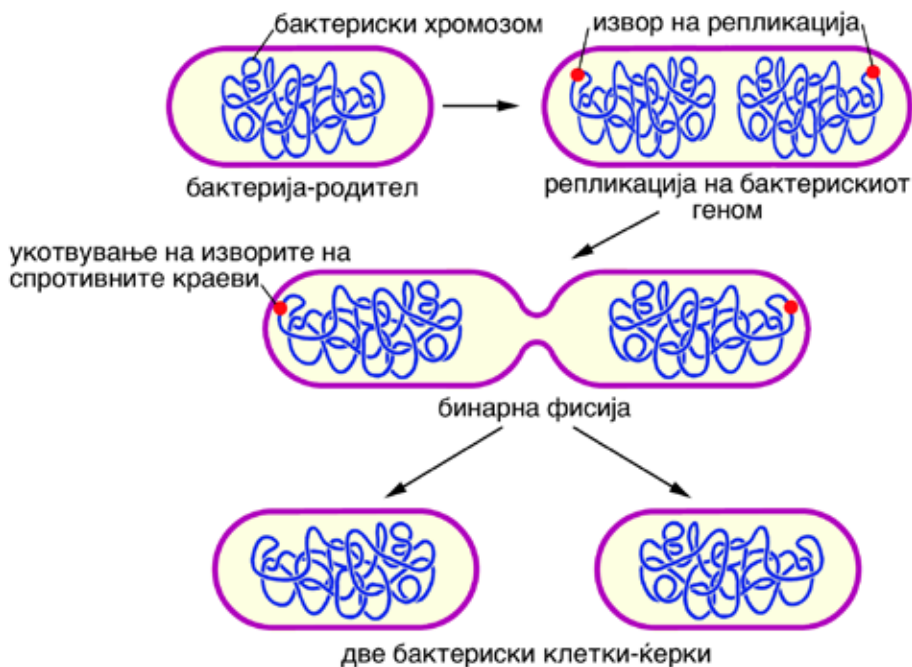
## Глава 15

**Б**актериите и вирусите се исклучително многу истражувани објекти во молекуларната биологија и молекуларна генетика. Причините за тоа се што, пред сè, овие биолошки ентитети брзо се размножуваат, па, за кратко време може да се добие популација составена од огромен број речиси идентични единици. Геномот на вирусите и на повеќето бактерии е многу помал од тој на еукариотите, што значително ги олеснува лабораториските манипулации. Покрај тоа, имаат хаплоиден геном, па, сите мутации директно се експримираат. Иако вирусите, по дефиниција, не се живи организми, нивната способност да се размножуваат во клетките кои ги инфицираат, овозможува низа предности при проучувањето на вирусните гени. Голем број важни експерименти и откритија се извршени токму со користење на бактериите и вирусите, а освен за базичните науки, нивната важност е голема и за медицината, ветерината и земјоделието.

### 15.1 Размножување на бактериите и издвојување на мутантни соеви

Вообичаено, бактериите се размножуваат асексуално со проста клеточна делба (наречена и бинарна фисија), при која клеточната DNA се реплицира, а потоа бактеријата се дели на две клетки-ќерки со по една копија од реплицираниот геном (слика 15-5). Оттаму, од генетски аспект, бактериите се **моноплоидни** организми.

Поради тоа што бактериите се размножуваат асексуално (бесполово), возможно е релативно лесно изолирање на чисти соеви. Имено, овие организми можат едноставно да се култивираат во евтини лабораториски услови во течни или цврсти хранливи подлоги (медиуми), во кои можат да се додаваат точно определени состојки. По засевањето на хранливите подлоги, бактериите се инкубираат на соодветна температура (најчесто на 37° C), при што се размножуваат мошне бргу, создавајќи екстремно голем број на клетки. Со тоа и ретките мутанти можат да се идентифицираат во разумно кусо време. Другите експериментални предности на прокариотските клетки е што нивната култивација не зазема многу простор, а и нивните биохемиски и други биолошки карактеристики се проучувани повеќе од еден век и се релативно добро познати.



**Слика 15-5:** Проста делба (бинарна фисија) со која вообичаено се размножуваат бактериските клетки.

Од тие причини, бактериите се едни од најчесто користените организми- модели во молекуларната генетика. Нивната употреба е особено интензивна во генетскиот инженеринг, каде што се користат за клонирање на гените, како и за експресија на протеините, што е поопширно објаснето понатаму.

Размножувањето на бактериските клетки е особено интензивно во течните хранливи подлоги. По инокулацијата (засавањето) на епрувета со стерилна течна подлога, бактериските клетки брзо се размножуваат сè додека медиумот не се засити со токсични продукти ослободени од бактериите или додека не се исцрпат хранливите состојки на самата подлога. На цврстите подлоги, кои содржат и зацврстувачка материја: агар-агар, засаените бактериски клетки создаваат групации на генетски идентични клетки кои се означени како колонии. Кога колониите ќе достигнат најмалку  $10^7$  бактерии формираат клеточна маса во форма на **бактериски колонии** кои се видливи со голо око (**слика 15-1**). Тоа овозможува броење и забележување на некои основни фенотипски карактеристики на бактериите (какви што се формата и бојата на колониите).

Уште поважно, земањето на мал примерок од некоја колонија овозможува засавање врз друга цврста подлога или инокулирање во течен медиум со што се добиваат голем број бактериски клетки од генетски „чист“ сој. Интересно е што течната култура на *E. coli* може да содржи дури  $5 \times 10^9$  бактериски клетки на милилитар.

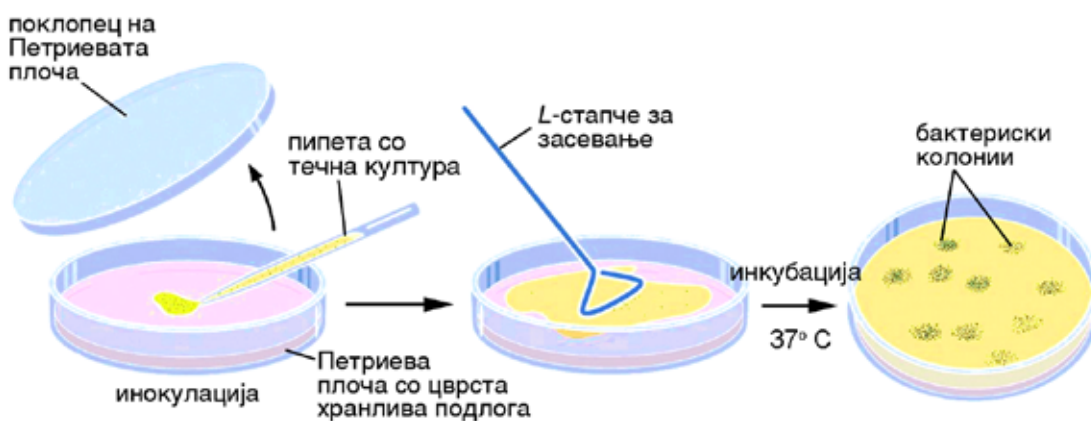
Во проучувањето на бактериската генетика, посебно значење имаат мутантните соеви на бактерии, а особено нутритивните мутанти. Имено, бактериите од див-

иот тип се означуваат како **прототрофни**, поради тоа што можат да се размножуваат во т.н. **минимален медиум** во кој се присутни само неоргански соли, определен шеќер, извор на азот (често амониум хлорид) и вода.

### А засевање на течна хранлива подлога



### Б засевање на цврста хранлива подлога

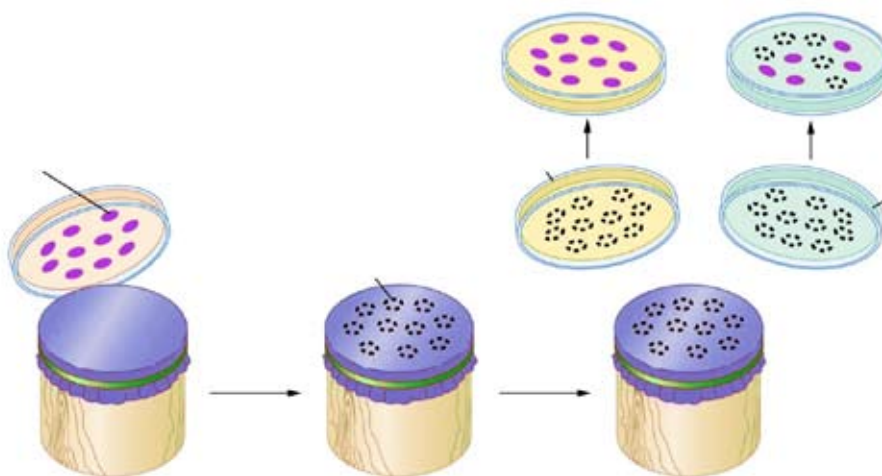


**Слика 15-1:** Засевање на бактериите во течна (А) или цврста (Б) бактериолошка хранлива подлога.

Спротивно, бактериските мутанти кај кои отсуствува еден или неколку ензими, не можат да растат сè додека во медиумот не се присутни специфични компоненти какви што се: аденин, треонин или биотин, на пример. Таквите нутритивни мутанти се нарекуваат **ауксотрофни**. На пример, ауксотрофниот мутантен сој на бактерии кај кои отсуствува експресија на функционален ензим за синтеза на аминокиселината треонин, не може да се размножува во минимален медиум, туку само во подлога во која е додадена оваа состојка. При генетските истражувања важни се

и мутантните бактерии кои, за разлика од дивиот тип, не можат да користат некој специфичен извор на енергија, како лактозата, на пример. Мошне често се користат и бактериските соеви кои се резистентни кон определен антибиотик, каков што е тетрациклинот или стрептомицинот.

Сиве овие мутантни имаат улога на **генетски маркери** за проучување на нивните фенотипски карактеристики и идентифицирање на нивниот генотип. Тоа може да се илустрира преку примерот за издвојување на ауксотрофниот мутант на *E. coli* кој не може да синтетизира леуцин (т.н. *leu* мутант). За таа цел, бактериите се засеваат врз цврста подлога (хранителен агар) во Петриева плоча во која се наоѓа комплетен медиум (со присутен леуцин) (**слика 15-2**).



**Слика 15-2:** Пренесување на колониите од една оригинална врз повеќе Петриevi плочи со техниката на отпечатоци. Површината на цврстата подлога со израснати колонии се притиска врз стерилизирана сомотска ткаенина навлечена врз дрвен печат. Отпечатокот залепен на површината на сомотот понатаму се пренесува врз други плочи со различни селективни хранливи подлоги со што можат едноставно да се издвојат потребните бактериски мутанти.

По инкубацијата, и прототрофните (со *leu*<sup>+</sup> алел) и ауксотрофните (со *leu* алел) бактериски клетки ќе израснат формирајќи колонии врз површината на подлогата. Потоа, се засеваат отпечатоци од оваа оригинална Петриева плоча врз други две плочи, едната со комплетна цврста подлога, а другата со селективна подлога во која недостасува аминокиселината леуцин. По инкубацијата, бактериските клетки кои се *leu*<sup>+</sup> ќе израснат во видливи колонии и во двете Петриevi плочи, додека *leu* мутантите ќе растат само во комплетниот медиум во кој има леуцин, поради тоа што самите не можат да го синтетизираат.

Со споредување на положбата на секоја од колониите меѓу отпечатените и оригиналните колонии можат да се идентифицираат ауксотрофните *leu* бактерии. Тие формираат колонии само на комплетната подлога, но, отсутнуваат на тие места од површината на селективната подлога во која отсутнува леуцинот. Токму коло-

ниите кои се израснати врз комплетната подлога, а отсутствуваат кај селективната подлога, се соевите со *leu* мутантни бактерии.

Сличен принцип може да се употреби и за изолирање на други ауксотрофни мутанти кои се користат во генетските истражувања на бактериите.

## 15.2 Плаزمиди - екстрахромозски DNA-молекули кај бактериите

Покрај основниот хромозом, кај многу бактериски клетки се наоѓаат и помали, циркуларни DNA-молекули кои се долги неколку десетици до стотици илјади базни парови и се наречени **плазмиди** (слика 15-3). Во една бактериска клетка може да биде присутен само еден или, пак, повеќе плазмиди. Плазмидите не се вируси: тие немаат протеинска обвивка и не ја „киднапираат“ клеточната машинерија за синтеза на своите протеини, каков што е случајот со вирусите. Во принцип, плазмидната DNA содржи гени кои не се есенцијални за самата бактериска клетка, но, кои можат да имаат важна улога при размножувањето и појава на нови фенотипски особини кај бактериите. Плазмидите можат да се интегрираат и во самиот бактериски циркуларен хромозом, но, најчесто не се интегрирани и слободно се размножуваат во бактеријата, независно од репликацијата на бактерискиот хромозом, а тогаш се означуваат како **епизоми**.



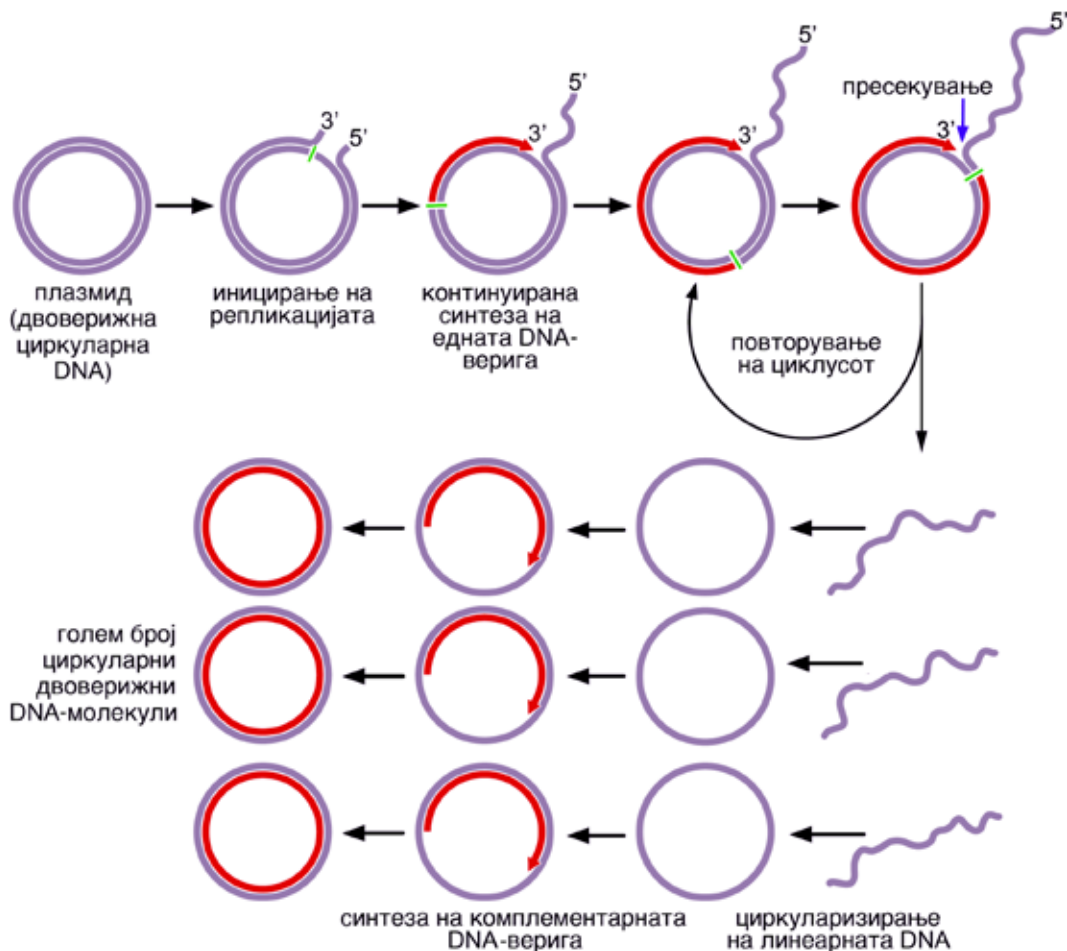
**Слика 15-3:** Плазмиди фотографирани со трансмисиони електронски микроскоп. Фотографијата е вештачки обоена (т.н. лажни бои).

Некои плазмиди го посредуваат преносот на генетски материјал меѓу бактериите, па, се наречени **фактори на фертилноста** (каков што е F-плазмидот кај *E. coli*, на пример) и кодираат гени кои се неопходни за процесот на конјугација. Други плазмиди познати како **фактори на резистентност (R-фактори)** кодираат ензими за модификација или разложување на некои антибиотици. Поради тоа што можат да ги пренесат гените за отпорност кон антибиотици меѓу бактериите, тие се важни за медицинската микробиологија. Покрај нив, познати се и R-фактори што им обезбедуваат резистентност кон тешки метали на бактериите кои ги содржат. Голем број плазмиди (т.н. **метаболични фактори**) содржат гени кои им овозможуваат на бактериските клетки-реципиенти да се стекнат со невообичаени метаболични функции, каква што е способноста за користење на нафтата како извор на јаглерод. Важно е што плазмидите екстензивно се користат во генетскиот инженеринг.

Во основа, плазмидите претставуваат двоверижни циркуларни DNA-молекули, па, можат да се реплицираат или според тета-моделот (**глава 7**) или со посебен, т.н. **сигма-модел** или **модел на ротирачка репликација**, кај кои синтезата на DNA тече во кружна насока, потиснувајќи го 5'-крајот од прекинатата верига, додека интактната (внатрешна) верига има улога на урнек-верига (**слика 15-4**).

Сликовито, ротирачката репликација може да се спореди со одмотување на конец од макара. Во почетокот на овој процес настанува прекин на фосфодиестерската врска во една од двете вериги на двоверижната циркуларна DNA со што се





**Слика 15-4:** Шематски приказ на моделот на ротирачка репликација кај плазмидите и кај некои вируси. Синтезата се иницира со прекин на едната од двете циркуларни DNA-вериги на местото на изворот на репликација (*ori*) кое е означено со зелена боја.

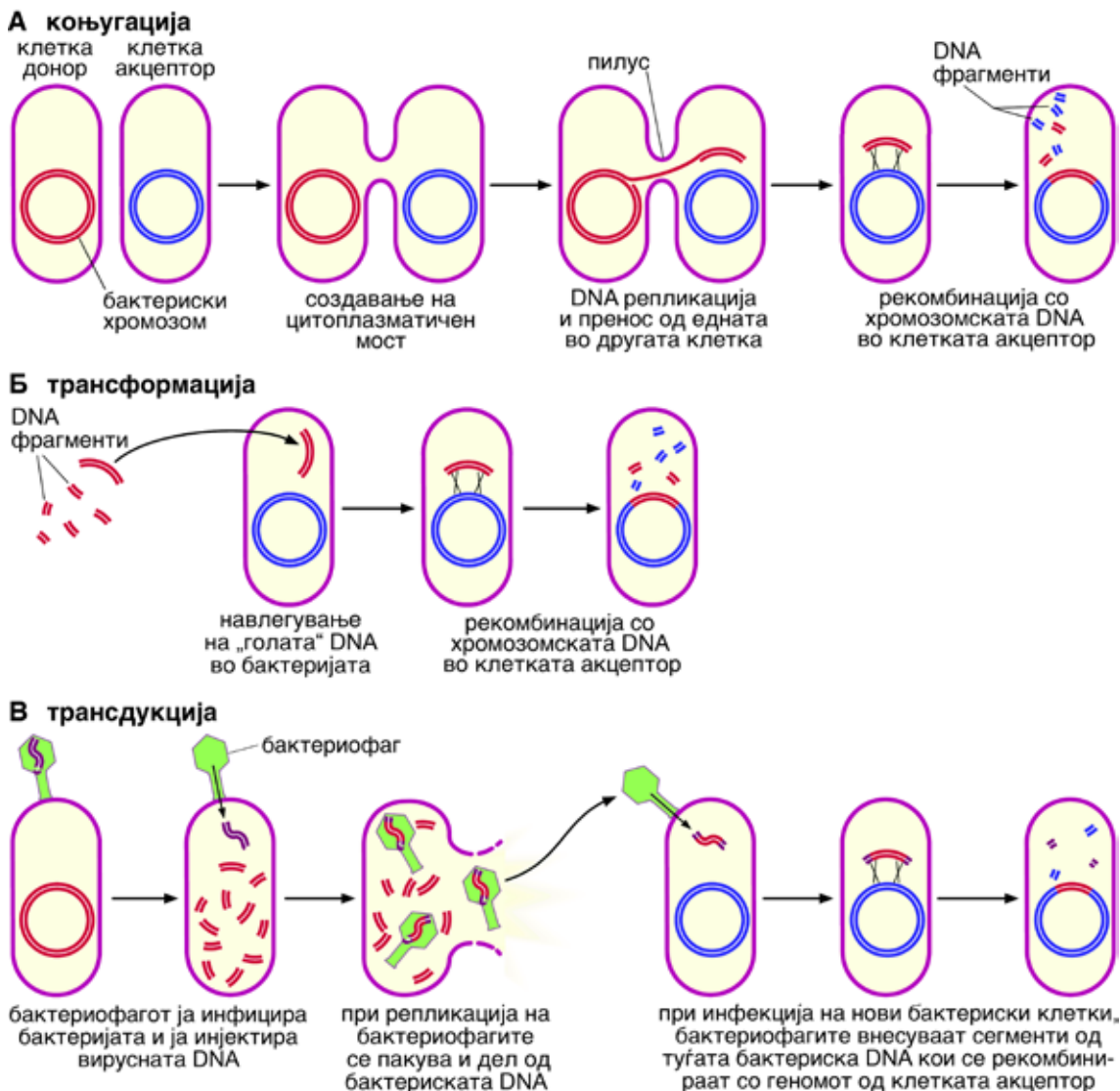
создаваат по еден слободен 3'-хидроксилен крај и 5'-фосфатен крај. Синтезата на новата DNA-верига започнува со додавање на нуклеотиди на 3'-хидроксилниот крај според комплементарноста на нуклеотидите од другата, непрекината циркуларна DNA-верига која има улога на урнек. При тоа, урнек-веригата се истиснува во вид на 5'-фосфатна опашка. Прекилот на новосинтетизираната верига со нуклеаза ја ослободува линеарната DNA, со што се создава двоверижен циркуларен DNA-молекул. Репликацијата може да продолжи повеќе пати, со што се акумулираат повеќе копии со идентична секвенца. Како што се гледа на сликата, со секое кружно свртување, 3'-крајот кој расте ја потиснува веригата синтетизирана во претходниот циклус. Ослободените едноверижни линеарни DNA-молекули циркуларизираат пред или по синтезата на комплементарни вериги.

Моделот на ротирачка репликација го користат и некои бактериски и еукариотски вируси, а се смета дека учествува и во текот на сложената репликација на хлоропластната DNA. Во текот на овие процеси, синтезата може да се врши посложено отколку што е погоре објаснето.



### 15.3 Рекомбинации кај бактериите

Генетиката на мутациите кај бактерииските соеви биле предмет на интензивни истражувања уште од почетокот на 20-тиот век при што преовладувало убедувањето дека при таквата едноставна делба не се случуваат никакви размени ниту рекомбинации на генетскиот материјал. Но, експериментите вршени од страна на Ледерберг и Татум (Joshua Lederberg и Edward Tatum) вршени во текот на 1940-тите години, довеле до откривање на процесот на размена на генетскиот материјал меѓу бактериите, слично како и при сексуалното размножување. Наспроти еукариотите,



**Слика 15-6:** Трите главни процеси на пренос на гените кај бактериите. **А:** конјугација со директен пренос на бактерииска DNA меѓу две клетки; **Б:** трансформација со внесување на „гола“ бактерииска DNA од околината во клетката; и **В:** трансдукција со бактерииски вируси (бактериофази).

кај кои рекомбинацијата на гените се врши меѓу геномите на двата родитела, рекомбинацијата кај прокариотските клетки е резултат на интеракцијата на клеточниот геном со далеку помал DNA-сегмент од друга бактериска клетка. Сепак, размената на генскиот материјал кај бактериите е многу поразлична од сексуалната репродукција кај диплоидните еукариоти. Бактериите се хаплоидни организми, а меѓусебната размена на DNA и самото бактериското размножување се различни и целосно одвоени процеси. Покрај тоа, DNA-молекулите (т.н. туѓа DNA) кои се пренесуваат во друга бактериска клетка најчесто се разложуваат, доколку не се рекомбинираат со нејзиниот хромозом и не се интегрираат во него.

Рекомбинацијата на бактериските гени може да се одвива преку три основни начини: со конјугација, трансформација и трансдукција (слика 15-6).

**Конјугација** е процес при кој DNA-молекулот еднонасочно се пренесува од една во друга бактериска клетка преку посебна врска наречена конјугациски мост или пилус. Притоа се пренесува дел од бактерискиот геном или од плазмидната DNA и се рекомбинира со хромозомот од реципиентната клетка.

Кај **трансформацијата**, DNA-молекулите ослободени во медиумот од една бактериска клетка навлегуваат во друга и се рекомбинираат со нејзиниот хромозом.

**Трансдукцијата** претставува пренос на DNA од една во друга бактериска клетка преку вируси (бактериофази). По внесувањето на туѓата DNA, таа може да се рекомбинира со хромозомот од инфицираната бактерија.

Овие три типа на пренос на генетскиот материјал не се случуваат кај сите бактериски видови. Конјугацијата, на пример, е почеста кај едни, а исклучително ретка кај други видови бактерии. Трансформацијата е можна само кај мал број видови, но, оптимизирани се лабораториски методи кои ја зголемуваат успешноста на преносот на DNA во бактериите, поради големата важност при генетските експерименти. И трансдукцијата, исто така, е можна само кај ограничен број бактериски видови кои се подложни на инфекција со соодветни бактериофази.

Постојат голем број експериментални податоци дека кај некои гени бактериите ги стекнале од други бактерии и дури од еукариотски клетки преку процесот наречен **хоризонтален генски трансфер**. Имено, вертикалната трансмисија на гените од паренталната во следната генерација се случува при сексуалната репродукција која е типична за вишите еукариотски организми. За разлика од неа, хоризонталниот трансфер меѓу различните видови бактерии се одвива преку нерепродуктивните механизми на директен пренос на гени, какви што се процесите на конјугација, трансформација и трансдукција.

Во натамошниот текст подетално ќе бидат опишани секој од овие процеси на размена на генетскиот материјал меѓу бактериите.

## 15.4 Бактериска конјугација

Овој процес е наречен бактериска конјугација и се случува многу ретко кај *E. coli*. Во своите експерименти во 1946 година, Ледерберг и Татум најпрво култивирале два ауксотрофни мутантни соеви на *E. coli*, кои не можеле да растат во минимален медиум, туку поради генски мутации, имале соодветни ензимски дефекти, па, за раст им бил неопходен и дополнителен конститuent.

Двата ауксотрофни мутантни соја ги имале следниве главни карактеристики:

- Бактерискиот **сој Y10** можел да расте само ако во медиумот биле додадени аминокиселините **треонин** и **леуцин**, како и витаминот **тиамин**, но, можел самостојно да ги синтезира аминокиселините **фенилаланин** и **цистеин**, како и витаминот **биотин**.

Генотипот на Y10 сојот бил: *thr<sup>-</sup> leu<sup>-</sup> thi<sup>-</sup> bio<sup>+</sup> phe<sup>+</sup> cys<sup>+</sup>*

- **Сојот Y24** можел да расте и без **треонин**, **леуцин** и **тиамин**, но, не и доколку во медиумот не биле додадени **биотин**, **фенилаланин** и **цистеин**.

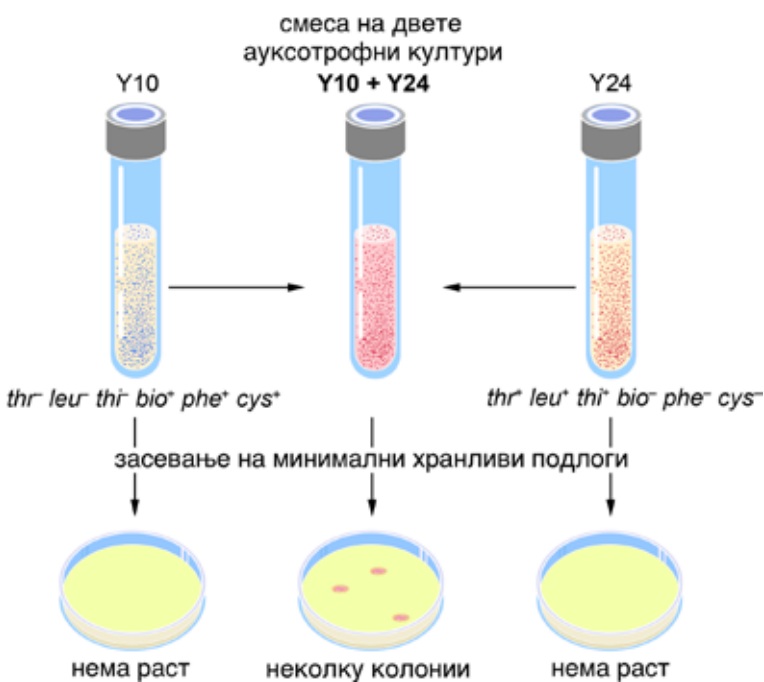
Генотипот на Y24 сојот бил: *thr<sup>+</sup> leu<sup>+</sup> thi<sup>+</sup> bio<sup>-</sup> phe<sup>-</sup> cys<sup>-</sup>*

Ледерберг и Татум ги помешале овие два мутантни соја и ги култивирале заедно во текот на неколку часа во течен медиум, а потоа бактериите биле издвоени од медиумот со помош на центрифугирање, биле испрани (за да се отстранат трагите од хранливите компоненти на медиумот) и засеани во Петриева плоча со цврст минимален медиум.

Покрај тоа, засебно биле засеани и чистите култури Y10 и Y24. Како што и се очекувало, ниту еден од поединечните два ауксотрофни соја не можеле да се размножуваат во минималниот медиум: сојот Y10 поради отсуство на треонин, леуцин и тиамин во минималната подлога, додека сојот Y24 поради недостаток на биотин, фенилаланин и цистеин. Зачудувачки, на

површината од агарот со минимална подлога каде била засеана мешаната култура (Y10 + Y24) израснале неколку колонии (слика 15-7).

Очигледно, генотипот на овие **прототрофни** бактериски колонии би морал да биде: *thr<sup>+</sup> leu<sup>+</sup> thi<sup>+</sup> bio<sup>+</sup> phe<sup>+</sup> cys<sup>+</sup>*, т.е. тие би морале да бидат способни самостојно да ги синтезираат метаболичните состојки кои им биле неопходни на ауксотрофните мутанти. Тоа укажало дека меѓу двата бактериски соја се разменил генетскиот материјал, со што се создале клетки кои ги содржеле алелите *thr<sup>+</sup> leu<sup>+</sup> thi<sup>+</sup>* од сојот Y24, и *bio<sup>+</sup> phe<sup>+</sup> cys<sup>+</sup>* од сојот Y10. Ледерберг и Татум размислувале и за можноста случајните

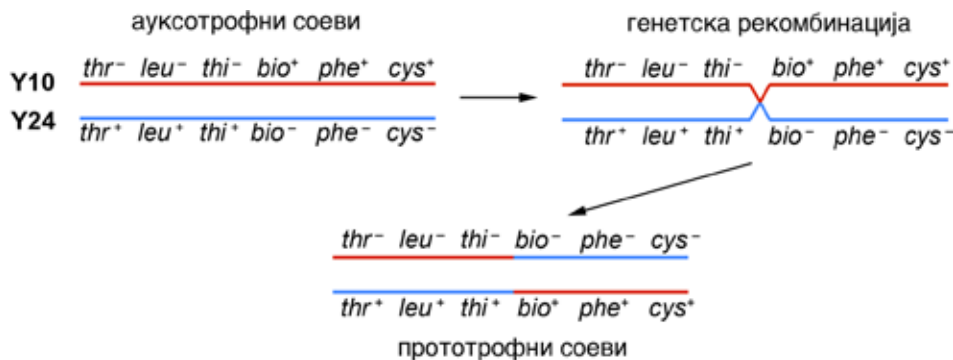


**Слика 15-7:** Шематски приказ на резултатите од експериментот на Ледерберг и Татум. Прикажани се и генотиповите на ауксотрофните мутантни соеви: Y10 и Y24.

спонтани мутации да се причина за појавата на новиот рекомбинантен генотип.

Но, според пресметките, на секои 10 милиони засеани бактерии се појавила по една бактерија (1 во  $10^7$ ) кај која генската мутација предизвикала реверзија (враќање) на ауксотрофниот во прототрофен генотип. Треба да се нагласи дека истовремената појава на неколку мутации ( $thi^- \rightarrow thi^+$ ,  $leu^- \rightarrow leu^+$ ,  $thi^- \rightarrow thi^+$  кај сојот Y10 или  $bio^- \rightarrow bio^+$ ,  $phe^- \rightarrow phe^+$ ,  $cys^- \rightarrow cys^+$  кај сојот Y24) кои би биле неопходни за реверзија на секој од двата ауксотрофни соја користени во овој експеримент во прототрофен, е статистички речиси неверојатна.

Оттаму, Ледерберг и Татум претпоставиле дека меѓу двата соја се случил генски трансфер и рекомбинација на нивните алели чија експресија ги определува нивните специфични нутритивни карактеристики (**слика 15-8**).



**Слика 15-8:** Претпоставена рекомбинација на генотиповите на двата ауксотрофни бактериски соеви при што се создава прототрофен сој.

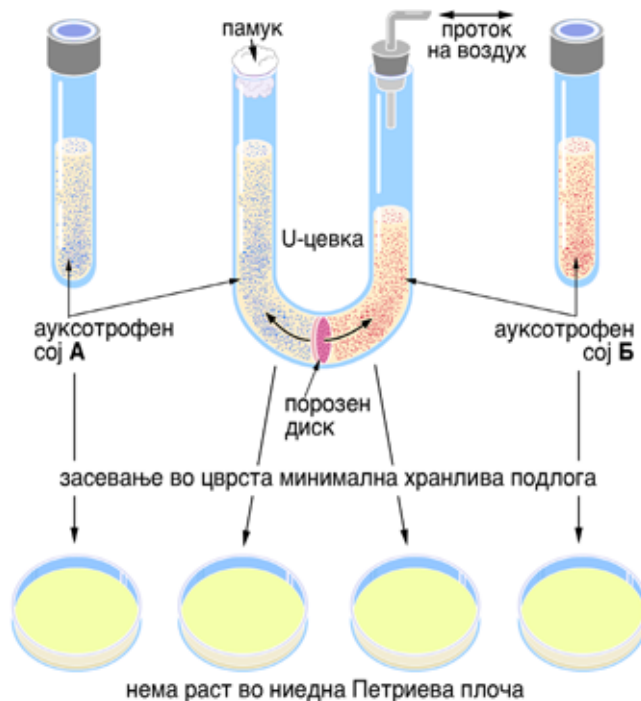
Со цел да се расветли природата на овој феномен, Дејвис (Bernard Davis) осмислил експеримент во кој користел стаклена цевка во форма на латинската буква U исполнета со течна хранлива подлога. Двата крака на цевката биле раздвоени со порозен филтер од синтерирано стакло чии пори дозволувале слободен проток на течноста, но, не и на бактериските клетки (**слика 15-9**).

Едниот крак бил исполнет со култура од ауксотрофниот сој А, а другата со сојот Б, чии нутритивни мутации биле исти како и кај експериментот на Ледерберг и Татум. За да се забрза мешањето на течната подлога (при што не се мешаат самите два соја), едниот крак од U-цевката бил затворен со стерилна памучна затка, додека на спротивниот крак бил приклучен на пумпа со која наизменично се дувнувал и вшмукувал воздухот. Со тоа течноста постојано наизменично се потиснувала и повлекувала меѓу двата крака. По неколкучасовна инкубација на  $37^\circ \text{C}$ , на цврста подлога биле засеани примероци културите и од едниот и од спротивниот крак на U-цевката, како и контролните оригинални култури на двата ауксотрофни соја.

Видливи колонии не израснале на ниту една од засеаните цврсти подлоги, што значело дека, за разлика од експериментот на Ледерберг и Татум, не се случила генетска рекомбинација меѓу двата соја. Толкувањето на овој наод било дека директниот контакт меѓу бактериските клетки е неопходна за размена на генетскиот материјал со рекомбинација.

Експериментите на Ледерберг, Татум, Дејвис и на други генетичари, откриле механизам на размена на генетскиот материјал кој бил означен како **конјугација**. Кај овој процес, генетскиот материјал се пренесува од едната

**Слика 15-9:** Експериментот на Дејвис со U-цевка со кој се докажува дека директниот контакт меѓу бактерииските клетки е неопходен за рекомбинацијата опишана во претходните истражувања на Ледерберг и Татум. Стерилната стаклена цевка во форма на латинската буква U е исполнета со течен бактериолошки медиум и во нејзината средина се наоѓа филтер чии пори овозможуваат проток на течноста, но, се непропустливи за бактериите. Едната половина на цевката е исполнета со ауксотрофниот сој **A**, додека другата половина со сојот **B**.



бактериска клетка (наречена донор) во другата бактериска клетка (реципиент). За одвивање на конјугацијата е неопходен тесен физички контакт меѓу двете бактериски клетки (**слика 15-10**). Посебни продолжетоци на бактериската клеточна мембрана, наречени **пилуси**, ги поврзуваат двете клетки, а самиот трансфер на DNA се одвива низ цитоплазматски (конјугациски) цевчиња кои се создаваат во самите пилуси.



**Слика 15-10:** Бактериска конјугација преку плазмид. На електронската микрографија се гледаат две бактериски клетки меѓу кои е формиран конјугациски мост (сексуален пилус).

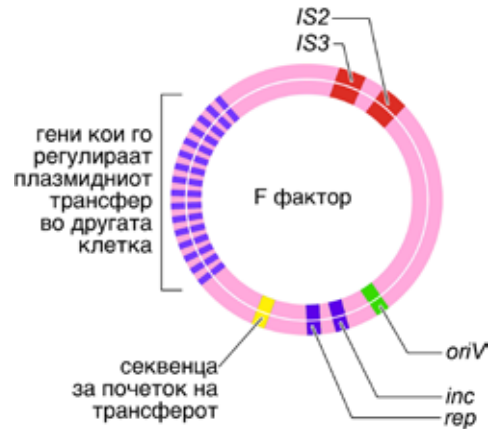
## F-фактор

Конјугацијата е еднонасочен пренос на генски материјал при што, кај повеќето бактерии, учествува плазмид означен како **F-фактор** (од фактор на **фертилитет**). Бактериските клетки кај кои отсутствува овој плазмид се означуваат како **F<sup>-</sup>**, а спротивно, тие кои го имаат, како **F<sup>+</sup>**. F-плазмидот содржи еден извор на репликација (*ori*) и повеќе гени кои се неопходни за конјугацијата (**слика 15-11**).

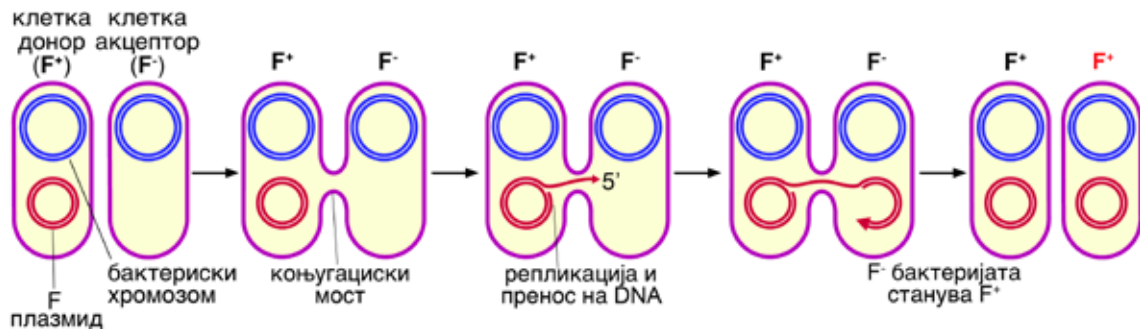
Некои од гените ги кодираат самите пили кои се издолжуваат од клеточната мембрана на F-позитивната (F<sup>+</sup>) бактериска клетка и се спојуваат со мембраната на F-негативната (F<sup>-</sup>) клетка при конјугацијата. Притоа, DNA-молекулот на F-

плазмидот кој е присутен во клетката-донор се пресекува кај секвенцата на изворот (*ori*) и едната DNA-верига се пренесува преку конјугациското цевче во бактериската клетка-реципиент, со што, бактеријата која дотогаш била  $F^-$ , станува  $F^+$ . Во текот на конјугацијата, во клетката-донор се одвива и репликација на пресечениот плазмиден DNA-молекул (слика 15-12).

**Слика 15-11:** Шематски приказ на F-факторот. Циркуларниот двоверижен плазмид се наоѓа во епизомска форма кај некои соеви на *E. coli*. Содржи еден извор на репликација (*oriV*), други гени кои ја контролираат репликацијата на плазмидот, секвенци кои ја регулираат интеграцијата во бактерискиот хромозом (IS2 и IS3), како и повеќе гени вклучени во регулација на трансферот на плазмидот од едната во другата клетка при конјугацијата (означени со сина боја).



Едноверижната плазмидна DNA која е пренесена во бактериската клетка-реципиент се конвертира во двоверижен циркуларен плазмид преку синтеза на комплементарната верига. Пресекувањето и поврзувањето (лигирањето) на DNA-молекулите е катализирано од посебни ензими кои се присутни во бактериските клетки.



**Слика 15-12:** Пренесување на F-плазмидот од  $F^-$  во  $F^+$  бактериска клетка при конјугацијата преку конјугациски мост. По завршувањето на овој процес, клетката акцептор и самата станува потенцијална клетка-донор.

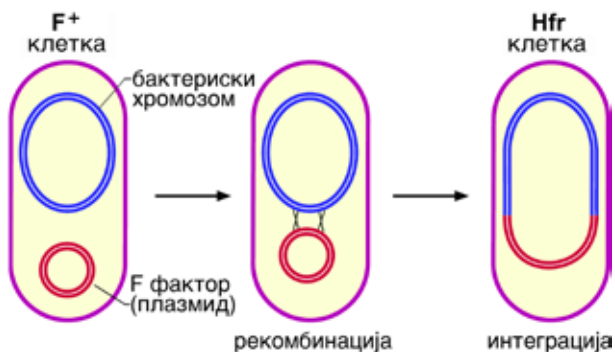
## Hfr-клетки

Самиот пренос на F-плазмидот од  $F^-$  во  $F^+$ -бактериска клетка не вклучува и трансфер на бактериски гени, па, со тој модел не можат да се толкуваат резултатите добиени при експериментот на Ледерберг и Татум. Но, некои соеви на бактерии поседуваат F фактор (плазмид) кој е интегриран во својот хромозом, а не е слободен во цитоплазмата. При некои експерименти било забележано дека рекомбинациите се јавувале околу 1000 пати почесто при конјугацијата на овие клетки со  $F^-$ -бактерии,



отколку при конјугацијата на  $F^+$  со  $F^-$  клетки, па, оттаму се наречени **Hfr-клетки** (од англ. *high-frequency recombination*: висока фреквенција на рекомбинации). Ваквите соеви настанале при случајното интегрирање на F факторот во бактерискиот хромозом (**слика 15-13**). Hfr бактериите се однесуваат како да се  $F^+$ , создавајќи пили при конјугацијата со  $F^-$ -клетки. Во текот на конјугацијата на Hfr со  $F^-$ -клетките, настанува прекин во едната DNA верига од F-факторот кој е интегриран во бактерискиот хромозом, по што едниот крај од едноверижниот молекул преминува низ конјугациското цевче во клетката-реципиент.

За разлика од конјугацијата на  $F^+$  со  $F^-$ -клетките, ваквиот процес меѓу Hfr и

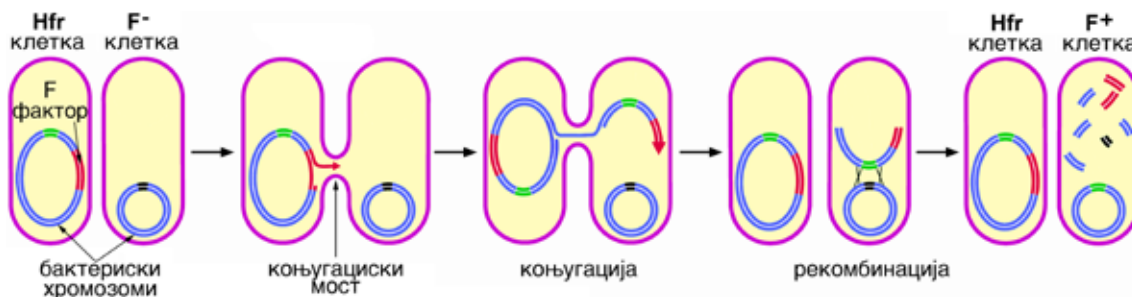


**Слика 15-13:** Бактериска конјугација. Клетката-донор ( $F^+$ ) содржи F-плазмид кој отсутствува во клетката-реципиент ( $F^-$ ). Ф-плазмидот се реплицира, и едната копија се пренесува преку конјугациско мовче. Откога ќе навлезе во клетката-реципиент, едноверижната плазмидна DNA служи како урнек за синтеза на двоверижен плазмид. Кога процесот ќе заврши, двете клетки содржат по една целосна копија од плазмидот.

$F^-$ -бактериите речиси никогаш не ги конвертира  $F^-$  во  $F^+$ -клетки, ниту во Hfr.

Во зависност од времетраењето на конјугацијата, се пренесува различна должина од секвенцата на бактерискиот хромозом. Пренесениот едноверижен молекул се реплицира, по што може да се рекомбинира со бактерискиот хромозом на клетката-реципиент, додека линеарната DNA се разложува (**слика 15-14**). Со тоа, бактеријата може да се придобие прототрофен генотип.

При конјугацискиот пренос на гените, клетката-донор не го губи својот F-фактор ниту, пак, својот хромозом, поради тоа што се пренесува само едната DNA-верига, а набргу потоа се синтетизира и другата верига. Во текот на кусиот период по конјугацијата, во клетката-реципиент постојат две копии од бактерискиот алел



**Слика 15-14:** Пренесување на бактериските гени од Hfr во  $F^-$ -клетките со конјугација. F-факторот (плазмидот) е интегриран во хромозомот на прикажаната Hfr-клетка. Регионот кој ги опфаќа алелите за синтеза на ензими кај прототрофните соеви е обележан со зелена боја. Во текот на конјугацијата, се реплицира, а потоа преку конјугациско мовче се пренесува едната копија од F-плазмидот кој отсутствува во клетката-реципиент ( $F^-$ ).



кој евентуално е пренесен: една сопствена и една која е пренесена при конјугацијата. Во тој период, бактериската клетка е делумно диплоидна (само за соодветниот генски локус) и се нарекува **мерозигот**. Внесената DNA (**егзогенот**) може да се вгради во бактерискиот хромозом (**ендогенот**) преку рекомбинација. Неинтегрираната линеарна DNA бргу се разложува со нуклеазите присутни во бактеријата.

## Мапирање на бактериските гени со прекинатото спарување

Повеќе детали за конјугацискиот пренос на гените од Hfr во F<sup>-</sup>-бактериските соеви биле откриени во доцните 1950-ти години од страна на Волман (Ele Wollman) и Жакоб (François Jacob). Во своите експеримент, тие користеле два соја на *E. coli*. Сојот Hfr бил со следниот генотип: чувствителност кон антибиотикот стрептомицин (*str<sup>s</sup>*); прототрофен за триптофан (*thr<sup>+</sup>*) и за леуцин (*leu<sup>+</sup>*); резистентност кон азид (*azi<sup>r</sup>*) и кон инфекција со бактериофагот T1 (*ton<sup>r</sup>*); способност за разложување на лактоза (*lac<sup>+</sup>*) и галактоза (*gal<sup>+</sup>*). Генотипот на F<sup>-</sup>-бактериските клетки-реципиенти бил: резистентност кон антибиотикот стрептомицин (*str<sup>r</sup>*); ауксотрофен за триптофан (*thr<sup>-</sup>*) и за леуцин (*leu<sup>-</sup>*); чувствителност кон азид (*azi<sup>s</sup>*) и кон инфекција со бактериофагот T1 (*ton<sup>s</sup>*); неспособност за разложување на лактоза (*lac<sup>-</sup>*) и галактоза (*gal<sup>-</sup>*).

Накучо, генотиповите на двата соја биле:

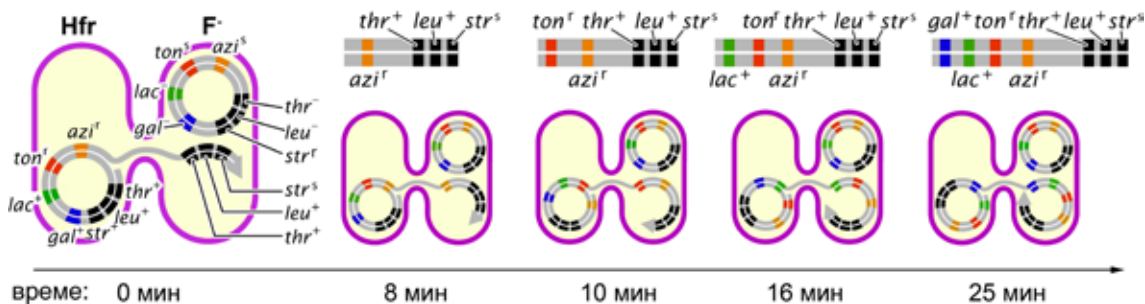
Hfr-клетки-донори:           **Hfr *str<sup>s</sup> thr<sup>+</sup> leu<sup>+</sup> azi<sup>r</sup> ton<sup>r</sup> lac<sup>+</sup> gal<sup>+</sup>***

F<sup>-</sup>-клетки-реципиенти:       **F<sup>-</sup> *str<sup>r</sup> thr<sup>-</sup> leu<sup>-</sup> azi<sup>s</sup> ton<sup>s</sup> lac<sup>-</sup> gal<sup>-</sup>***

Бактериските клетки од двата соја биле помешани и инокулираната течна подлога била инкубирана со цел да се овозможи конјугацијата. По неколку минути инкубација, медиумот бил разреден за да се спречи создавањето на нови конјугациски парови. Потоа, во правилни временски интервали биле земани примероци од културата и биле подложувани на силно мешање во кујнска електрична мешалка, со што се прекинувал процесот на конјугација и на пренос на DNA. Оттаму и процесот бил наречен **прекинатото спарување**. Примероците биле засеани врз селективни цврсти подлоги кои содржеле стрептомицин, но, во кои отсутувале леуцин и треонин. Со оглед на тоа што Hfr-клетките-донори биле чувствителни кон стрептомицин не можеле да растат на вакви подлоги, како што не можеле ниту F<sup>-</sup>-бактериските клетки-реципиенти кои биле ауксотрофни за леуцин и треонин. Единствено рекомбинантните F<sup>-</sup>-клетки кај кои при конјугацијата се внесени барем алелите *thr<sup>+</sup>* и *leu<sup>+</sup>* од оригиналните Hfr-клетки, можеле да растат врз селективната подлога. Понатаму, сите колонии со генотипот *str<sup>r</sup> thr<sup>+</sup> leu<sup>+</sup>* биле испитувани дали содржат и други гени пренесени од Hfr-сојот.

Експериментите со прекинатото спарување покажале дека застапеноста на другите алели (*azi<sup>r</sup> ton<sup>r</sup> lac<sup>+</sup> gal<sup>+</sup>*) кај рекомбинантите се случувала последователно, според времето кај кое е земен примерокот од течната култура (**слика 15-15**).

Кај примероците земени 8 минути по започнувањето на конјугацијата, највисока била фреквенцијата на присуство на алелите за резистентност кон азид, а кај примероците издвоени од културата 2 минути подоцна (10 минути по започнувањето на конјугацијата) било идентифицирано присуството на генот за отпорност кон инфекција со бактериофагот T1 (*ton<sup>s</sup>*). Подоцна се појавувал и *lac<sup>+</sup>* генотипот, а уште подоцна и *gal<sup>+</sup>*. Таквите резултати имплицирале дека времето на конјугациски тран-

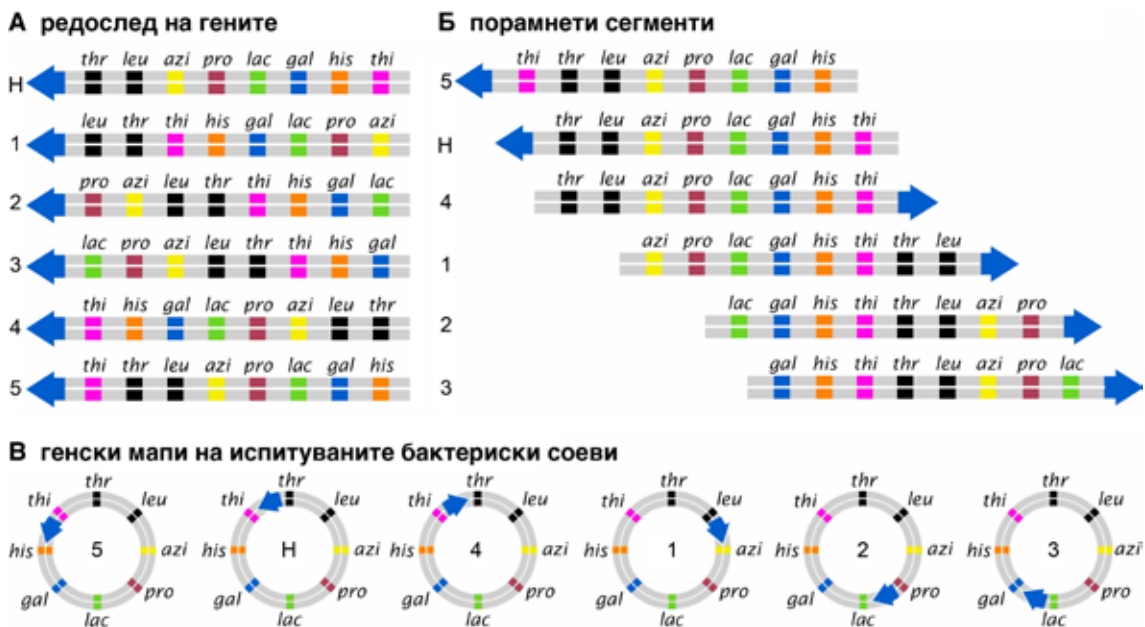


**Слика 15-15:** Шематски приказ на експериментот на Жакоб и Волман во кој прекинувањето на конјугацијата се користи за мапирање на бактериските гени. Времето кај кое е прекинатата конјугацијата е обележано во минути, а прикажани се и генотиповите на *F*-бактериите.

сфер е зависно од редоследот на испитуваните гени во линеарниот DNA-фрагмент (егзоконјугант) кој се пренесува од Hfr во *F*-клетките.

Очигледно е дека редоследот на испитуваните гени е ист, но, положбата и насоката на *F*-факторот се разликуваат кај различните Hfr-соєви. Со анализа на податоците од ваквите експерименти, поточно со порамнување на идентифицираните гени, можат да се конструираат мапи на целокупните бактериски хромозоми (**слика 15-16**).

Иако ваквиот лабораториски пристап делува примитивно и непрецизно од



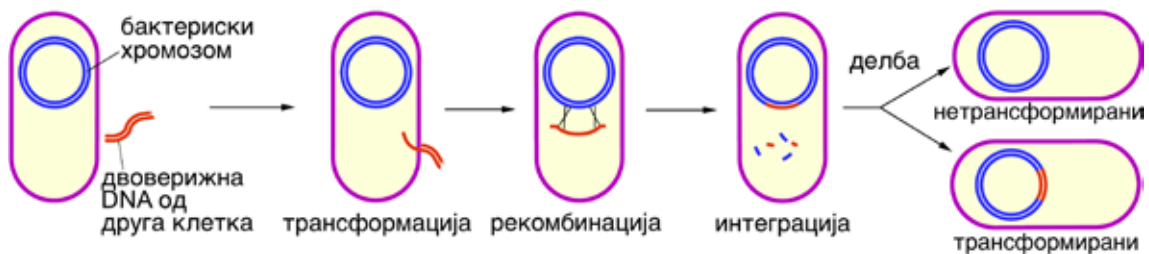
**Слика 15-16:** Конструирање на генски мапи на различни Hfr соєви на *E. coli* според експериментите со прекинатата конјугација. Со бројките 1-5 и буквата H се означени бактериските соєви. Стрелките истовремено го означуваат изворот на репликација и насоката на трансферот на гените при репликацијата. **A:** прикажани се сегменти од бактерискиот геном со редоследот на гените. **B:** истите сегменти се порамнети според положбата на гените. **C:** мапи на циркуларните бактериски хромозоми.

аспект на современите технички на брзо секвенционирање на целите бактериски геноми, треба да се обрне внимание, не само на историскиот момент, туку и на добро осмислениот дизајн на експериментите и анализата на добиените резултати.

## 15.5 Бактериска трансформација

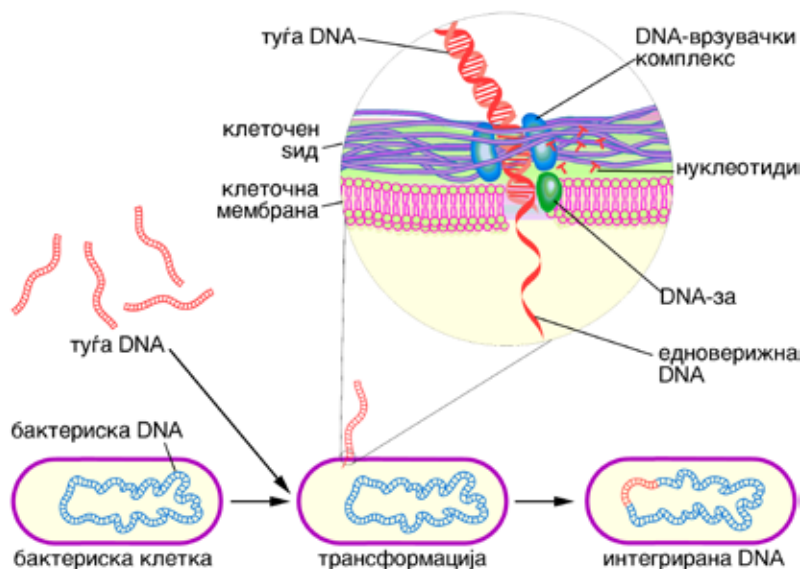
При распаѓањето на мртвите бактерии, во околниот медиум се ослободува и нејзината DNA која може да остане хемиски стабилна кусо време, во зависност од многу физичко-хемиски фактори, а пред сè од присуството на хидролитички ензими. Најчесто и најдолго остануваат интактни фрагментите од двоверижна DNA кои со часови или пак уште подолг временски период можат да се присутни во медиумот или во друг раствор, какви што се водата и земјата. Процесот на внесување на вакви „туѓи“ DNA-молекули во бактерииската клетка и нивното случајно вградување во хромозомот се нарекува трансформација (слика 15-17).

Самото внесување на „туѓата“ DNA во бактерииските клетки е случаен про-



**Слика 15-17:** Директно пренесување на бактериските гени со трансформација. Покрај самото внесување на „туѓата“ DNA во клетката, нејзиното случајно интегрирање во бактерискиот хромозом предизвикува промена на генотипот и трансформација на клетките.

цес, при што едната комплементарна верига се хидролизира, а другата се врзува со посебни протеини кои го овозможуваат преминот низ клеточната мембрана во цитоплазмата (слика 15-18). Потоа, едноверижниот DNA-фрагмент може да се интегрира



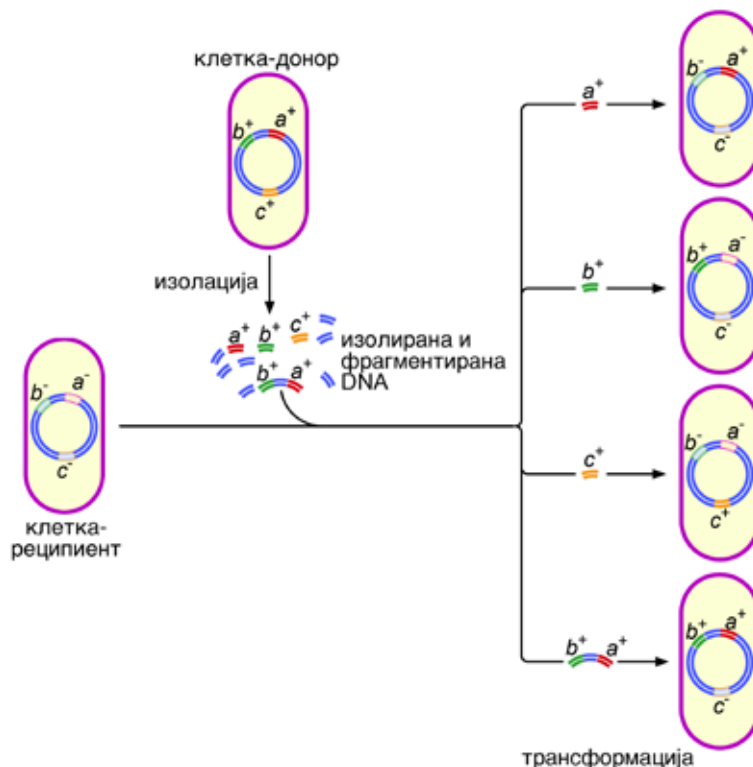
**Слика 15-18:** Шематски приказ на бактерииската трансформација. На зголемениот дел од сликата се гледа внесувањето на егзогената DNA во клетката преку посебен комплекс на протеини кои се врзуваат со DNA и кои се сместени во бактерискиот клеточен ѕид. Туѓата DNA се насочува кон посебна нуклеаза (DNA-за) која врши хидролиза само на едната од двете вериги. Внесената DNA може да се интегрира во бактерискиот хромозом.

во хромозомот преку рекомбинација, што се случува многу ретко.

Како што е веќе претходно објаснето, експериментите со бактериската трансформација се покажале како клучни при расветлувањето на улогата на DNA-молекулите во наследувањето. Но, трансформацијата може да има важна улога при преносот на гените меѓу некои бактерии во природните екосистеми.

Сепак, овој процес не се одвива кај сите бактериски видови и соеви. Бактериските клетки во кои може да се внесе „туѓата“ DNA се нарекуваат **компетентни**. Успешноста на трансформацијата зависи и од други фактори: стадиумот на раст, концентрацијата на DNA и составот на растворот. Важно е што самата DNA која се внесува во бактеријата, не само што може да потекнува од друг сој или вид, туку и воопшто не мора да има бактериско потекло. Тоа има огромно значење за генетскиот инженеринг, што е опишано понатаму во книгава.

Интересно е што и со експерименталната трансформација била користена за мапирање на бактериските гени (слика 15-19).

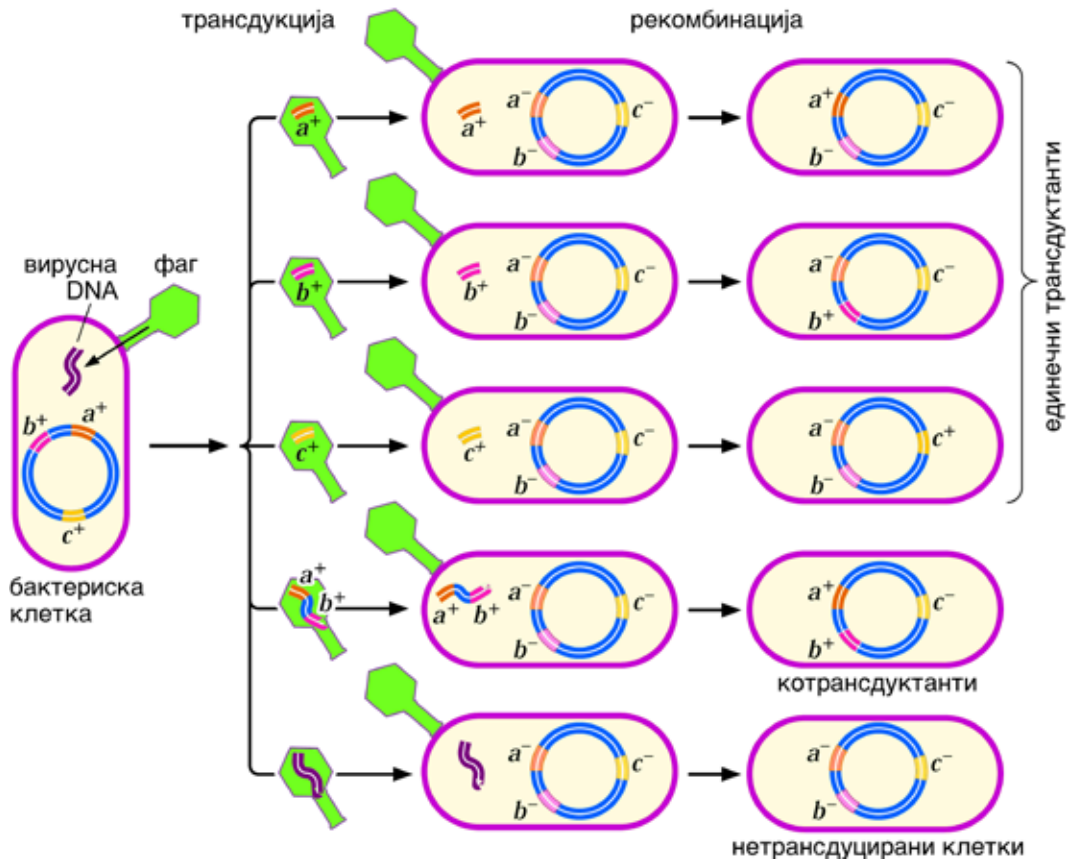


**Слика 15-19:** Мапирање на бактериските гени со трансформација. Стапката на котрансфектантите (истовремено пренесување на два и повеќе гени) е обратно пропорционална со растојанието меѓу гените.

## 15.6 Трансдукција

Посебен начин за пренос на гени меѓу бактериите е со помош на бактериските вируси - **бактериофази**. Овој процес се нарекува **трансдукција** и е поврзан со вирусна инфекција. Поради големата важност на овој процес, во натамошниот текст е даден поопширен осврт кон бактериофазите и нивната генетика.

Бактериските гени можат да се мапираат и со користење на трансдукцијата (слика 15-20).



**Слика 15-20:** Мапирање на бактериските гени со трансдукција. Стапката на котрансфекција (истовремено пренесување на два и повеќе гени) е обратно пропорционална со растојанието меѓу гените.

## 15.7 Кус осврт кон вирусите

Вирусите (од лат. *virus* - отров) се инфективни агенси кои се способни да ги инфицираат сите клеточни организми на планетава: луѓето, животните, растенијата, габите, бактериите и археите (архебактериите). Вирусите немаат клеточна градба, не можат самите да вршат репликација на својот геном, ниту да синтетизираат свои протеини, а со тоа и не можат да се размножуваат во клетките во кои паразитираат. Оттаму, вирусите и не можат да се сметаат за вистински биолошки организми, туку за ентитети градени од нуклеински киселини спакувани во протеински обвивки кои делуваат како **интрацелуларни паразити**. Иако ова претставува многу поедноставна дефиниција, важно е да се има предвид дека вирусите се помали и многу попросто градени од прокариотските клетки. Вирусите можат извесно време да опстанат и во клетките, во надворешната средина (на пример, во водата и во аеросолните честички во воздухот), а, иако немаат никаква метаболична активност, сепак се потенцијално инфективни за приемчивите организми.

Паразитирајќи во клетките, патогените вируси можат да предизвикаат различни заболувања кај организмите, но, треба да се има предвид дека постојат и непатогени вируси кои се размножуваат не предизвикувајќи какви било нарушувања кај организмот. Вирусните заболувања се релативно чести кај луѓето. На пример, вообичаените респираторни вирусни инфекции (настинки) се релативно безбедни и екстремно чести, но, постојат и вирусни инфекции какви што се смртоносните хеморагични трески (ебола) и други тешки заболувања (вариола, енцефалитиси) со висок морталитет и многу сериозни компликации. Токму поради заболувањата кои ги предизвикуваат кај луѓето и кај стопански важните животни и растенија, вирусите имаат голема важност за медицината, ветерината и земјоделството. Нивното значење за биотехнологијата може да се илустрира со фактот што од некои вируси се изолирани технолошки важни ензими (реверзната транскриптаза, на пример), а бакуловирусите се користени и како пестициди. Покрај тоа, вирусите се користат и во базичните биомедицински истражувања, и тоа во експерименталната виротерапија (како антиканцерни агенси), како вектори за генска терапија, и за третман на бактериските инфекции (терапевски бактериофази), а особено во генетските експерименти. Вирусолошките истражувања имаат важен придонес и во расветлувањето на определени еволуциски и молекуларни феномени.

Досега се познати околу 30 000 - 40 000 видови вируси кои се класифицирани според различни таксономски и други критериуми, какви што се: типот на нуклеинската киселина од која е граден вирусниот геном (едноверижна или двоверижна DNA или RNA), формата, димензијата и симетријата на протеинската обвивка, присуството на липидна мембрана и според други особини.

## 15.8 Основна структура на вирусите

**Вирусните честички (вириони)** се составени од **вирусен геном** (DNA или RNA) и **обвивка (капсид)** градена од протеински молекули наречени **капсомери**.

Протеините кои го градат капсидот се нарекуваат **структурни вирусни протеини** и можат да бидат со различна големина, како и број на молекули во секој вирион. Поголем број на исти или различни протеински молекули можат да се здружат создавајќи комплексни структури. Наједноставните вируси, каков што е тутуновиот мозаичен вирус, на пример, имаат капсид граден од само еден тип на протеински молекули. Од друга страна, вирусите со поголеми геноми обично имаат поголем број различни протеини. На пример, капсидот на вирусот на хуманиот херпес симплекс вирус тип 1 содржи 39 различни протеински молекули, а дури преку 100 различни протеини има во капсидот на вирусот кој ги инфицира зелените алги слични на хлорела (*Paramecium bursaria Chlorella* вирус 1). Протеините кои учествуваат во градбата на капсидот можат да се подредени на карактеристичен начин, создавајќи геометриски структури со определена симетрија.

Со оглед на тоа што структурните протеини на капсидот се наоѓаат на површината на вирионот, нивните основни функции се: заштита на вирусниот геном, врзување на вирусот со рецепторите на клетката-домаќин, а имаат и улога при навлегувањето на вирусот во клетката.



Некои вируси содржат и обвивка околу капсидот (**вирусна мембрана**) која е градена од протеини и липиди. Вирусите можат да имаат и дополнителна липидна мембрана меѓу обвивката и капсидот. Липидната мембрана е всушност фосфолипидна двослојна мембрана која најчесто ја „повлекуваат“ со себе од клетката во која претходно паразитирале.

Покрај структурните протеини, вирусите често содржат и **неструктурни протеини**, односно протеински молекули кои не учествуваат во градбата на вирионот. Такви се различните вирусни ензими (протеази, полимерази, реверзни транскриптази), транскрипциски фактори, и други вирусни протеини кои не се наоѓаат во клетката која ја инфицираат, а се неопходни за вирусниот животен циклус.

## 15.9 Вирусни геноми

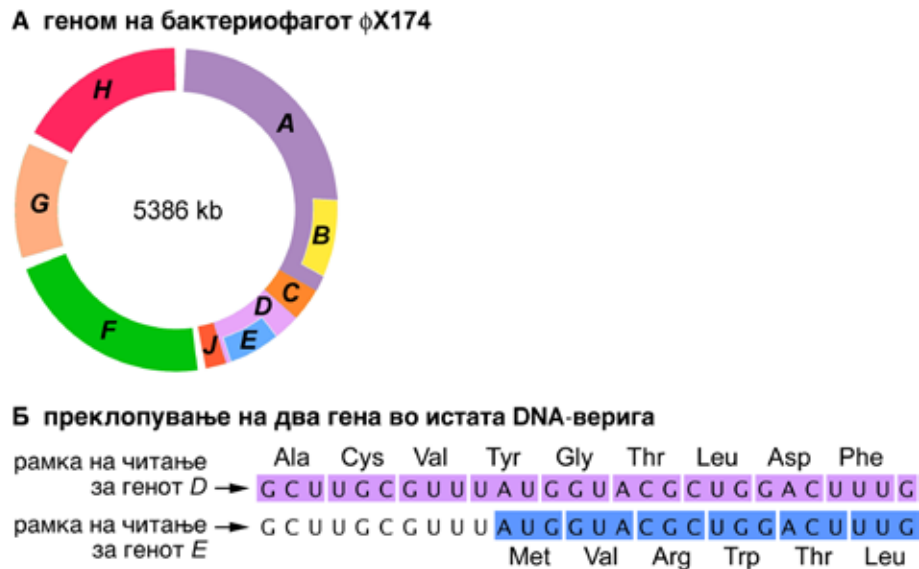
Геномите на сите досега познати вируси содржат една од следниве типови на нуклеински киселини: **двоверижна DNA (dsDNA)**, **едноверижна DNA (ssDNA)**, **едноверижна RNA (ssRNA)** или **двоверижна RNA (dsRNA)**. Од претходниот текст е јасно дека двоверижната DNA е присутна во геномите на сите прокариотски и еукариотски организми, но, геномите составени од останатите типови на нуклеински киселини (ssDNA, ssRNA и dsRNA) се уникатни само за вирусите. Вирусниот геном може да содржи по една или по повеќе молекули на нуклеинска киселина. Во последниов случај, геномот на вирусот е сегментиран, односно се состои од по неколку независни DNA или RNA-молекули во секој вирион.

Во зависност од вирусот, молекулите на нуклеинските киселини можат да бидат линеарни или циркуларни. Интересно е дека линеарната DNA кај хепаднавирусот, на пример, или линеарната RNA кај вирусот на грип, можат да стекнат циркуларна конформација поради воспоставување на интрамолекуларни водородни врски меѓу комплементарните нуклеотиди од спротивните краеве на истиот молекул. Сепак, овие структури не се вистинска смисла циркуларни молекули поради отсуството на ковалентни фосфодиестерски врски кои ги поврзуваат нивните краеве. Освен двоверижната DNA, сите вирусни нуклеински киселини создаваат помалку или повеќе е комплексни секундарни и терциерни структури, кои можат да бидат важни за вирусниот животен циклус. Уникатно е и тоа што кај некои вируси постојат различни модификации на 5'- или на 3'-краевите од нуклеинските киселини. Најневообичаено е што, кај некои вируси, таа модификација се состои од протеински молекули кои се нековалентно, но, некогаш и ковалентно врзани со еден од краевите на вирусната нуклеинска киселина. Ваквите хемиски модификации имаат важна улога при репликацијата на вирусниот геном, како и при транскрипцијата на неговите гени.

За разлика од еукариотските геноми, во геномот на некои вируси постои преклопување на рамките на читање на кодоните (**слика 15-21**). Оттаму произлегува дека на секоја од двете комплементарни вериги од двоверижната DNA можат да се наоѓаат различни гени кои кодираат сосем различни вирусни протеини. Се смета дека силниот еволуциски притисок предизвикал појава на гени кои се преклопуваат со што се „штеди“ просторот во компактните вирусни геноми.

Повеќе податоци за должината на некои вирусни геноми, како и за нивната споредба со геномите на претставниците на прокариотските и еукариотските организми се дадени во главата 16: Геномика.

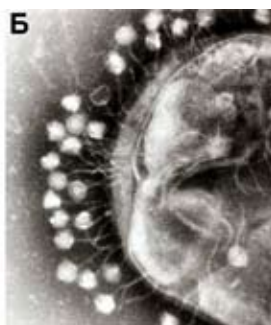




**Слика 15-21:** Гени кои се преклопуваат во вирусните геноми. **А:** шематски приказ на геномот на бактериофагот  $\phi$ X174 составен од едноверижна DNA со 9 гени. Јасната граница меѓу гените е назначена заради прегледност. Од нив, 4 гени (B и C, D и E) се преклопуваат. **Б:** дел од вирусниот геном на кој е прикажана секвенцата од гените D и E, при што постојат две отворени рамки за читање (ORF) кои се преклопуваат. Тие кодираат различни аминокиселински секвенци, кои се прикажани над и под кодирачката DNA-секвенца. Кратенките за аминокиселините се објаснети во главата б: Протеини, како и во прилозите.

## 15.10 Генетика на бактериофазите

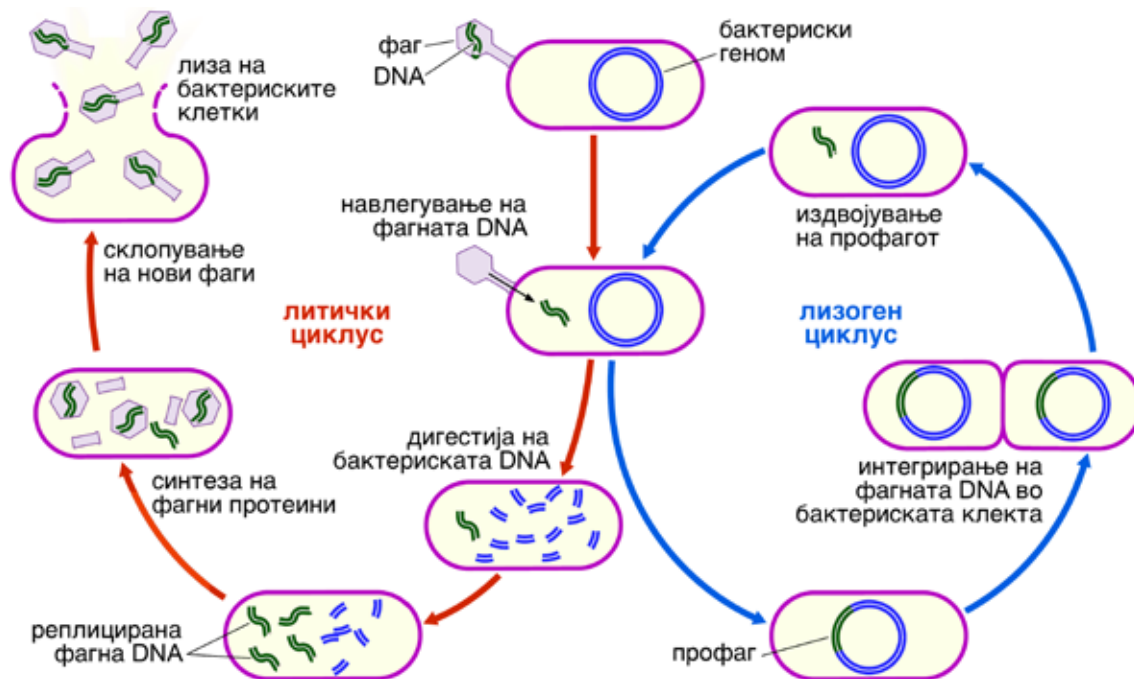
Вирусите кои ги инфицираат прокариотите се познати како **бактериофази** или, во еднина бактериофаг, скратено: **фаг** (од старогрчки, φᾰγεῖν: јаде, изедува). Протеините од капсидот на овие вируси специфично ги препознаваат и се врзуваат со протеинските или јаглехидратните рецептори од клеточниот ѕид на бактериите-домаќини кои ги инфицираат. Вирусните честички (вириони) кои мораат да пенетрираат низ клеточниот ѕид во клетката, често имаат контрактилни опашки со чија помош ја инјектираат вирусната нуклеинска киселина низ клеточниот ѕид во бактеријата-домаќин (**слика 15-22**).



**Слика 15-22:** Структура на бактериофазите. **А:** шематски приказ на структурата на фагот T4. **Б:** трансмисиjsка електронска микрографија на дел од бактериjsка клетка инфицирана со голем број на бактериофази. Микро-графијата е изработена од Graham Colm и поставена од авторот во јавен домен на интернет во рамките на проектот на британската Википедија (Wikipedia).

## Размножување на бактериофазите со литички или лизоген циклус

По навлегување на вирусната нуклеинска киселина во домаќинот можно е одвивање на еден од следните два циклуси (слика 15-23):



Слика 15-23: Размножување на бактериофазите со литички и со лизоген циклус.

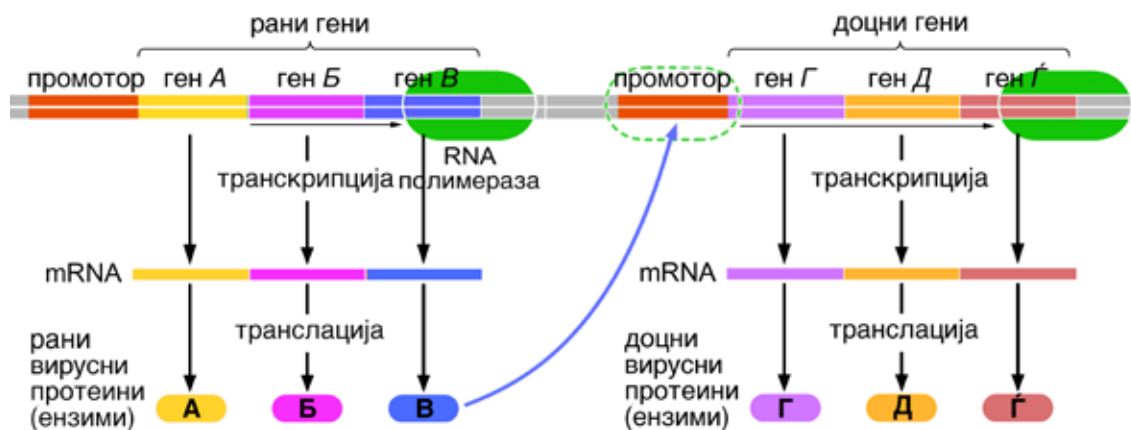
- вирусот може веднаш да се размножи и притоа да доведе до смрт на клетката-домаќин (литички циклус). **Литичкиот циклус** е наречен така бидејќи инфицираната бактерија се лизира (распрснува) и ги ослободува новите бактериофази;
- вирусот може да го одложи размножувањето преку интегрирање на неговата нуклеинска киселина во бактерискиот геном (лизоген циклус). Алтернативен начин на инфекција е **лизогениот циклус**, каде што инфицираната бактерија не се распаѓа туку ја прикрива нуклеинската киселина во текот на повеќе генерации.

Некои вируси се размножуваат само преку литичкиот циклус, а некои можат да се размножуваат и на двата начини.

**Вирулентните** вируси се тие кои се размножуваат само преку литичкиот циклус. Откако бактериофагната нуклеинска киселина ќе се инјектира во бактерискиот домаќин, таа ја превзема неговата машинерија за синтеза на DNA, и тоа во две фази: рана и доцна.

Во **раната фаза** се транскрибираат вирусните гени кои се близу до вирусната промоторска секвенца со која се врзува бактериската RNA-полимераза. Вирусните **рани гени** кодираат протеини кои ја потиснуваат транскрипцијата на гените од бактерискиот геном, а спротивно, ја стимулираат репликацијата на вирусниот геном и ја стимулираат транскрипција на вирусните **доцни гени**. Нуклеазите кои се кодирани

од вирусниот геном, го дигестираат DNA-молекулот од бактеријата-домаќин, со што обезбедуваат нуклеотиди за синтеза на вирусниот геном (слика 15-24). Во доцната фаза се транскрибираат доцните гени на вирусот кои се под контрола на друг промотор за чија активација е неопходен некој од раните вирусни протеини. Овие гени ги кодираат структурните протеини на вирусниот капсид, како и оние кои се потребни за лиза на клетката-домаќин, за асемблирањето на новите вириони и за нивно ослободување од клетката.



**Слика 15-24:** Шематски приказ на дел од бактериофагниот геном и транскрипцијата на раните и на доцните гени. По инјектирањето на вирусниот геном во бактеријата, се активира промоторот на раните гени, со чија транскрипција и транслација, се sintetизираат вирусните протеини кои се означени само заради сликовита претстава. Протеинот В е неопходен за активација на промоторот на доцните гени.

Транскрипцијата на вирусните гени е строго регулиран процес, затоа што во спротивно, предвремената лиза на клетката-домаќин би ја запрела инфекцијата и би го оневозможила синтезирањето на нови вирусни честички. Целиот циклус, од врзување со бактеријата и инфекција па сè до лизата, се одвива за околу половина час.

Многу ретко се случува два вируса истовремено да инфицираат една иста клетка, поради тоа што еден инфективен циклус најчесто трае премногу кусо време, што е недоволно за дополнителна инфекција со друг вирус, а понекогаш и раните вирусни протеини ги блокираат натамошните инфекции. Сепак, присуството на два различни вирусни геноми во ист домаќин овозможува генетски рекомбинации преку процесот на кросинг-овер (слично како при мејозата кај еукариотите). Со овој феномен се овозможува два генетски различни вируси да извршат рекомбинација на своите хомологни гени и со тоа да создадат нови вирусни соеви.

Инфекцијата со бактериофазите не секогаш резултира со лиза на бактерииските клетки. Некои бактериофази исчезнуваат од бактерииската култура, а бактериите од таквите култури стануваат имуни на идни инфекции со бактериофази од истиот сој. Сепак, во тие бактериски култури секогаш се присутни по неколку слободни бактериофази. Бактериите кај кои навлегле бактериофазите кои не се литички се нарекуваат **лизогени бактерии**, а вирусите: **умерени вируси**.

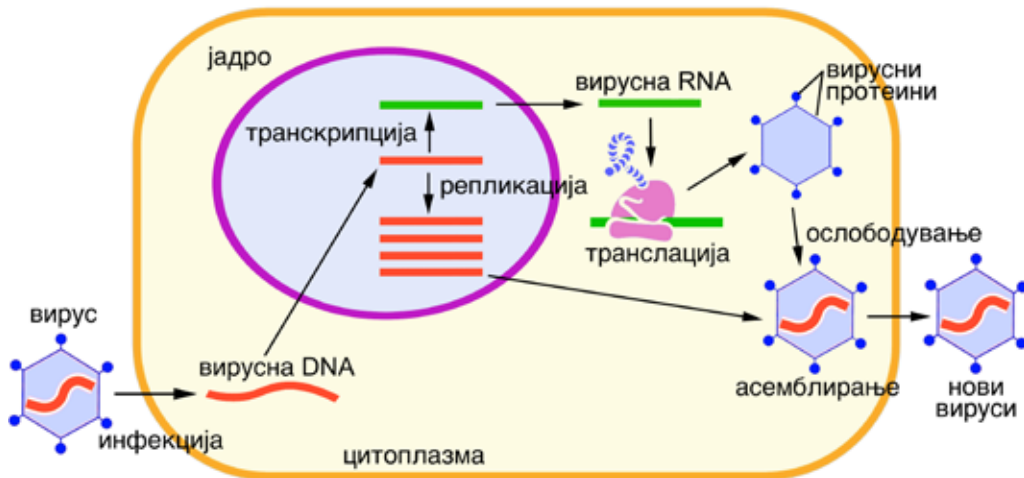
Лизогените бактерии содржат неинфективен вирус наречен **профаг**, односно молекул на бактериофагна DNA кој е интегриран во бактерискиот хромозом. Профагот може да биде неактивен во бактерискиот геном во текот на повеќе клеточни делби. Но, може да се предизвика и активација на профагот од страна на лизогената бактерија. Оваа активација резултира со навлегување во литички циклус во кој профагот го напушта бактерискиот хромозом и се размножува како и при лизогениот циклус.

Преминувањето од лизоген во литички циклус е од голема полза за фагот затоа што со тоа се зголемува производството на максимален број нови вируси од инфицираната бактерија.

Кога клетката-домаќин интензивно расте, фагот е во лизоген циклус, а кога е под влијание на стресни фактори, или е оштетена од дејството на некои мутагени агенси, профагот може да се ослободи од својата неактивна состојба и да започне литичкиот циклус.

### 15.11 Животен циклус на вирусите кои ги инфицираат еукариотските клетки

Иако вирусите, по дефиниција, не се живи суштества, сепак и во вирусологијата се користи терминологијата која е вообичаена за биолошките ентитети, па, затоа и целиот тек на циклусот, кој почнува од вирион, преку инфекција на приемчивите клетки, па, сè до создавањето на нови вируси и нивното ослободување во надворешната средина, се нарекува животен циклус на вирусот (слика 15-25).



**Слика 15-25:** Поедноставена шема на циклусот на размножување на типичен DNA-вирус во еукариотската клетка. По инфекцијата, вирусната DNA се реплицира во јадрото користејќи ја клеточната репликациска машинерија. Вирусот ги користи клеточните молекуларни механизми и за експресија на своите протеини кои, заедно со вирусните DNA-молекули, се асемблираат во нови вириони и се ослободуваат од клетката подготвени за нови инфекции. Заради прегледност, изоставени се повеќе важни детали кои се прикажани на некои од следните слики.

Во основа, тој се одвива низ следниве фази:

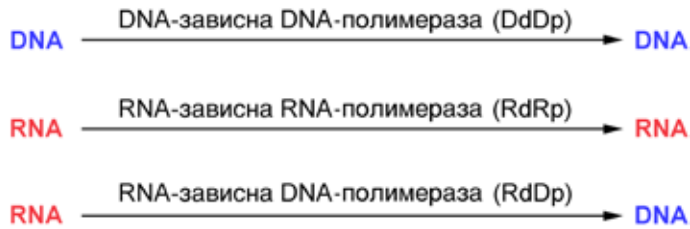
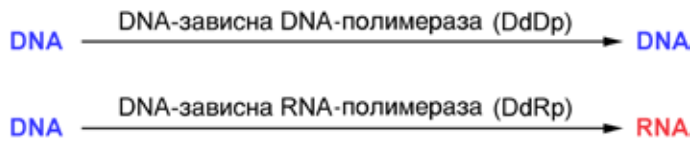
1. **врзување на вирусот со соодветната приемлива клетка**, што се одвива со молекуларна интеракција на вирусните протеини или други органски молекули (неураминидазата кај вирусот на грип, на пример) со специфични протеински или јаглевхидратни рецептори на клетката-домаќин;
2. **навлегување на вирусот во клетката**, преку ендоцитоза или преку фузија на вирусната обвивка со клеточната мембрана, во зависност дали вирусот има обвивка;
3. **репликација на вирусниот геном**, која, во зависност од типот на вирусот, се врши со користење на репликациската машинерија на клетката во која вирусот паразитира, или пак, дел од полимеразите ги обезбедува самиот вирус чиј геном ја кодира вирусната полимераза;
4. **произведување на вирусни протеини**, преку транскрипција и транслација на вирусните гени кои ги кодираат соодветните структурни протеини;
5. **асемблирање на вирусни честички (вириони)** со „пакување“ на реплицираната вирусна нуклеинска киселина во новосоздадените вирусни структурни протеини. Со овој процес се склопуваат вириони кои се идентични како и оригиналниот вирус; и
6. **ослободување на новосоздадените вириони од клетката**, кои, во зависност од во надворешната средина, можат да инфицираат нови клетки и/или организми. Процесот на одвојувањето на вирусите кои имаат обвивка (HIV, на пример) од клетката во која паразитирале се нарекува **пупење**.

Од аспект на молекуларната биологија и генетика, најинтересни и најмногу проучувани се процесите на репликација на вирусните геноми и нивната транскрипција. Едноставноста на градбата на вирусите наметнува потреба од користење на клеточната ензимска и протеинска машинерија за извршување на сите или на најголемиот број од ензимските процеси и протеински интеракции кои се неопходни за вирусниот животен циклус. Слободната вирусна нуклеинска киселина во цитоплазмата на инфицираната еукариотска клетка се нарекува **епизом**, израз кој се користи и за плазмидите во бактериската клетка. Интересно е што делови од вирусните геноми се интегрирани во јадрениот геном на некои организми, особено кај вишите еукариоти.

## 15.12 Репликација на вирусниот геном

Молекуларните механизми за репликација на вирусниот геном зависат од типот на вирусот, од неговиот геном и од клетката-домаќин. Во зависност од вирусот, репликацијата на неговиот геном може да се реплицира или со претходна синтеза на вирусни протеини (користејќи ја клеточната транскрипциска и транслациска машинерија) или целосно користејќи ги постојните клеточни ензими (**слика 15-26**).

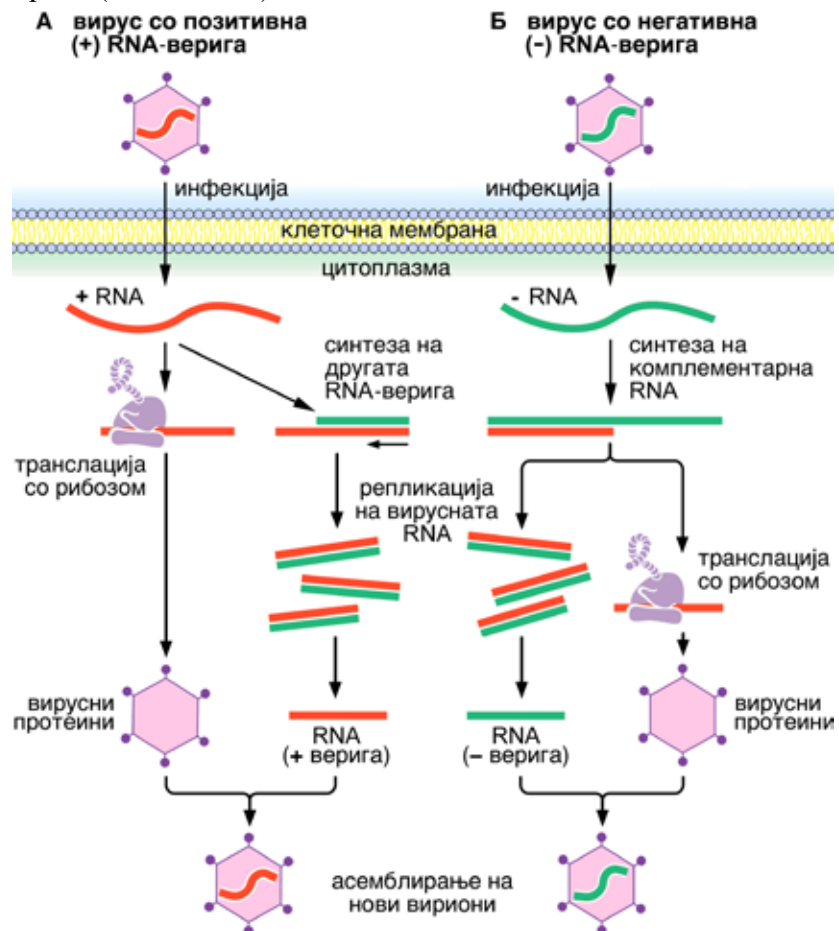
Изразот позитивна и негативна RNA-верига се однесува на комплементарноста со mRNA која се користи за транслација на вирусните протеини. Како што е претходно објаснето, само една од двете комплементарни DNA-вериги се користи при транскрипцијата на еукариотските гени.

**А репликација со вирусни ензими:****Б репликација со клеточни ензими:**

**Слика 15-26:** Шематски приказ на репликацијата на вирусните геноми според типот на полимеразата. **А:** некои вируси кодираат сопствени полимеразии за репликација и синтеза на своите нуклеински киселини. **Б:** други вируси ги користат клеточните ензими за тие цели.

Заради потсетување, секвенцата на транскрибираната mRNA е идентична со таа на кодирачката (неурнек) DNA-верига, а истовремено е комплементарна со не-кодирачката (урнек) верига (**слика 15-27**).

**Слика 15-27:** Разлики во начинот на репликација на вирусниот геном кај RNA-вирусите. Прикажана е поедноставена шема на разликите во репликацијата и при синтезата на вирусните протеини и кај двата типа RNA-вируси во клетката-домаќин. **А:** вирусите чиј геном е граден од позитивни RNA-вериги директно ги кодираат вирусните протеини. **Б:** кај вирусите кои имаат негативни RNA-вериги, најпрво мораат да се синтетизираат комплементарни RNA-молекули (позитивни вериги), кои дури потоа се користат за транслација на вирусните протеини.

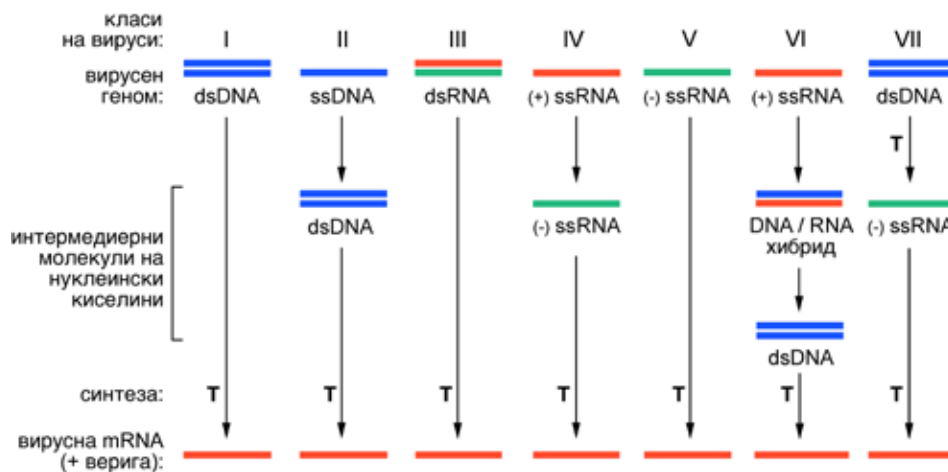




Следствено, кај RNA-вирусите кои имаат **позитивна RNA-верига** таа директно се користи за транслација во клеточните рибозоми при што се синтетизираат соодветните вирусни протеини. Обратно, кај RNA вирусите чии геноми се составени од **негативни RNA-вериги**, најпрво мораат да се синтетизираат комплементарни RNA-молекули (позитивни вериги), кои дури потоа се користат за транслација на вирусните протеини.

Вирусите кои имаат **DNA-геном** се разликуваат според тоа дали директно користат една од двете комплементарни вериги за транскрипција на вирусните mRNA-молекули, или најпрво се синтетизира интермедиерен RNA-молекул (негативна верига) која се користи како урнек за синтеза на вирусната mRNA.

Од разбирливи причини, во молекуларната вирусологија и молекуларната биологија, често се користи класификацијата според **Балтимор** (David Baltimore) која се заснова на начинот на кој се реплицира вирусниот геномот во инфицираната клетка (**слика 15-28**). Кај вирусите чиј геном е составен од двоверижна DNA, само едната од двете комплементарни вериги ги кодира протеинските продукти од определен вирусен ген, слично како и кај прокариотските и еукариотските геноми.



**Слика 15-28:** Класификација на вирусите според Балтимор, базирана на разликите меѓу нуклеинските киселини во составот на геномите на вирусот, нивната репликација, како и на транскрипцијата, т.е. синтезата на вирусните mRNA-молекули.

Според Балтиморскиот систем, ваквите вируси се класифицирани како **тип I**. За репликацијата на геномот на некои вируси од овој тип е неопходна клеточната DNA-полимераза, додека геномите на некои вируси (какви што се аденовирусите и херпесвирусите, на пример) кодираат сопствена, вирусна полимераза. При репликацијата на вирусите кои имаат геном граден од едноверижна DNA (вируси од **тип II**), најпрво мора да се синтетизира и другата, комплементарна, DNA-верига, по што експресијата се одвива како и кај претходниот тип. Вирусите од **типот III** содржат двоверижна RNA и кодираат сопствени вирусни полимеразии за репликација на својот геном. Карактеристично е што геномите на овој тип вируси се сегментирани во повеќе двоверижни молекули, а нивните гени се моноцистронски (што е



невообичаено за повеќето останати вируси). Вирусите од **типот IV** имаат геноми составени од едноверижни RNA-молекули со позитивна верига директно ги користат своите геноми за транслација во рибозомите, па, оттаму нивната репликација се одвива во клеточната цитоплазма. Кај некои вируси од овој тип се врши синтеза на полицистронски mRNA молекули од кои се синтетизираат вирусните протеини, додека кај други вируси се користат посложени механизми за транскрипција (супгеномски mRNA-молекули, поместување на рамката на читање од страна на рибозомот (англ. *ribosome frameshift*) и протеолитичка дигестија на вирусните полипротеини). Вирусите со едноверижни RNA-негативни вериги (**тип V**), не можат директно да ги користат своите геноми за синтеза на протеините, туку најпрво мораат да ги транскрибираат со вирусните полимерази со што се добиваат комплементарни, позитивни RNA-вериги. Вака синтетизираната позитивна RNA-верига понатаму се користи за синтеза на нови негативни RNA-вериги со што се реплицира вирусниот геном. Репликацијата на едноверижните RNA вируси со позитивна верига (**тип VI**), какви што се ретровирусите, се одвива преку синтеза на интермедиерни RNA-молекули со вирусната реверзна транскриптаза. **Типот VII** содржи вируси чиј геном е составен од двоверижна DNA и кои се реплицираат преку синтеза на едноверижен интермедиерен RNA-молекул.

## Репликација и животен циклус на ретровирусите

Инфекцијата започнува со препознавање и врзување на протеините од вирусната обвивка со соодветните рецептори на клеточната мембрана (**слика 15-29**).

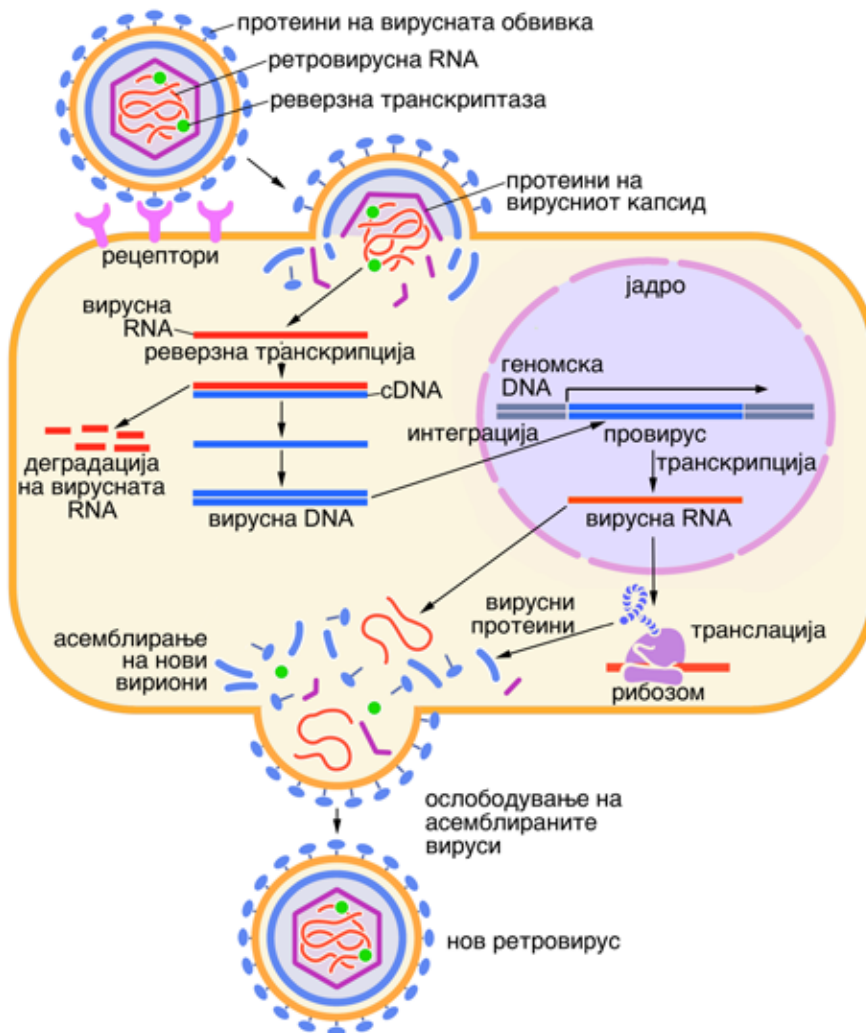
Вирусната партикула се внесува во клетката и се ослободуваат вирусната RNA и протеините. Вирусната RNA служи како урнек за реверзна транскрипција при која се синтетизира комплементарна DNA (cDNA), а потоа и втората DNA-верига, со што настанува двоверижна вирусна DNA. Преостанатата вирусна RNA се деградира во цитоплазмата. Вирусната DNA се инкрпорира во геномот на инфицираната клетка со помош на **интегразата**, ензим кодиран од вирусниот геном. Вирусната DNA интегрирана во геномот на инфицираната клетка се нарекува ако **провирус**. Со транскрипција на провирусната DNA и со последователната транслација се синтетизираат нови вирусни протеини. Овие протеини, заедно со дел од транскрибираните вирусни RNA-молекули, се асемблираат во нови вируси. Новосинтетизираните ретровируси се ослободуваат од клеточната мембрана со пупење.

## HIV - вирус на сидата

Вирусот на сидата (HIV, од англ. *human immunodeficiency virus*) е ретровирус кој го предизвикува синдромот на стекната имунодефициенција (сидата). Вирусот се пренесува преку директен контакт со инфицирана крв и крвни деривати, преку сексуален однос или по вертикален пат (од мајката во фетусот). Вирусната инфекција на човечките CD4+ T-лимфоцити, како и на други клетки од имунолошкиот систем (какви што се: макрофагите и дендритичките клетки) предизвикува постепено намалување на имуните функции и појава на инфекции. Во отсуство на ефективна терапија, сидата завршува летално, пред сè поради животозагрозувачките инфекции, често

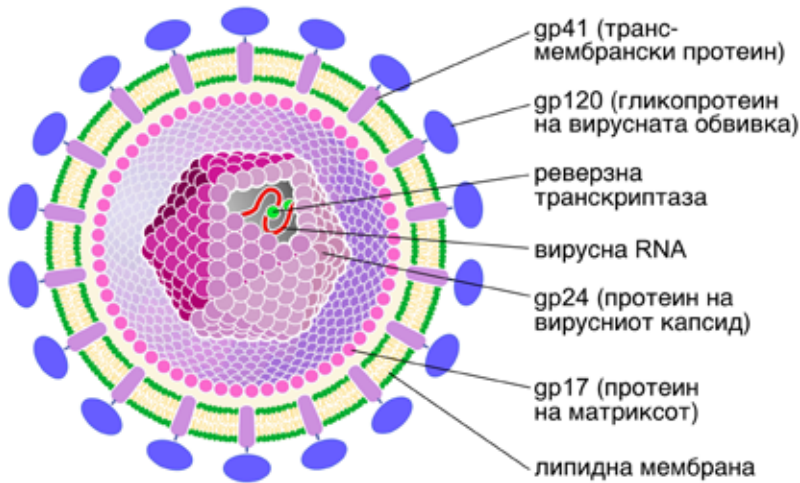
предизвикани од банални микроорганизми (т.н. опортунистички инфекции), како и поради појава на определени тумори (Капошиев сарком на кожата, на пример).

Геномот на вирусот HIV е составен од по две, теоретски идентични, молекули на едноверижна RNA со должина од 9,7 kb која содржи вкупно 9 гени. Гените *gag* и *env* кои ги кодираат структурните протеини gp160 и gp24, соодветно (слика 15-30).



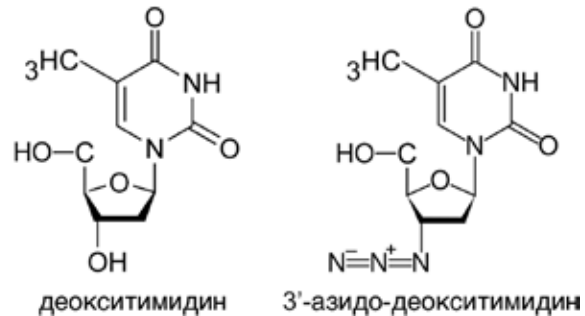
**Слика 15-29:** По-едноставена општа шема на животниот циклус на ретровирусите. Со стрелки се означени последователните фази во текот на инфекцијата.

Генот *pol* ги кодира ензимите: реверзна транскриптаза, протеаза и интеграза. Геномот содржи уште 6 други гени кои имаат функција во регулацијата на вирусниот животен циклус. По синтезата, протеинот gp160 се пресекува со протеазата кодирана од вирусен ген, по што настануваат протеините на вирусната обвивка: gp120 и gp41. Од голема важност е што вирусната реверзна транскриптаза има склоност кон грешки што предизвикува висока мутациска стапка при вирусната репликација. Тоа доведува до брза еволуција на вирусниот геном и рана појава на вирусни соеви кои се резистентни кон антиретровирусните лекови.



**Слика 15-30:** Структура на ретровирусите.

Современата високо ефективна антиретровирусна терапија се базира на истовремена комбинација на повеќе медикаменти и овозможува висока стапка на долго преживување на заболените од сида. Меѓу користените лековите се и инхибиторите на вирусната реверзна транскриптаза, каков што е нуклеозидниот аналог азидотимидин (AZT) (слика 15-31).



**Слика 15-31:** Споредба на хемиската структура на вообичаениот нуклеозид деокситимидин и неговиот аналог азидотимидин кој содржи азо-група (N3) на 3' C-атомот од деоксирибозата.

Од причини кои не се доволно јасни, вирусната реверзна транскриптаза има околу 10 000 пати повисок афинитет кон азидотимидинот, отколку кон вообичаената форма на тимидин. При реверзната транскрипција азидотимидинот се инкорпорира во комплементарната DNA предизвикувајќи прекин на натамошната синтеза, што е и основа за антиретровирусната терапија од овој тип.

### 15.13 Вироиди - инфективни нуклеински киселини

Самите RNA-молекули, без никаква протеинска ниту липидна обвивка, можат да бидат инфективни за некои растителни видови и се нарекуваат **виroidи**. Досега се познати неколку виroidи кои се составени од релативно куси (250 - 400 рибонуклеотиди) циркуларни едноверижни RNA-молекули. Екстензивните интрамолекуларни водородни врски создаваат карактеристични секундарни структури слични на рибозимите (слика 15-32).

Всушност, виroidите и самите дејствуваат како рибозими, а не кодираат какви било протеински продукти. Виroidите ја користат клеточната RNA-полимераза II при репликацијата која се одвива според ротирачкиот модел. Досега се познати триесетина видови виroidи кои предизвикуваат заболувања кај некои стопански важни растенија, какви што се домотот и кокосот.



**Слика 15-32:** Шематски приказ на комплексната секундарна структура на разгранет тип на виroid.





# ГЕНОМИКА

## Глава 16

**Н**аучната дисциплина која ги проучува нуклеотидните секвенци, организацијата, функцијата и еволуцијата на генетските информации на целокупните геноми се нарекува **геномика**. Според многу карактеристики, оваа дисциплина е во самиот врв на модерната биологија, пред сè поради софистицираната методологија за добивање на геномските информации и за нивна компјутерска анализа, но, и поради пропулзивноста, со што е споредлива со информатичките технологии. Податоците добиени од геномските истражувања и нивната анализа имаат голема и, сè уште, недоволно искористена употреба во медицината, фармацијата, ветерината, агрономијата и биотехнологијата. Покрај тоа, споредувањата на информациите од различните геноми овозможуваат подобро разбирање на еволуциската историја на организмите.

Изразот геном за прв пат е воведен во 1920 година за да се означи збирот на сите гени во еден организам. Сепак, определувањето на целокупната геномска секвенца на кој било биолошки ентитет станало возможно дури во 70-тите години на 20. век, со воведувањето на првите техники на DNA-секвенционирање.

Геномиката може да се подели на неколку потесни подрачја на истражување. **Структурната геномика** се однесува на определувањето на секвенците во геномски размери, односно на целокупните геноми или на голем дел од геномите на организмите, како и софтверска анализа на нивна структурна организација. Од друга страна, целта на **функционалната геномика** е разјаснување на функцијата на поединечните гени и регулаторните DNA-секвенци во геномите. Споредувањето на геномските информации и нивната организација и функција меѓу различни организми е предмет на истражување на **компаративната геномика**.

Во извесна смисла, посебна екстензија на геномиката е **протеомиката** која ги проучува протеините присутни во клетките или во организмите во определен временски период и под определени услови. Протеомиката ги вклучува и испитувањата на сите протеински молекули во клетката, но, и нивните меѓусебни интеракции и врзувања со DNA- и со RNA-молекулите, како и посттранслационските модификации на протеините и други својства во контекст на нивната севкупна улога во клетката или во испитуваниот организам.

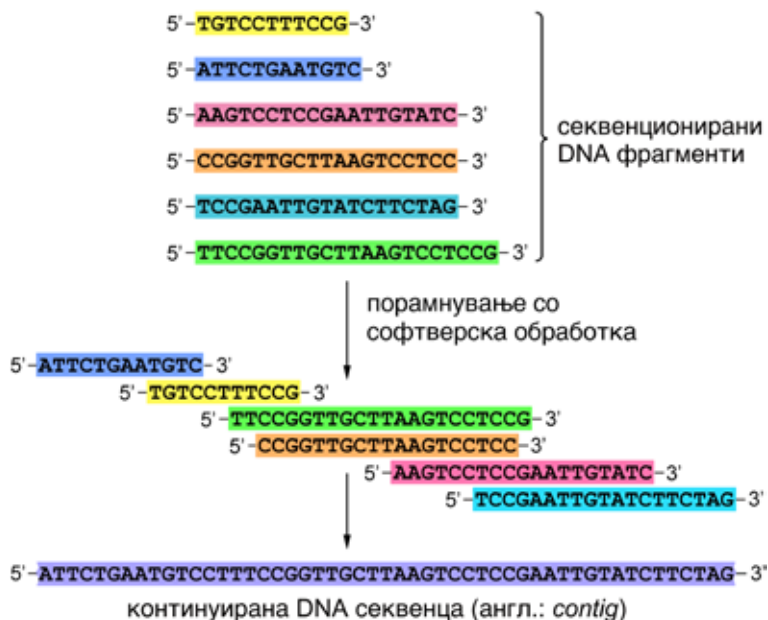
## 16.1 Структурна геномика

Ерата на геномиката започнува со првото целосно секвенционирање на геномот на бактериофагот фX174 (со должина од 5386 нуклеотиди) од страна на Сангер (Frederick Sanger) и соработниците. Биле потребни неколку години за секвенционирање на геномот на бактериофагот λ, па, секвенцата на неговите 49 000 базни парови е објавена дури во 1982 година. Имено, ограничувањата на брзината и ефективноста на тогашните рачни методи за секвенционирање биле основната причина за бавниот развој на геномиката сè до изработката на автоматизирани секвенционатори засновани на брза и ефективна флуоресцентна детекција.

Секвенционирањето на целокупните геноми на организмите и вирусите е основната цел на структурната геномика. Имено, за да се определи нуклеотидниот редослед на определен DNA-молекул се применува некоја од расположливите методи за DNA-секвенционирање.

Принципите на методите за DNA-секвенционирање се опишани во главата 21: Генетски инженеринг, додека во ова поглавје ќе бидат опишани само концепциските аспекти при планирањето и анализите кај геномското секвенционирање.

Компјутерската обработка на податоците добиени со поединечни анализи овозможува определување на **континуирана нуклеотидна секвенца** наречена и **контиг** (од англ. кратенка: *contig*) добиена со порамнување на секвенците кои се преклопуваат и се многу подолги отколку што дозволуваат ограничувањата на техниките за секвенционирање (слика 16-1).



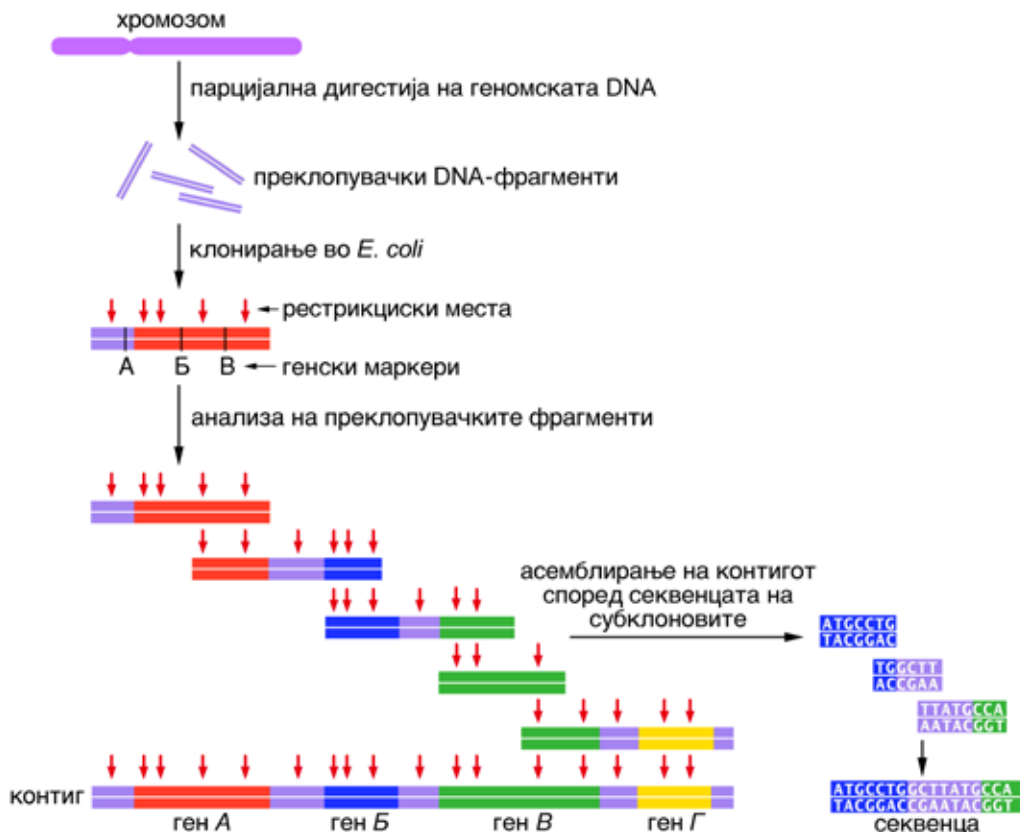
**Слика 16-1:** Порамнување на секвенционирани фрагменти во континуирана низа (т.н. контиг). Кај поединечните куси секвенционирани DNA-фрагменти се забележува преклопувањето на секвенците, што е и неопходно за определување на редоследот и целосната секвенца на непрекинатиот DNA-молекул. Заради прегледност, прикажани се секвенците на многу покуси фрагменти отколку што можат да се прочитаат во поединечна анализа (типично од 400 до 800 нуклеотиди).

### Геномско секвенционирање базирано на генски мапи

Кај овој концепциски пристап, неопходно е претходна изработка на детални генски и физички мапи на сите хромозоми на организмот чиј геном треба да се секвенционира. Таквите мапи се конструираат со рестрикциска анализа, како и со



прецизно физичко лоцирање на дотогаш познатите гени и генски маркери по должината на хромозомите и на нивните фрагменти. Токму генски маркери овозможуваат информации за ориентацијата и физичката положба на DNA-секвенците на секој поединечен хромозом. Тие податоци се важни за клонирањето на геномските фрагменти чии секвенци се порамнуваат од подолгите контиги (слика 16-2).



**Слика 16-2:** Геномско секвенционирање базирано на претходно мапирање на хромозомите со детални генетски и физички мапи. Финалната нуклеотидна секвенца се добива со порамнување на секвенците од контигите кои се преклопуваат.

## Геномско секвенционирање според методот на „случаен истрел“

Оваа техника е развиена од истражувачот Вентер (Craig Venter) во 1970-тите години и се заснова на секвенционирање на случаен избор на клонови добиени со фрагментација на геномската DNA. Оттаму и англискиот збор за оваа техника: *shotgun sequencing* (англ. *shotgun* - пукање, истрел). За разлика од претходниот принцип кај кој однапред се мапирани DNA-фрагментите кои се секвенционираат, кај методот на „случаен истрел“ се добиваат секвенци кои мораат да се асемблираат исклучиво според преклопувањето, а со користење на посебни софтверски алгоритми за кои се неопходни моќни компјутери (слика 16-3). Теоретски, за да може да

се најде совпаѓање на секвенците на супклоновите или на DNA фрагментите кои се преклопуваат, најголемиот дел од геномот треба да се секвенционира од 10 до 15 пати.



**Слика 16-3:** Геномско секвенционирање според методот на „случаен истрел“ (англ. shotgun sequencing). Кај овој пристап директно се користи геномската DNA која парцијално се дигестира со рестрикциски ендонуклеази со што се добиваат голем број DNA-фрагменти кои се преклопуваат. По нивното клонирање во *E. coli*, секвенционирањето се врши на секој поединечен фрагмент. Порамнување на секвенците кои се преклопуваат според контигите на супклоновите се врши со моќни компјутерски програми со што се добива финалната секвенца на геномот.

## 16.2 Функционална геномика

Откривањето на функциите на поединечните гени и регулаторни DNA-секвенци од добиените геномски секвенци се врши со користење на голем број лабораториски и биоинформатички анализи. Сликвито, функционалната геномика им дава вистинско значење на податоците за секвенците преку идентифицирање на гените и нивната организација, идентификација на RNA-транскриптите, кодираните протеини, меѓусебните влијанија со протеините кои се врзуваат со DNA, како и интегрираните функции на целиот геном или на хромозомските DNA-молекули. Збирот на сите RNA-транскрипти од геномот кој ги опфаќа mRNA, rRNA, tRNA и другите функционални, но, некодирачки RNA-молекули се нарекува **транскриптом**. Оттаму, делот од функционалната геномика која ги проучува транскриптомите се нарекува **транскриптомика**. Принципитите на дел од методите кои се користат во транскриптомиката и протеомиката, како и на биоинформатичката методологија за предикцијата на гените, се опишани подетално во главата 20: Основни методи во молекуларната биологија и молекуларната генетика.

### 16.3 Прокариотски геноми

Во доцните 70-ти години на минатиот век кога за првпат биле развиени методите за DNA-секвенционирање, најпрво биле анализирани наједноставните вируси - бактериофазите. За релативно кусо време биле секвенционирани преку 150 вирусни геноми, меѓу кои и важните животински и растителни патогени вируси.

Но, техниките за рачно секвенционирање не биле доволно брзи за откривање на прокариотските и еукариотските геномски тајни, чии геноми се неколку стотици пати поголеми од тој на бактериофагот, на пример. Во претходните две децении, воведувањето на автоматското секвенционирање ја револуционизира геномиката и овозможи создавање на геномска библиотека со многу прокариотски секвенци. Во 1995, тимот предводен од Вентер и Смит (Craig Venter и Hamilton Smith) ја определиле првата секвенца на жив организам, воопшто, и тоа на бактеријата *Haemophilus influenzae*. Набргу се секвенционирани голем број прокариотски геноми, со што делумно се расветлени механизмите со кои гените кај прокариотите се вклучени во клеточните функции.

Геномите на најголемиот број познати еубактерии се составени од по еден циркуларен двоверижен DNA-молекул, но, како што е и претходно веќе кажано, постојат и повеќе исклучоци (табела 16-1).

**Табела 16-1: Примери за организација на бактериските геноми**

вид	број и тип на хромозоми
<i>Deinococcus radiodurans</i>	2 циркуларни
<i>Escherichia coli</i>	1 циркуларен
<i>Bacillus subtilis</i>	1 циркуларен
<i>Bacillus thuringiensis</i>	1 циркуларен
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	1 линеарен + 1 циркуларен
<i>Vibrio cholerae</i>	2 циркуларни
<i>Borrelia burgdoferi</i>	1 поголем линеарен и > 17 помали циркуларни и линеарни

Воопштено, прокариотските геноми содржат протеин-кодирачки гени, гени кои кодираат функционални RNA-молекули и генски контролни секвенци (промотори, оператори, секвенци за терминирање на транскрипцијата и други DNA-елементи), како и мобилни генски елементи. Сепак, постојат разлики меѓу геномите на археите и еубактериите.

Археите (по старата номенклатура: архебактерии), најчесто ги населуваат екстремните станишта какви што се: високата температура, високата концентрација на соли, високиот притисок, екстремните рН-вредности и слични параметри при кои еубактериите и еукариотите не можат да опсатанат. Оттаму и не зачудува ентузијазмот со кој се изведуваа проектите за целосно секвенционирање на геномите на неколку архејски микроорганизми.

Една од првите геномски анализирани археи е бактеријата *Methanococcus jannaschii* која, прв пат, е изолирана од подводен извор на длабочина од 2600 метри под морската површина при притисок од околу 270 атмосфери и температура од

приближно 300°C. Геномот на оваа бактерија е составен од еден молекул на циркуларна двоверижна DNA со должина од 166 Mb и две помали циркуларни двоверижни DNA-молекули со должина од 58,4 и 16,5 Mb. Со биоинформатичка анализа се утврдени вкупно 1738 протеин-кодирачки гени во овој геном, а интересно е што дури 58% од нив не покажуваат сличност со досега познатите гени кај еубактериите и еукариотските организми. Сепак, најголемиот број гени вклучени во производството на енергија, клеточната делба и општиот метаболизам кај оваа археа се многу слични со гените кај еубактериите. Присуството на оперони, густиот распоред на гените и геномската организација, воопшто, исто така, се слични како и кај еубактериските геноми. Од друга страна, голем број од архејските гени, какви што се тие вклучени во синтезата на RNA, во регулацијата на транслацијата и DNA-репликацијата, покажуваат значителна сличност со еукариотските гени. Можеби најзачудувачки делува присуството на хистонски протеини во организацијата на хроматинот, што е карактеристично само за еукариотите. Слично на еубактериите, протеин-кодирачките гени на археите не содржат интрони, но, некои нивни гени кои кодираат молекули на tRNA имаат интрони како кај еукариотските организми.

## 16.4 Еукариотски геноми

Најголемиот дел од генетскиот материјал во еукариотските клетки се наоѓа во хромозомите во јадрото, а многу помал дел и во митохондриите и хлоропластите. Во контекст на геномите, основно е што еукариотските клетки содржат многу повеќе DNA од типичните прокариотски клетки. Но, еукариотските геноми содржат и голем број DNA-секвенци кои не кодираат протеини ниту функционални RNA-молекули. Некои од овие секвенци се наречени раздвојувачи (англ. *spacers*), кои немаат некаква функција или, пак, таа е сè уште непозната. Покрај нив се наоѓаат и репетитивните секвенци каква што е теломеразната DNA на краевите од хромозомите.

Еукариотите, а особено повеќеклеточните виши организми, имаат поголеми геноми и многу посложени механизми на транскрипција и регулација на генската експресија, а имаат и свои специфични молекуларни механизми кои отсутуваат кај прокариотите. Имено, покрај гените за основниот клеточен метаболизам, коишто донекаде се совпаѓаат со тие кај бактериите, еукариотските геноми содржат и голем број гени кои се карактеристични само за комплексните и за повеќеклеточните организми, какви што се: гените за клеточниот раст и диференцијација, гените за „адресирање“ на протеините, за контрактилните и за сензорните протеини, гените за комплексните интеракции меѓу клетките, за ембриогенезата, како и за функциите на имуниот систем. Не треба да се заборава дека и самите процеси на транскрипција и натамошно процесирање на mRNA се многу посложени кај еукариотите отколку кај прокариотите.

Иако вертебралните организми имаат нешто поголеми геноми од инвертебралните, тие кодираат далеку поголем број протеини.

Процесот на идентификација на протеин-кодирачки гени во геномите на бактериите и едноставните еукариотски организми претставува релативно едноставен процес кој се сведува на компјутерско пребарување на секвенците за присуство на отворените рамки на читање (ORF). За потсетување, тоа се секвенци кои се составени од

вени од триплети почнувајќи од стартниот, па, сè до стоп-кодонот. Сепак, не се сите отворени рамки на читање протеин-кодирачки гени. Од тие причини постојано се усовршуваат биоинформатичките алгоритми за идентификација на гените кај еукариотските организми. Ваквата анализа станува мошне комплицирана и недоволно ефективна кај големите геномите на вишите еукариоти. Тие имаат многу сложена и недоволно јасна генска структура, па, неопходни се и далеку посоефицицирани софтверски алатки за пронаоѓање (попрецизно: за предикција) на гените и на регулаторните секвенци.

Треба да се има предвид дека покрај хромозомскиот геном (лоциран во јадрото), митохондриите и хлоропластите кај еукариотите содржат свои сопствени геноми, но, ако не е поинаку нагласено, општиот термин геном кај еукариотите се однесува на јадрениот геном.

## 16.5 Споредба на еукариотските геном со прокариотските

При споредувањето на прокариотскиот и еукариотскиот геном можат да се истакнат некои поважни разлики:

- **Еукариотските геноми се поголеми** од тие на прокариотите. Оваа разлика не е изненадувачка, поради фактот што повеќеклеточните организми имаат голем број клеточни типови, како и многу поголем број на протеини, кои се потребни за извршување на различни клеточни и органски функции. Заради споредба, голем број вируси имаат геноми со должина од околу 10000 базни парови (10 kb) и кодираат само неколку протеини. Од друга страна, најекстензивно проучуваниот прокариот, бактеријата *E. coli*, има геном со должина од околу 4,5 милиони базни парови (4,5 Mb) кои кодираат неколку илјадници различни протеини, а содржат и голем број секвенци за регулација на генската експресија. Човековиот геном содржи многу повеќе гени и регулаторни секвенци, но, и многу репетитивни секвенци. Интересно е дека има и исклучоци од правилото дека за покомплексен организам е потребно поголемо количество DNA, а тоа е особено изразено кај некои растенија. Цветното растение крин, на пример, има 18 пати помал геном (т.е. помало количество DNA) отколку човекот, иако пресметаниот број гени не е многу помал.
- **Еукариотските геноми содржат повеќе регулаторни секвенци** отколку прокариотските геноми. Големата структурна и функционална сложеност на еукариотските организми наметнува и многу покомплицирани регулација на генската експресија. Овој факт е евидентен со големиот број молекуларни механизми кои се обезбедени при експресијата на еукариотскиот геном.
- **Голем дел од еукариотската DNA е некодирачка** - насекаде низ еукариотскиот геном се расеани различни видови на репетитивни DNA-секвенци кои не се транскрибираат во протеини. Дури и кодирачките региони на гените содржат секвенци кои не се составен дел на соодветната mRNA.
- **Еукариотските клетки имаат повеќе хромозоми** - сликовито кажано, еукариотската геномска енциклопедија е разделена во повеќе томови (хромозоми). Покрај генските и регулаторните секвенци, секој хромозом содржи и најмалку три специфични хромозомски DNA-секвенци: почеток на репликација (*ori*), кој што

се препознава од страна на репликациската машинерија; центромерен регион кој што ги поврзува реплицираните хроматиди заедно пред почетокот на митозата (сè до анафазата); и теломерни секвенци на секој од краевите на хромозомските краци.

Споредбата на поважните карактеристики на прокариотските и еукариотските гени и геноми е прикажана во **табелата 16-2**.

**Табела 16-2: Споредба на основните карактеристики на прокариотските и на еукариотските геноми**

карактеристика	прокариоти	еукариоти
големина на геномот (базни парови)	$10^4 - 10^7$	$10^8 - 10^{11}$
репетитивни секвенци	ретки	многубројни
некодирачка DNA внатре во кодирачките региони	ретка	честа
транскрипцијата и транслацијата се физички раздвоени во клетката	не	да
DNA-молекулите се сегрегирани во јадрото	не	да
DNA-молекулите се врзани со протеини	исклучително малку	екстензивно
промотори	има	има
енхесери / сајленсери	ретки	чести
процесирање на примарниот RNA-транскрипт (додавање на 5'-капа и 3'-полиаденилација)	нема	има
процесирање со RNA сплајсинг	ретко	често
број на хромозоми во геномот	еден	повеќе

## 16.6 Мобилни генски елементи

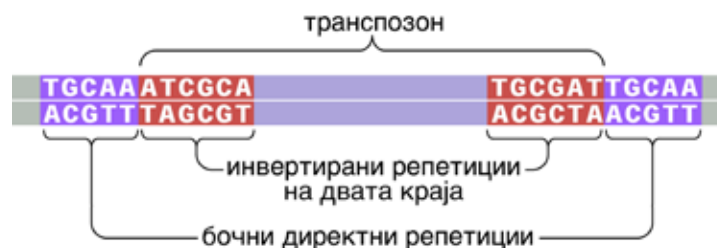
Покрај нив, постои и голем број на различни екстрахромозомски генски елементи какви што се плазмидите кај бактериите и вирусите и подвижните елементи кај еукариотите. Геномот не е статичен и во него постојат определени DNA-региони кои можат во извесна смисла да се движат низ геномот, па, се означени како **мобилни (подвижни) генски елементи**, а понекаде се нарекуваат и „скокачки гени“. Мобилните генски елементи можат да се преместуваат од едно во друго место во геномот, па, дури можат привремено да постојат и како издвоени молекули, но, не можат да опстанат до толку независно како вирусите. Таквите супклеточни генски елементи можат да имаат различен ефект врз клетката во која се наоѓаат. Некои од нив егзистираат без каква било штета врз клеточните функции, додека други се однесуваат како вистински паразити, што покажува определени сличности со вирусите (**табела 16-3**).

Процесот на преместување на DNA-секвенците од едно во друго место во геномот се нарекува **транспозиција**, па, и најголемиот дел од мобилните елементи се означуваат како **транспозони**.

Табела 16-3: Класи на транспозони			
класа	група елементи	транспозици- ја преку	примери
класа I	LTR ретротранспозони	RNA	<i>Тy</i> -елемент (кај квасците); хумани ендогени ретровируси
	не-LTR ретротранспозони	RNA	<i>L1</i> и <i>Alu</i> -елементи (кај луѓето)
класа II	DNA ретротранспозони	DNA	инсерциска секвенца, бактериофаг <i>Mu</i> и <i>Tn7</i> транспозон (кај бактерии); <i>P</i> -елемент (кај <i>Drosophila</i> ); <i>Ac</i> -и <i>Ds</i> -елементи (кај пченка); <i>Tc1/mariner</i> суперфамилија (кај инвер- тебратите и вертебратите)

## Транспозони

Како што е веќе претходно кажано, самостојно реплицирачките молекули какви што се плазмидите, хромозомите и вирусите поседуваат сопствен извор на репликација (*ori*) и се по дефиниција репликони. За разлика од нив, транспозоните не поседуваат такви секвенци, па, не спаѓаат во репликоните и за да опстанат мораат секогаш да се вметнуваат во геномот на клетката во која се наоѓаат. Терминолошки, изразот транспозон обично се користи само за мобилните DNA-елементи кои не поседуваат реверзна транскриптаза. Кај поголемиот број транспозони постојат т.н. инвертирани репетитивни секвенци на двата бочни краја од целокупниот транспозон (слика 16-4).



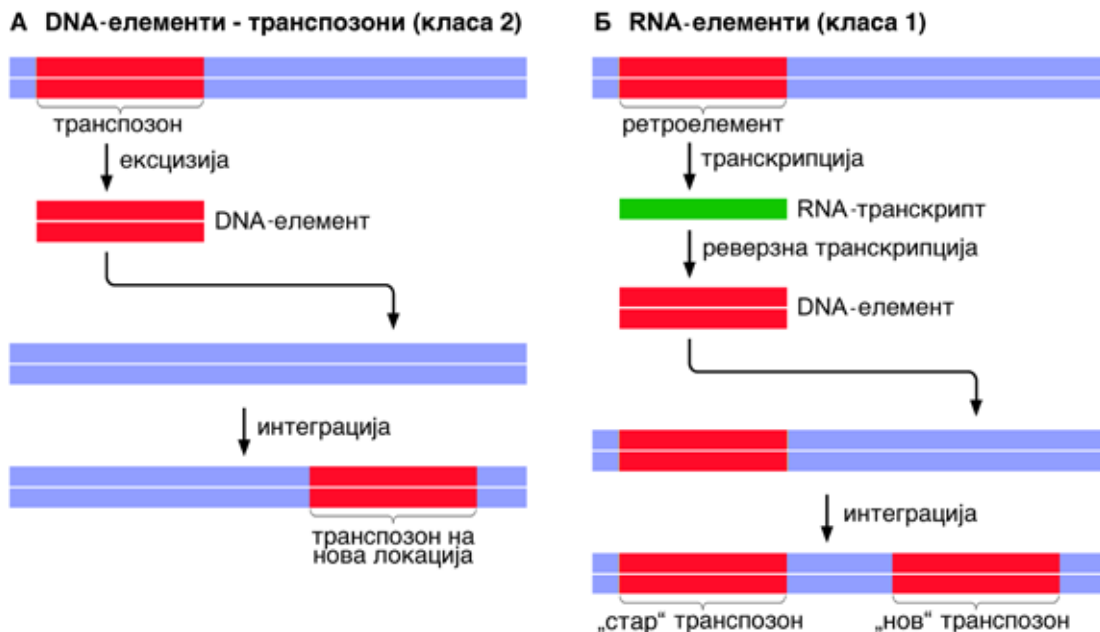
**Слика 16-4:** Инвертирани репетитивни секвенци на двата краја кај повеќето транспозони.

## Процес на транспозиција

Транспозицијата може да се одвива преку повеќе разеден од два основни начини: конзервативен и репликациски (слика 16-5).

При **конзервативната (нерепликациска) транспозиција**, транспозонот се издвојува од оригиналното место во геномот т.н. (ексцизија - отсекување), а потоа се вметнува во ново место. Со тоа, бројот на копии на дадениот транспозон во целокупниот геном не се менува. Овој механизам може сликовито да се спореди со командата „cut-paste“ во *MS Word*, поради тоа што оригиналната секвенца се преселува на друга геномска локација.

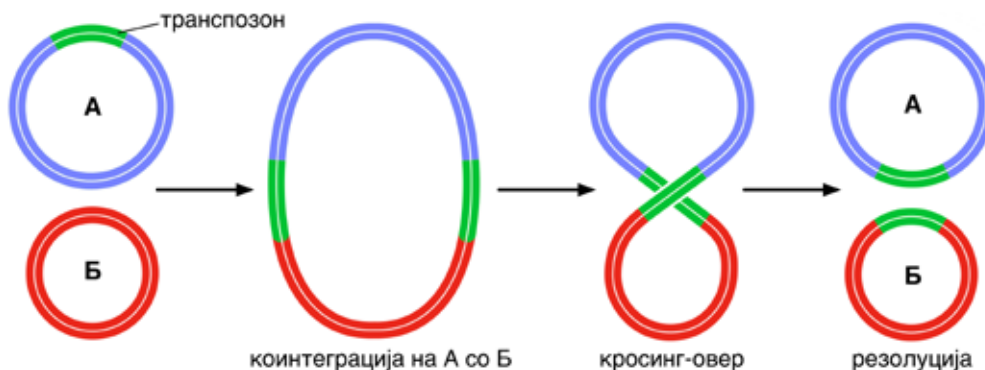




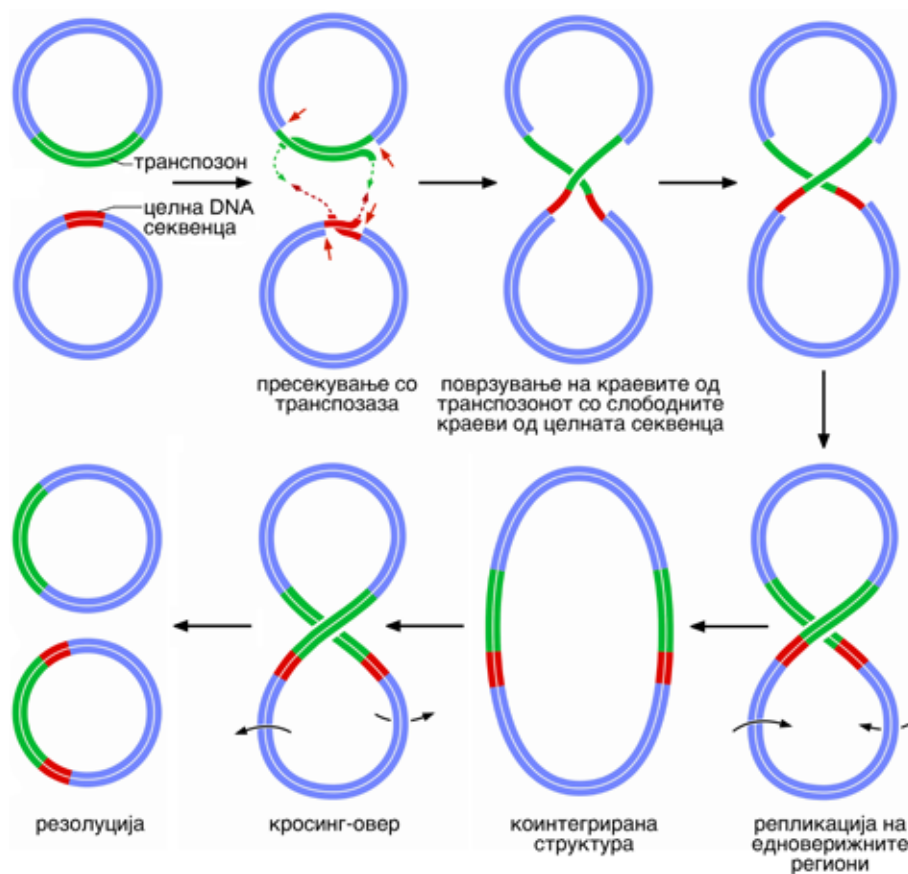
**Слика 16-5:** Основни типови на транспозиција. **А:** кај DNA-транспозоните (елементи од класата 2) се одвива конзервативна транспозиција. **Б:** кај RNA-елементите (класа 1) се одвива репликациска транспозиција преку реверзна транскрипција.

Наспроти тоа, при **репликациската транспозиција**, транспозоните се транскрибираат во интермедиерен RNA-молекул, а потоа од него се врши реверзна транскрипција во двовержна DNA, која се вградува во друго место во геномот. Заради појасна претстава, репликациската транспозиција може да се спореди со операцијата „copy-paste“ во MS Word, па, покрај оригиналниот транспозон кој останува на својата позиција, се создава негова нова копија на друга геномска локација.

Овие секвенци имаат клучна улога во процесот на репликациска транспозиција преку кој се зголемува бројот на копии од истиот транспозон (слика 16-6 и 16-7).



**Слика 16-6:** Зголемување на бројот на транспозони преку репликациска транспозиција.

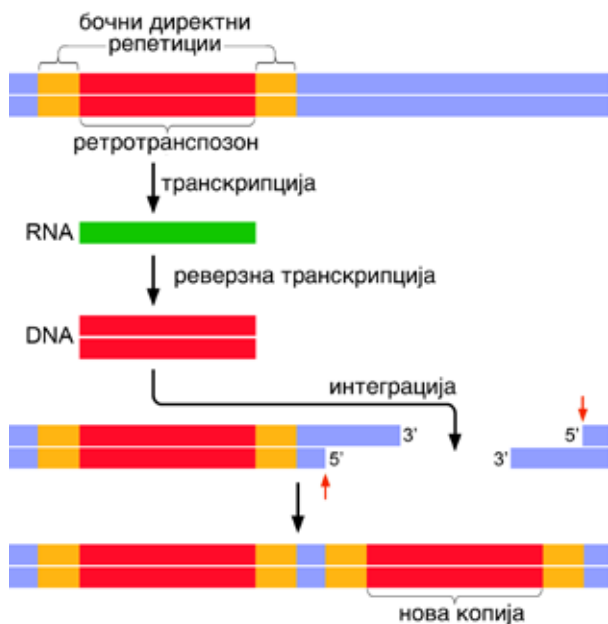


**Слика 16-7:** Репликациска транспозиција.

Пред транспозицијата, мобилниот DNA-елемент (трансποзон) е присутен само во едниот молекул. Како што е прикажано на наведената слика, спојувањето на двете молекули и репликацијата на трансποзонот создава коинтегрирана структура составена од двете секвенци (A и B) споени со двата трансποзона. Кросинг-оверот во секвенците на трансποзонот овозможува раздвојување на двете молекули, при што секој од нив содржи по една копија од трансποзонот.

Кај еукариотите постојат трансποзони чие движење низ геномот вклучува реверзна транскрипција и се означуваат како **ретротрансποзони**. Таквите RNA-елементи најпрво се транскрибираат во интермедиерни RNA-молекули. Од нив се врши синтеза на двоверижна DNA, а потоа се вметнуваат (инсертираат) во други геномски локации (**слика 16-8**).

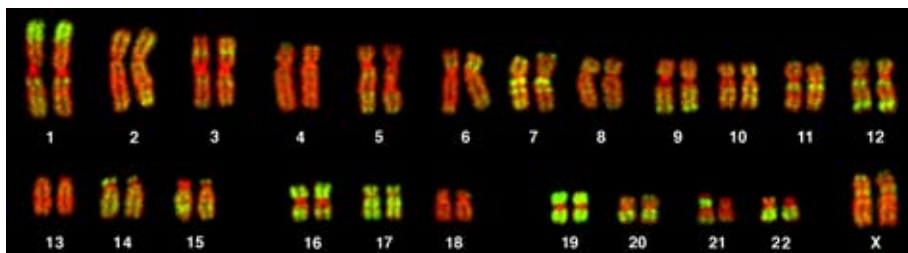
Важно е што транспозициите можат да предизвикаат инсерции, делеции и инверзии во геномот.



**Слика 16-8:** Ретротранспозоните користат реверзна транскрипција за синтеза на интермедиерни RNA-молекули при својата транспозиција.

Постојат четири главни типа на транспозони кај еукариотите:

1. **SINE**, куси дисперзирани елементи (англ. *short interspersed elements*): со должина до 500 базни пара, кои се транскрибираат, но, не и преведуваат.
2. **LINE**, долги дисперзирани елементи (англ. *long interspersed elements*): со должина до 7000 базни пара. Тие се транскрибираат и се преведуваат во протеини.
3. **Ретротранспозони**: исто така прво создаваат своја RNA копија, а некои од нив ги кодираат и протеините кој им се потребни при тие процеси. Присутни се во енормен број: т.н. **Alu-елемент** е долг 300 базни пара и е присутен во **милиони копии**, со што опфаќа дури 11% од хуманиот геном (**слика 16-9**).
4. **DNA-транспозони**: се пренесуваат во нови места во геномот без репликација и без RNA посредник, слично како кај прокариотските клетки.



**Слика 16-9:** Визуализирање на *Alu*-елементот во хуманите хромозоми. Прикажан е кариотип од лимфоцит на женска индивидуа ( $2n=46, XX$ ), каде со флуоресцентна *in situ* хибридизација (FISH) е извршена хибридизација на хромозомите со обележана флуоресцентна сонда специфична за *Alu*-елементот (зелена боја), додека позадинското боене на хромозомите е со неспецифичната црвена боја TOPRO-3 која се врзува со DNA.

**Извор:** Фотографијата е објавена од Public Library of Science во трудот: Bolzer et al., (2005) Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes. PLoS Biol 3(5): e157 DOI: 10.1371/journal.pbio.0030157. Достапна е на Wikimedia Commons и според лиценцата (*Creative Commons Attribution 2.5*) дозволено е користење на сликата доколку се наведе интернет страницата на изворот: <http://www.plosbiology.org/article/info:doi/10.1371/journal.pbio.0030157>.

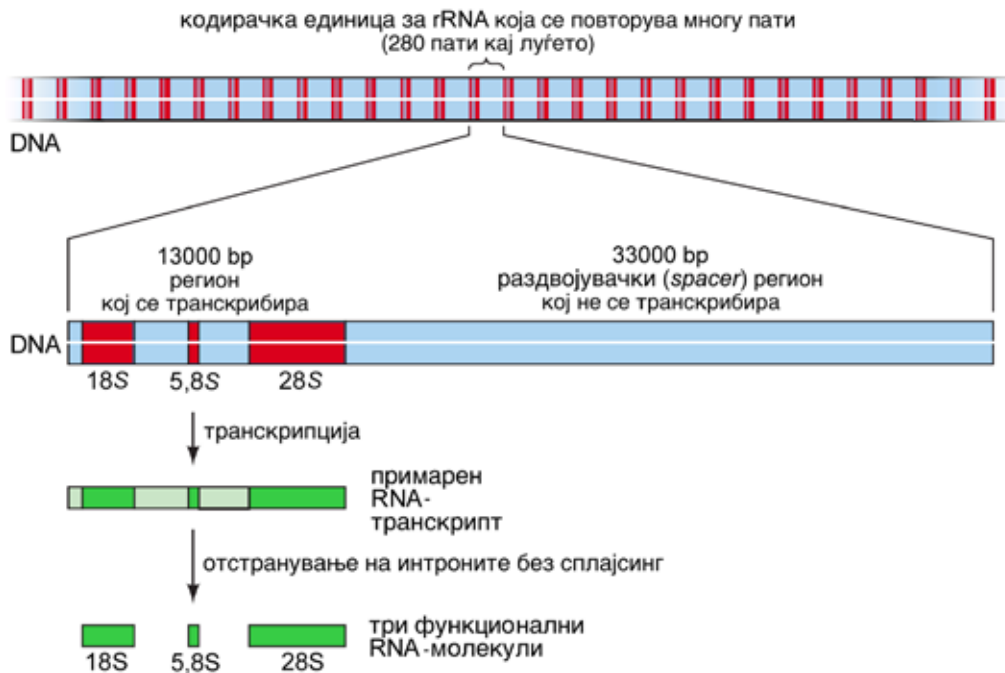
Овие два типа на елементи се присутни во повеќе од 100000 копии во еукариотскиот геном.

Долго време преовладувало мислењето дека транспозоните се клеточни паразити чија функција е само сопствената репликација или, пак, дека не претставуваат никаква опасност за здравјето на организмот во чиј геном се наоѓаат. Но, случајната инсерција на транспозонот во некој функционален ген може да предизвика мутација и нарушување на генската функција, како кај некои многу ретки форми на хемофилија и мускулна дистрофија кај луѓето. Покрај тоа, се претоставува дека мобилните гебетски елементи допринесуваат за генетската варијабилност на организмите, па, оттаму имаат улога во еволуцискиот процес.

## 16.7 Типови на DNA-секвенци во еукариотските геноми

Според тоа колку пати еден ист ген се наоѓа во некој геном, гените можат да се поделат на повеќе класи. Имено, некои гени се единствени само во една локација во геномот, односно се наоѓаат само на точно определен регион во некој хромозом, па, се означуваат како **нерепетитивни** или **уникатни секвенци**. Најголемиот број од протеин-кодирачките гени спаѓаат во оваа класа, но, исто така и некои негенски секвенци чија што функција, ако воопшто ја имаат, е непозната.

Еукариотскиот геном содржи голем број DNA-секвенци кои **се повторуваат едно по друго** голем број пати и се наречени **репетитивни секвенци**. Според бројот на повторувања, оваа класа може да се подели на умерено и на високо репетитивни се-



**Слика 16-10:** Шематски приказ на гените за трите рибозомските RNA (rRNA) субединици 18S, 5,8S и 28S кои се умерено репетитивни во хуманиот геном.

квенци. **Умерено репетитивните секвенци** најчесто се долги 150 до 300 базни пара, а се повторуваат повеќе стотици или илјадници пати во геномот. Во нив спаѓаат некои функционални гени кои ги кодираат рибозомските RNA-молекули. Кај луѓето, овие гени се наоѓаат на пет места во геномот и на секое од нив се повторуваат 280 пати едно по друго. Секој од нив ги кодира основните рибозомски RNA-молекули: 18S, 5,8S, 28S и 5S rRNA (слика 16-10).

Поголем број пати во геномот се повторуваат и гените за транспортните RNA-молекули. Освен нив, на краевите од секоја хроматида се наоѓаат посебни функционални секвенци наречени **теломери** кои не се транскрибираат, ниту преведуваат, но, имаат важна улога во одржувањето на должината и интегритетот на хромозомските краеве.

## Репетитивни секвенци и мобилни елементи во еукариотскиот геном

Кај еукариотите се наоѓаат три типа **високо репетитивни секвенци**:

- **Сателити**: секвенци долги 5 - 50 базни парови коишто се повторуваат една по друга и до милион пати. Обично се присутни во центромерите на хромозомите, и за нив се врзуваат специјални центромерни протеини;
- **Минисателити**: секвенци долги 12 - 100 базни парови коишто се повторуваат едно по друго неколку илјади пати. Поради тоа што DNA-полимеразата особено често прави грешки при репликацијата на овие секвенци, бројот на репетиции варира од една до друга индивидуа, што е од практична важност за молекуларната генетика;
- **Микросателити**: многу куси секвенци (1 - 5 базни парови), застапени со мали групации од по 10 - 50 копии, кои се расфрлени низ геномот.

Овие високо репетитивни секвенци **не се транскрибираат во RNA**. Иако научниците подолго време ги користат во лабораториските истражувања, сè уште не е јасна улогата на овие секвенци во геномот на еукариотите.

Поголемиот дел од преостанатите **средно репетитивни DNA-секвенци** се расфрлани низ геномот, но, не се стабилно интегрирани во него. Наместо тоа, овие секвенци можат да се преместуваат од едно на друго место во геномот, па, се нарекуваат **транспозони** или **мобилни (подвижни) елементи**. Зафаќаат околу 45% од хуманиот геном, многу повеќе отколку кај другите еукариоти коишто се секвенционирани, кај кои се застапени со 3 - 10%.

## 16.8 Структура на протеин-кодирачките гени

Гените се дефинираат како DNA-секвенци кои кодираат функционален продукт, најчесто полипептид. Но, како што е досега повеќе пати истакнато, некои гени кодираат функционални RNA-молекули (разни типови на rRNA, tRNA и други), а не протеини. Кај протеин-кодирачките гени, постои отворена рамка за читање (ORF) која се протега од старт- до стоп-кодонот и е составена од триплети кои директно ги кодираат аминокиселините. На ниво на DNA-секвенцата, рамката на читање е најчесто непрекината со интронски секвенци, но, тие, по сплајсингот, отсутнуваат кај

зрелите mRNA-молекули. Но, генот ги опфаќа и контролните и регулаторни елементи (промотори, засилувачи, стивнувачи), регионите кои не се транскрибираат, како и тие кои се транскрибираат, но, не се преведуваат во крајниот протеински продукт, а се важни за стабилноста и процесирањето на mRNA-молекулите (слика 16-11).



**Слика 16-11:** Нуклеотидна секвенца од неурнек (кодирачката) DNA-верига на дел од човековиот ген за интерлеукин 2. Со позадини во различни бои се прикажани секвенците на четирите егзони и на трите интрони, на стартниот и стоп-кодонот, на TATA-елементот во промоторот, како и на секвенцата за полиаденилација во регионот 3'-UTR. Означен е и првиот нуклеотид од кој почнува транскрипцијата. Заради просторот, скусена е секвенцата која се наоѓа спротиводно од промоторот, како и секвенците на интроните 2 и 3 (во загради е наведен бројот на нуклеотиди кои не се прикажани).

Слично како и кај соодветните прокариотски гени, голем број од гените што кодираат протеини кај еукариотите содржат секвенци кои се наоѓаат само еднаш во



геномот (имаат по една копија на DNA во секој хаплоиден геном).

Кај едноклеточните еукариотски клетки (квасните габи), бројот на гени што содржат интрони е мал, додека кај вишите, повеќеклеточни организми е многу поголем. Бројот на интрони во поединечните гени е исклучително разнолик. Генот за протеинот **титин** кај луѓето, на пример, содржи 363 интрони. Значителен број нуклеотиди од генот можат да се однесуваат на интроните, наместо на кодирачките, егзонски секвенци. Екстреман пример за тоа е човековиот ген за Душеновата (Duchenne) мускулна дистрофија. Целиот ген содржи 79 егзони и 78 интрони и има должина од околу 2,5 милиони базни парови. По транскрипцијата на овој ген и сплајсингот, настанатата mRNA е долга само 14000 нуклеотиди, што покажува дека најголемиот дел од генот е некодирачки, додека егзоните опфаќаат само 0,56% од неговата DNA-секвенца. Сепак, ова е само екстреман пример, додека повеќето егзони имаат просечна должина од 150 нуклеотиди. Кај еукариотските клетки, интроните се наоѓаат во најголем број од протеин-кодирачките гени, но, и во гените кои кодираат рибозомски RNA, па, дури и tRNA-молекули.

## 16.9 Генот на човекот

Двата истражувачки тима истовремено ја објавија иницијалната секвенца на хуманиот геном во февруари 2001 година, а две години подоцна заврши комплетното секвенционирање и иницијалното определување на DNA-регионите според можната функција.

Хаплоидниот геном на човекот содржи околу 3,2 милијарди базни пара, што може да се означи и како  $3,2 \times 10^9$  или 3,2 гигабазни пара, Gbp). Заради посликовита претстава, една страница текст типично содржи околу 3000 букви, па, испишаната нуклеотидна секвенца на човековиот геном би зафатила околу милион страници. Од друга страна, би бил потребен еден цел век доколку би се рецитирала целокупната секвенца на геномот, буква по буква, со брзина од еден нуклеотид на секунда, непрекинато по 24 часа на ден.

Важно е што помалку од 2% од целокупниот човеков геном се однесува на протеин-кодирачките гени, додека најголемиот дел е некодирачка DNA (репетитивни секвенци, интергенски региони, интрони итн.). Околу 28% од геномот се транскрибира во RNA, по, поради постоењето на интрони и нетранскрибирани секвенци, само околу 1,25% од секвенцата директно ги кодира аминокиселинските остатоци кај протеински продукти. Воопштено, интроните во човековиот геном се подолги отколку кај преостанатите секвенционирани геноми. Со компјутерска анализа, во човековиот геном можат да се најдат региони кои се побогати со парови А-Т, како и спротивно, региони побогати со парови G-C (повисок GC%). Интересно е што густината на паровите G-C е поголема кај протеин-кодирачките гени, но, се непознати причините и значењето на овој феномен.

Повеќе од половина од геномот кај луѓето се состои од репетитивни секвенци со различна должина (SINE-елементи, LINE, ретроелементи, транспозони, минисателити, микросателити итн.). Овие репетитивни елементи се опишани претходно. Од геномски аспект, постоењето на толку висок процент на овие секвенци во човековиот геном е, во најмала рака, мошне необично. Запрепаствувачки е податокот дека околу 8% од целиот геном се однесува на дефектни ретровирусни секвенци, што може да ја имплицира нивната улога во еволуцијата. Присуството на репетитив-



ните елементи, воопшто, е предмет на интензиво проучување со специјализирани компјутерски програми и се очекува да помогне во објаснувањето на повеќе важни прашања за еволуцијата.

**Табела 16-4: Податоци за пресметаниот број гени по поединечен хромозом кај човекот**

хромозом	број на гени <sup>1</sup>	вкупно базни парови <sup>2</sup>	секвенционирани базни парови
1	4 220	247 199 719	224 999 719
2	1 491	242 751 149	237 712 649
3	1 550	199 446 827	194 704 827
4	446	191 263 063	187 297 063
5	609	180 837 866	177 702 766
6	2 281	170 896 993	167 273 993
7	2 135	158 821 424	154 952 424
8	1 106	146 274 826	142 612 826
9	1 920	140 442 298	120 312 298
10	1 793	135 374 737	131 624 737
11	379	134 452 384	131 130 853
12	1 430	132 289 534	130 303 534
13	924	114 127 980	95 559 980
14	1 347	106 360 585	88 290 585
15	921	100 338 915	81 341 915
16	909	88 822 254	78 884 754
17	1 672	78 654 742	77 800 220
18	519	76 117 153	74 656 155
19	1 555	63 806 651	55 785 651
20	1 008	62 435 965	59 505 254
21	578	46 944 323	34 171 998
22	1 092	49 528 953	34 893 953
X	1 846	154 913 754	151 058 754
Y	454	57 741 652	25 121 652
<b>Вкупно</b>	<b>32 185</b>	<b>3 079 843 747</b>	<b>2 857 698 560</b>

\*извор: База на податоци за анотираниите вертебрални гени (VEGA, од англ. *The vertebrate genome annotation database*) при Сангеровиот институт, 2008.

<sup>1</sup> пресметани и идентифицирани гени

<sup>2</sup> пресметана должина на секој хромозом при што се земени во предвид и несеквенционираниите хетерохроматински региони

Пред да заврши грандиозниот проект за секвенционирање на човековиот геном, преовладувал ставот (базиран на пресметки и претпоставки) дека геномот содржи меѓу 80000 и 100000 гени. По објавувањето на анализите на геномските по-

датоци со биоинформатички методи, пресметките варираат меѓу 25000 и 35000 гени во хуманиот геном. Иронично, овој број е незначително поголем отколку кај винската мушичка (*Drosophila melanogaster*) и од слични организми со далеку помала биолошка сложеност и еволуциски напредок. Некои студии сугерираат дека ваквите пресметки го потценуваат вистинскиот број на гени, судејќи според податоци кои укажуваат дека човековиот протеом содржи околу 500000, а поновите податоци укажуваат дури на 1000000 различни протеински молекули. Поедноставено, има далеку повеќе е типови на полипептиди во човековото тело, отколку што може да се очекува според пресметаните броеви на гени. Оттаму и се претпоставува, дека во кодирањето на протеинските продукти значително учествуваат и алтернативните промотори, алтернативниот сплајсинг, посттранскрипциските модификации на некои протеини (создавање на неколку полипептиди од еден иницијално синтетизиран протеин со помош на протеолиза, на пример), како и други процеси кои драстично го зголемуваат бројот на кодирани протеински продукти, наспроти многу помалиот број гени.

Со овие механизми, се менува опсолетната констатација на Бидл и Татум од 1930 година дека секој еден ген кодира еден протеин (ензим) која долго имала речиси догматично значење во молекуларната генетика.

Само заради ориентација, најновите податоци за идентифицираниот или пресметаниот број гени во секој од 22-та автозомни и двата полови хромозоми од човековиот геном се прикажани во **табелата 16-4**. Во пресметките се вклучени протеин-кодирачките гени, гените кои кодираат функционални RNA-молекули, псевдогените и други секвенци.

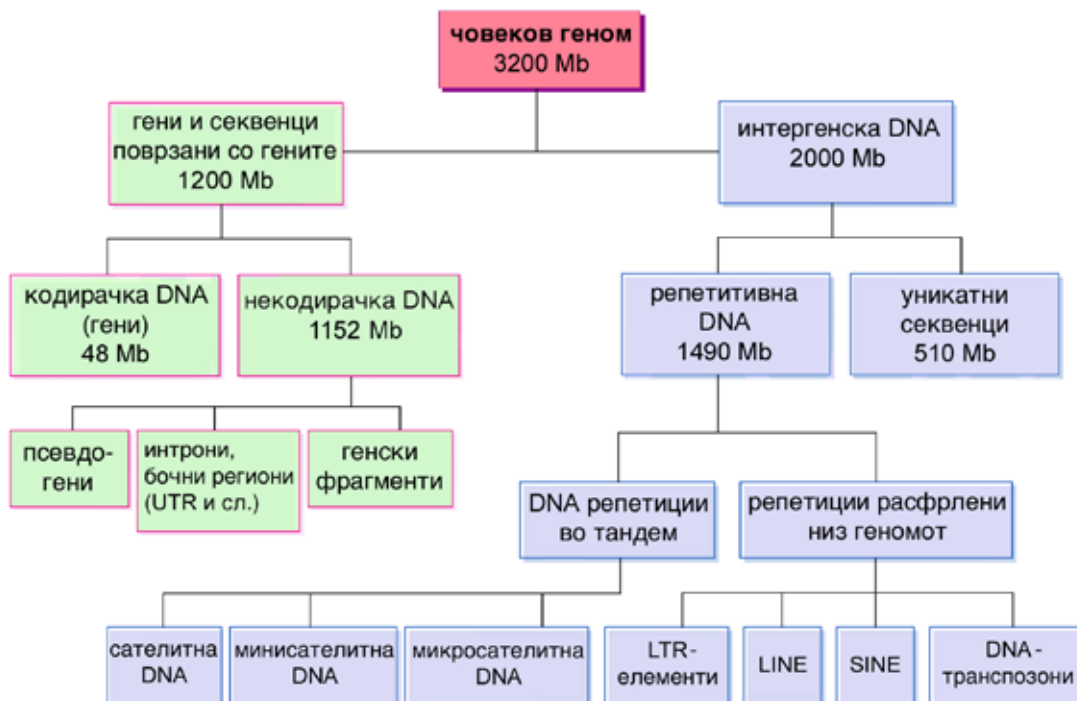
Статистичката анализа на податоците од хуманиот геном покажува дека просечната должина на гените изнесува 27000 базни парови, но, должината силно варира во опсег од 1000 до 2,4 милиони базни парови. Должината на полипептидите, пак, кодирани од човечките гени изнесува од 100, ра, сè до 26900 аминокиселински остатоци. Интроните се присутни во речиси сите гени во хуманиот геном.

Преку 50% од човековиот геном е составен од високорепетитивни DNA-секвенци. Поголемиот дел од нив се транспозони (мобилни елементи) за кои се претпоставува дека се своевидни молекуларни паразити. Нивната функција, ако воопшто ја имаат, е непозната, но, се шпекулира дека се важни за еволуцијата. Карактеристично е што во близина на гените, репетитивните секвенци се богати со динуклеотидите GC, додека тие лоцирани подалеку од гените се богати со динуклеотиди AT.

Гените се нееднакво дистрибуирани низ човековиот геном: според досегашните сознанија, тие се густо збиени во малиот хромозом 19, додека хромозомот 8 содржи долги некодирачки региони. Y хромозомот има најмалку гени, додека првиот хромозом има најмногу.

Функцијата на повеќето гени е сè уште непозната. На пример, само дел од гените за функционални RNA-молекули всушност кодираат tRNA или rRNA-молекули, додека преостанатите кодираат RNA-молекули кои имаат, засега, непозната функција. Досегашните истражувања укажуваат на тоа дека само околу 5% од просечниот протеин-кодирачки ген кај луѓето всушност директно ги кодира аминокиселинските остатоци, додека преостанатите 95% се интронските секвенци (**слика 16-12**).

Интергенската DNA се дефинира како дел од геномот кој не содржи гени, односно ги опфаќа секвенците кои не кодираат протеински продукти, ниту функцио-



**Слика 16-12:** Геномска организација на вкупната DNA-секвенца кај човекот. Секвенците кои кодираат протеини се застапени со помалку од 2% од целокупниот геном, а најголем дел припаѓа на некодирачка DNA.

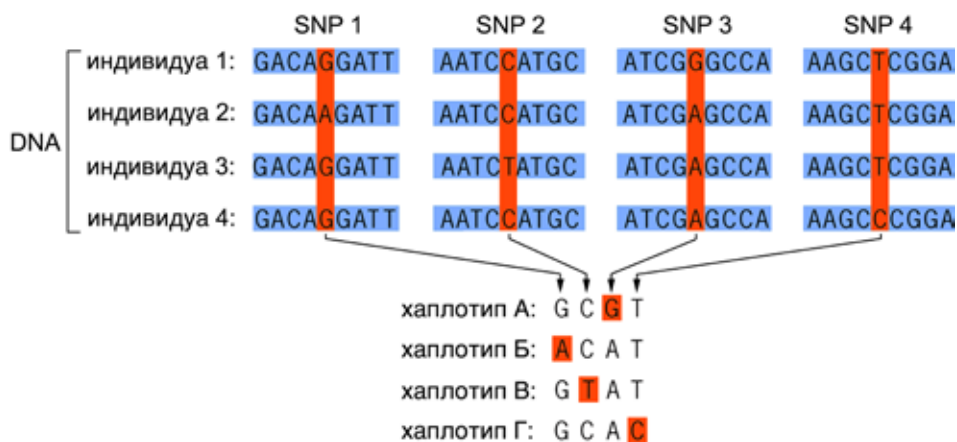
нални RNA-молекули. Повеќе од 60% од хуманиот геном се состои од интергенски DNA-секвенци чија функција е непозната. Во текот на еволуцијата, кај покомплексните организми дошло до енормно зголемување на количеството на интергенски секвенци, со што се намалила густината на гените во геномите. Најголемиот дел од интергенските DNA-секвенци кај луѓето се однесуваат на репетитивната DNA. Речиси половина од целиот хуман геном се состои од DNA-секвенци кои се повторуваат повеќе пати во геномот. Останатите интергенски секвенци се псевдодогените.

Кај еволуциски блиските видови се наоѓаат гени кои имаат структурна и функционална сличност, па, дури се и идентични. Причина за тоа е самата еволуција: сите организми потекнуваат од ист анцестор и се поврзани меѓусебно поради тоа што нивните гени се сродни во помала или поголема мерка. Во текот на еволуцискиот процес, гените инволвирани во фундаменталните процеси и животни-важните функции какви што се контролата на клеточниот циклус, или ембриолошкиот развој и диференцијацијата, се многу малку променети, односно се еволуциски конзервирани, кај разни организми. Имено, мутациите во гените задолжени за контрола на такви витални функции обично предизвикуваат смрт кај единките и не се пренесуваат врз нивното потомство. Токму од тие причини нуклеотидната секвенца на овие гени останува речиси непроменета во текот на долги еволуциски интервали. Таквите гени се мошне слични или се идентични кај различни и еволуциски оддалечени видови какви што се квасците, инсектите, црвите, вертебралните, цицачите, па, дури и кај растенијата.

## Единечни нуклеотидни полиморфизми и хаплотипови

Наспроти еволуциски конзервираните критично важни гени, DNA-секвенциите кои не кодираат протеински или функционални RNA продукти, не се подложени на силен еволуциски притисок да останат непроменети, па, во нив се акумулираат поголем број на мутации. Поради тоа, некодирачките DNA-секвенци, или гените кои не се од витална важност за организмот, се исклучително многу варијабилни, не само меѓу различните видови, туку и меѓу различните индивидуи во рамките на ист вид. Таквите индивидуални разлики (полиморфизми) се причина за генетската единственост на секоја една индивидуа. Речиси 99,8% од геномот е **идентичен** кај сите луѓе. Просечно еден од секои илјада нуклеотиди се разликува од една до друга човечка индивидуа, а се должи, пред сè, на милионите **еднонуклеотидни полиморфизми** (SNP од англ. *single-nucleotide polymorphisms*, кратенката се изговара: „снип“), т.е. нуклеотидни позиции кои се разликуваат кај повеќе од 1% од човечката популација. Тие се главната причина за разликите во фенотипските карактеристики какви што, на пример, се: бојата на косата, алергијата кон определени лекови, телесната височина, должината на стапалата, метаболичните функции, а донекаде, и на однесувањето. Покрај нив, постојат и многу други полиморфизми во DNA кои допринесуваат за генетската единственост на индивидуите, а кои меѓу другото, се причина за очигледните фенотипски видливи разлики меѓу нив, но, и за склоноста кон различни заболувања и други потешко забележливи последици.

Повеќето SNP-а настанале случајно во форма на мутација, односно полиморфизам, на определена DNA-секвенца во хромозомот на некој предците на индивидуата, а потоа, постепено се прошириле низ популацијата. Оттаму, секој поединечен SNP е првично поврзан со други SNP, како и со останатите типови на генетски варијанти или алели, кои биле присутни во близината на нуклеотидната позиција каде првично се појавил SNP. Специфичната група на SNP и на други генетски варијанти присутни на еден хромозом или на дел од хромозомот се нарекува **хаплотип** (кованица од: **хаплоиден** **генотип**) (слика 16-13).



**Слика 16-13:** Шематски приказ на хаплотипските комбинации на четири SNP-а кај DNA-молекулите од четири различни индивидуи. Означени се нуклеотидите кои се разликуваат кај секој поединечен хаплотип.

SNP-ата во определен хаплотип се наоѓаат релативно близу на еден ист молекул на DNA, односно се физички поврзани, па, имаат тенденција да се наследуваат групно. Кај луѓето, хаплотиповите се протегаат во опсег од 1 - 100 kB (килобазни парови). Колку е помала должината на нуклеотидите во хаплотипот, толку е помала веројатноста од негова промена преку рекомбинација при наследувањето во текот на поголем број генерации. Сепак, повремено можат да настанат нови хаплотипови преку појава на нови мутации, односно полиморфизми, како и преку кросинг-оверот со кој се прекинува определена група на SNP-а во хаплотипот. Стапката на рекомбинација со кросинг-овер е обратно пропорционална со физичките растојанија меѓу гените, SNP-ата и други генетски варијанти кои се наоѓаат блиску на хромозомот, па, оттаму, колку што се поставени поблиску еден до друг, толку е посилна поврзаноста на SNP-ата во хаплотипови. Токму тоа е причината за феноменот на неслучајното поврзување меѓу генетските варијанти (какви што се SNP-ата и алелите) во определен хаплотип при наследувањето. Имено, состојбата кога варијантите се меѓусебно поврзани во определена комбинација со значително повисока фреквенција отколку што би се очекувало по пат на случајност се нарекува **нерамнотежна распределбата на алелите** (англ. *linkage disequilibrium*: врзана нерамнотежа).

Од практичен аспект, важно е дека поради тоа што SNP-ата во хаплотипот се наследуваат врзано, идентифицирањето на само неколку SNP-а е доволно за определување на хаплотипот, иако тој може да содржи илјадници поединечни SNP-а. Таквите SNP-а кои се користат за идентифицирање на хаплотипот се нарекуваат **SNP-маркери** (англ. *tag-SNP*). Се смета дека постојат околу 10 милиони SNP-а во човечката популација, но, поради нерамнотежната распределбата на алелите, овие SNP-а се наоѓаат во многу помал број на хаплотипови. Затоа, релативно мал број на SNP-а (можеби само 100000) се доволни за идентифицирање на повеќето хаплотипови кај луѓето. Поради варијабилноста и распространетоста во геномот, SNP-ата се вредни како генетски маркери при различни истражувања. Покрај тоа, SNP-ата кои се наоѓаат во близина на определен алел кој предизвикува заболување имаат висока веројатност да се наследуваат врзано. Во таков случај, заболените индивидуи имаат тенденција да имаат различни SNP-а во однос на оние кај здравите луѓе. Споредбата на хаплотипови кај заболените и кај здравите луѓе може да го открие присуство на гени кои влијаат или ја предизвикуваат болеста.

Во 2002 година е започнат меѓународниот проект наречен **ХапМап** чија цел е да се каталогизираат и мапираат SNP-ата и другите генетски варијанти кои би можеле да се користат да се идентифицирање на почестите хаплотипови во хуманата популација при генетските истражувања.

## 16.10 Компаративна геномика

Споредбата на податоците од досега секвенционирани геноми овозможува откривање на нови гени, на нивната функција и на еволуциските соодноси меѓу организмите. Со примена на посложени биоинформатички алгоритми засновани на претходните филогенетски сознанија можат да се претпостават и факторите кои влијаеле врз дивергирањето на видовите, појавата на нови особини, како и на брзината и насоката на еволуцијата.

Анализитите на геномите кај организмите-моделите покажале дека комплексноста и, донекаде, големината на геномот, се поголеми кај еукариотите во однос на прокариотите (при споредба на геномот на едноклеточниот квасец *Saccharomyces cerevisiae* со бактеријата *E. coli*). Следната покрупна геномска разлика е поврзана со мултицелуларноста кај моделната нематода (*Caenorhabditis elegans*). Како што и се очекува, геномот на моделното цветно растение (*Arabidopsis thaliana*) содржи многу гени кои се специфични само за растителните функции (фотосинтезата, растителен раст и слично). Повеќе податоци за геномите на организмите-моделите кои се користат во молекуларната биологија и генетика се дадени во **прилозите**.

Поважните податоци за геномите на неколку претставници од вирусите, како и тие на прокариотските и еукариотските организми се прикажани во **табелата 16-5**.

**Табела 16-5: Споредба на големината на геномите кај некои вируси и кај прокариотските и на еукариотските организми**

вид / ентитет	број на гени <sup>1</sup>	должина на DNA <sup>1</sup>	број на хромозоми <sup>2</sup>	тип на нуклеинска киселина
<b>вируси</b>				
вирус на тутуновиот мозаик	4	6 400 bp	1	ssRNA
бактериофаг φ174	11	5 387 bp	1	ssDNA
вирус на инфлуенца	12	13 500 bp	8	ssRNA
поксвирус	300	187,5 kb	1	dsDNA
<b>прокариоти</b>				
<i>Hodgkinia cicadicola</i> <sup>3</sup>	169	144 kb	1	dsDNA
<i>Mycoplasma genitalium</i>	480	580 kb	1	dsDNA
<i>Methanococcus</i>	1 500	1,7 Mb	1	dsDNA
<i>Escherichia coli</i>	4 000	4,6 Mb	1	dsDNA
<i>Mixococcus</i>	9 000	9,5 Mb	1	dsDNA
<b>еукариоти</b>				
<i>Encephalitozoon intestinalis</i>	2 200	2,9 Mb	11	dsDNA
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5 700	12,5 Mb	16	dsDNA
<i>Drosophila melanogaster</i>	13 500	140 Mb	5	dsDNA
<i>Arabidopsis thaliana</i>	25 000	115 Mb	5	dsDNA
<i>Oryza sativa</i>	45 000	460 Mb	12	dsDNA
<i>Homo sapiens</i>	25 000	3 300 Mb	23	dsDNA
<i>Protopterus aethiopicus</i> <sup>4</sup>	непознат	130 000 Mb	неутврден	dsDNA
<i>Paris japonica</i> <sup>4</sup>	непознат	150 000 Mb	40	dsDNA
<i>Polychaos dubium (Amoeba dubia)</i> <sup>4</sup>	непознат	670 000 Mb	неутврден	dsDNA

<sup>1</sup> пресметаниот број гени и должината често се менуваат според најновите сознанија

<sup>2</sup> овој број кај вирусите и кај бактериите се однесува на бројот непрекинати DNA-молекули кои го сочинуваат целосниот геном

<sup>3</sup> ендосимбиотска бактерија која може да преживее и да се размножува само во клетките на своите домаќини (инсекти)

<sup>4</sup> пресметаната должина на геномот кај овие организми е недоволно сигурна и се оспорува од некои автори

**Кратенки:** ssRNA: едноверижна RNA; ssDNA: едноверижна DNA; dsDNA: двоверижна DNA; bp: базни парови; kb: килобази; Mb: мегабази.

Големината на **вирусните геноми** варира во широк опсег: од околу 1,7 до 1200 килобази кај DNA вирусите и од 1,7 до 33 килобази кај RNA вирусите. Засега, свињскиот цирковирус (Porcine circovirus - PCV) има најмал геном со должина од околу 1800 базни парови и содржи само три гени. Зачудувачки е што најголемиот досега познат геном има *Pandoravirus salinus* од родот *Pandoravirus* и има должина од дури 1,91 мегабази. Овој вирус, кој има и најголем дијаметар на капсидот (од околу 1  $\mu\text{m}$ ), видлив е со светлосен микроскоп и има поголем геном отколку тој на некои бактерии (*Mycoplasma genitalium* со должина од 580 килобази, на пример), а кодира околу 1500 протеини.

Интересно е што големината на геномите варира во опсег од дури 40 000 пати меѓу досега познатите видови и **не корелира** со комплексноста на организмите. Историски, овој феномен се нарекува **парадокс на с-вредноста**, однесувајќи се на масената концентрација на DNA во подинечна клетка на организмот. Имено, долго време (а денес само по исклучок), големината на геномите се изразувала според просечната концентрација на DNA во поединечна клетка. Таа вредност се пресметувала од биохемиските мерења, а не со молекуларните методи. Во секој случај, се претпоставува дека екстремните разлики во големината на геномите меѓу организмите се должат на разликите во содржината на некодирачката, особено на репетитивната DNA. Резултатите од поновите истражувања сугерираат дека геномската големина кај еволуциски и таксономски сродните организми варира во зависност од рамнотежата на молекуларните механизми кои доведуваат до зголемување на геномите (амплификација на ретротранспозоните, дупликации и полиплоидии), од една страна, и тие кои доведуваат до намалување на геномите (нехомологни и нелегитимни рекомбинации, погрешни репарации, делеции), од спротивна страна. Сепак, прецизните молекуларни процеси и еволуциски сили кои ги движат ваквите драстични варијации во големината на геномите не се доволно јасни.

Заради согледување на разноликоста, ќе бидат претставени податоците за најмалите и најголемите геноми на основните таксономски категории организми.

## Најмали прокариотски и еукариотски геноми

Според досегашните сознанија, **најмал прокариотски геном** поседува симбиотската бактерија *Hodgkinia cicadicola* (*Proteobacteria, Rhizobiales*) која може да живее и да се размножува исклучиво во специјализирани клетки (бактериоцити) кои формираат посебни органи-бактериоми во телото на определени инсекти од редот *Hemiptera* (фамилија *Cicadidae*). Минијатурниот геном со должина од само 144 килобазни пара и со пресметани 169 гена, ја ограничува оваа бактерија да егзистира во форма на интрацелуларен организам кој функционира како еден вид органела. Имено, облигатната ендосимбиоза со цикадните инсекти се одвива двонасочно: живејќи и интрацелуларно, бактеријата ги синтетизира неопходните аминокиселини и други нутритивни кои недостасуваат кај инсектите, а обратно, тие им обезбедуваат неопходно количество на јаглехидрати кои во изобилство ги конзумираат цицајќи ги корените на растенијата. Во текот на еволуцијата, ендосимбионтскиот однос со својот домаќин предизвикал *H. cicadicola* да изгуби најголем број од гените кои се неопходни за самостоен живот на останатите прокариоти, стекнувајќи го досега нај-



малиот клеточен геном. Интересен податок е што деминутивниот геном на, исто така ендосимбионтската бактерија, *Carsonella ruddii* има најниска вредност на GC% (само 16,5 %) од сите досега познати организми.

**Најмалиот еукариотски геном**, засега, е утврден кај карнивортното цветно растение *Genlisea margaretae* (фамилија *Lentibulariaceae*) и изнесува 63,4 мегабази, а меѓу **царството на животните**, кај нематодата *Pratylenchus coffeae* (која е патогена за некои растенија) и има должина од само 20 мегабази. Од **вертебралните организми**, најмал и најкомпактен геном има слатководната риба-балон *Tetraodon nigroviridis* со 384 мегабази. Геномот на оваа риба има и најмалку интронски и репетитивни секвенци, иако има сличен број на гени како и кај преостанатите вертебрати. Овој вид е во истиот род како и организмот-модел: риба-балон (*Fugu rubripes*, фам. *Tetraodontidae*). Интересно е што од наједноставните хордати, морскиот организам *Oikopleura dioica* (род *Tunicata*, класа *Appendicularia*) има најмал геном (само 65 мегабази и пресметан број од околу 15 000 гени) со мал број на интрони и интергенски секвенци. Инаку, оваа вредност е типична за инвертебралните организми. Најзачудувачко е сознанието дека кај *O. dioica*, некои гени се организирани во полицистронски структури кои се транскрибираат непрекинато, слично на бактериските оперони. Досега, кај еукариотите, ваков исклучок (понекаде наречен транс-сплајсинг) е најден само кај определени нематоди. Интересно е и што, според зоолозите, *O. dioica* има уникатна аномалија: иако основниот план на градбата на телото (т.н. *bauplan*) одговара на хордатен организам, сепак не ги следи хордатните механизми на ембриогенеза поради губење на сигналните патишта посредувани со ретиноидна киселина. Од ембриолошки аспект интересно е и што *hox* гените кај овој организам се расфрлени на 9 локации во геномот, за разлика од останатите хордатни организми кај кои се групирани еден по друг.

## Најголеми прокариотски и еукариотски геноми

Според најновите податоци, **најголемиот прокариотски геном** (14,7 мегабази) е најден кај еден сој од бактеријата *Sorangium cellulosum* (*Mycobacteria*).

**Најголем растителен геном** има цветното растение *Paris japonica* (од редот *Liliales*) со големина од 150 гигабази. Но, оваа вредност не е утврдена со модерни молекуларни методи, туку е пресметана според биохемиски утврдената просечна концентрација на DNA во поединечна клетка (во случајов: 152,23 pg), па, не е општо прифатена како точна. Се претпоставува дека ова растение е октаплоид, а можеби и алополиплоид (полиплоид кој настанал од различни видови).

Геномот на слатководниот амебоиден организам *Polychaos dubium* (порано класифициран како *Ameoba dubia*) има должина од дури 670 гигабази што е **најголем геном воопшто**. Заради споредба, тој е околу 200 пати поголем од човековиот геном. Од истите методолошки причини кои се погоре спомнати, за точноста и нао ваа пресметана вредност постојат контрадикторни мислења. Рибата-леопард со бели дробови *Protopterus aethiopicus* (класа *Sarcopterygii*, супкласа *Dipnoi*) има **најголем вертебрален геном** со околу 130 гигабази. И за оваа вредност, која е пресметана, а не прецизно утврдена, постојат спротивставени ставови.

Досега се извршени голем број истражувања насочени кон споредување на геномите на организмите-модел во контекст на генските функции.

## 16.11 Еволуција на гените и генски фамилии

Околу половина од сите еукариотски гени коишто кодираат протеини се присутни само во по една копија во хаплоидниот геном. Преостанатите гени се застапени во поголем број копии во геномите на вишите еукариоти. Утврдено е дека во близина на функционалниот, „вистински“ ген, често се наоѓаат нецелосни, нефункционални копии (дупликати) од соодветен ген, и се наречени **псевдогени**. Се претпоставува дека овие псевдогени настанале поради неправилности при хромозомскиот кросинг-овер за време на мејозата или поради дејствување на подвижните елементи - транспозоните. Кај други еукариотски организми, геномот содржи сосем малку изменети дупликати на функционалните гени. Дека псевдодегите не се реткост во геномите може да послужи примерот со податоците за гените за рибозомските RNA-молекули (rRNA) во хуманиот геном. Имено, досега се најдени 80 гени за rRNA и повеќе од 2000 псевдогени слични на нив.

Група на дуплицирани или функционално поврзани гени се нарекува **генска фамилија**. Некои генски фамилии какви што се гените кои ги кодираат глобините (хемоглобините и миоглобинот), содржат само неколку членови; други фамилии какви што се гените што ги кодираат имуноглобулините (антителата), имаат стотици членови, па, се нарекуваат и **генски суперфамилии**. DNA-секвенците на генските фамилии се разликуваат една од друга во различен обем.

Сè додека еден ген ја задржува оригиналната DNA-секвенца и следствено го кодира соодветниот протеин, другите гени можат да мутираат помалку или повеќе, но, можат и воопшто да не мутираат. Се верува дека токму вишокот на генски копии е особено важен за молекуларната еволуција: ако случајно мутираниот ген е корисен, тој може да биде позитивно селектиран во следните генерации. Спротивно, ако генот целосно ја загуби функцијата (т.е. ако стане псевдоген), функционалната копија сè уште постои во геномот и ја врши својата улога. Се претпоставува дека ваквата мултипликација на гените и мутирањето на дел од копиите е најважниот еволуциски механизам за создавање на нови гени. Имено, со мутациите и под еволуцискиот селективен притисок, некои генски копии и псевдогени можат да добијат нови функции, кои постепено можат да станат важни за организмот.

## Еволуција на глобинските гени

Како што е претходно објаснето, хемоглобинот е тетрамер составен од четири глобински полипептиди. Карактеристична организација на глобинските гени се чини дека има релативно висока еволуциска конзервираност кај сите досега испитувани вертебрални организми, од рибите, па, сè до цицачите. Имено, секој од овие гени е содржи по три егзони и два интрони. Интересно е што голем број гени кои кодираат определени глобински полипептиди, какви што се: растителниот протеин легхемоглобин и мускулниот протеин миоглобин, содржат по четири егзони и три интрони. Се претпоставува дека овие гени се анцестрална форма на глобинскиот ген и дека рецентните глобински полипептиди еволуирале од анцестралните форма како резултат на спојувањето на два од глобинските егзони пред околу 800 милиони години. Утврдено е дека голем број на примитивни риби имаат само по еден глобинскиот

ген, што укажува дека овие риби дивергирале од другите рбетници пред да се случи првата дупликација на глобинскиот ген. По оваа дупликација, која е пресметано дека се случила пред околу 500 милиони години, двете копии дивергирале преку мутации формирајќи две различни глобински типови: еден  $\alpha$ - и еден  $\beta$ -тип, кој се наоѓаат на истиот хромозом. Токму вака се поставени овие два гени кај некои современи видови: кај водоземецот *Xenopus* и кај рибата-зебра. Се смета со натамошната еволуција, со процесот на реаранжирање (преуредување) на гените,  $\alpha$ - и  $\beta$ -типовите се преместиле на одделни хромозоми. Секој ген тогаш станал подложен на натамошни удвојувања и дивергенција, создавајќи ја структурата на глобински гени која постои и денес кај луѓето.

Преку примерот за еволуцијата на глобинските гени кај рбетниците може да послужи како пример за тоа како генската дупликација може да создаде генска фамилија чии индивидуални членови кодираат продукти со специјализирани функции, какви што се ембрионскиот, фетусниот, и адултните форми на глобинот.

Интересно е што при DNA-секвенционирањето на глобинскиот генски кластер е откриено дека секвенците на поединечните „гени“ се хомологни со оние на функционалниот глобински ген, но, имаат акумулирано доволно мутации кои ги прават нефункционални, односно псевдогени. Друг интересен момент кој произлегува од анализата на секвенцата на двата глобински кластери на човечките хромозоми е многу високиот процент на кодирачки секвенци, наспроти ниската содржина на некодирачка DNA (интрони и интергенски раздвојувачи).

## Генски стебла

Глобинската генска фамилија е меѓу најдобро проучуваните примери на хомологни гени. Од нуклеотидната секвенца може да се предвиди и аминокиселинската секвенца на соодветниот протеински продукт. Споредбата на DNA (и на аминокиселинските) секвенци меѓу различните гени од глобинската фамилија сугерира дека, во текот на еволуцијата, глобините се создале преку генска дупликација. Споредбата и анализата на аминокиселинскиот редослед на глобините може да се користи и за пресметување на временските периоди во кои еволуциски дивергирале различните глобини. Колку е поголема разликата во нуклеотидната (и аминокиселинската) секвенца меѓу двата глобина, толку е постар и нивниот заеднички анцестор (молекул-предок).

DNA-секвенците кои потекнуваат од заедничка анцестрална секвенца се нарекуваат **хомологни**. Терминолошки попрецизно, хомологните секвенци кај два различни вида се нарекуваат **ортологни**, додека **паралогни** се тие кај еден ист вид.

Генските стебла се изработуваат со користење компјутерска анализа на експерименталните податоци добиени со DNA или со аминокиселинско секвенционирање, при што се применуваат посебни биоинформатички алгоритми развиени за таа цел.

Пример за филогенетско стебло е даден во **Главата 23**: Примена на биоинформатиката во молекуларната биологија и генетиката.

## 16.12 Митохондриски и хлоропластни геноми

Митохондриите и хлоропластите имаат сопствени циркуларни геноми кои се далеку помали во споредба со јадрениот геном, и кодираат мал број протеини. Од генетски и од функционален аспект, овие органели, сепак, се зависни од јадрениот геном. Имено, поголемиот дел од протеините кои се неопходни за структурните, биохемиските и физиолошките функции на митохондриите и хлоропластите се кодирани од соодветни гени лоцирани во јадрениот геном. По транскрипцијата во јадро и по транслацијата во цитоплазмата, овие протеини се внесуваат во митохондриите или хлоропластите преку посебни транспортни протеински комплекси кои се лоцирани во нивните мембрани.

Основните разлики и сличности на митохондрискиот и на хлоропластниот геном со тие на прокариотските и на еукариотските јадрени геноми се прикажани во табелата 16-6.

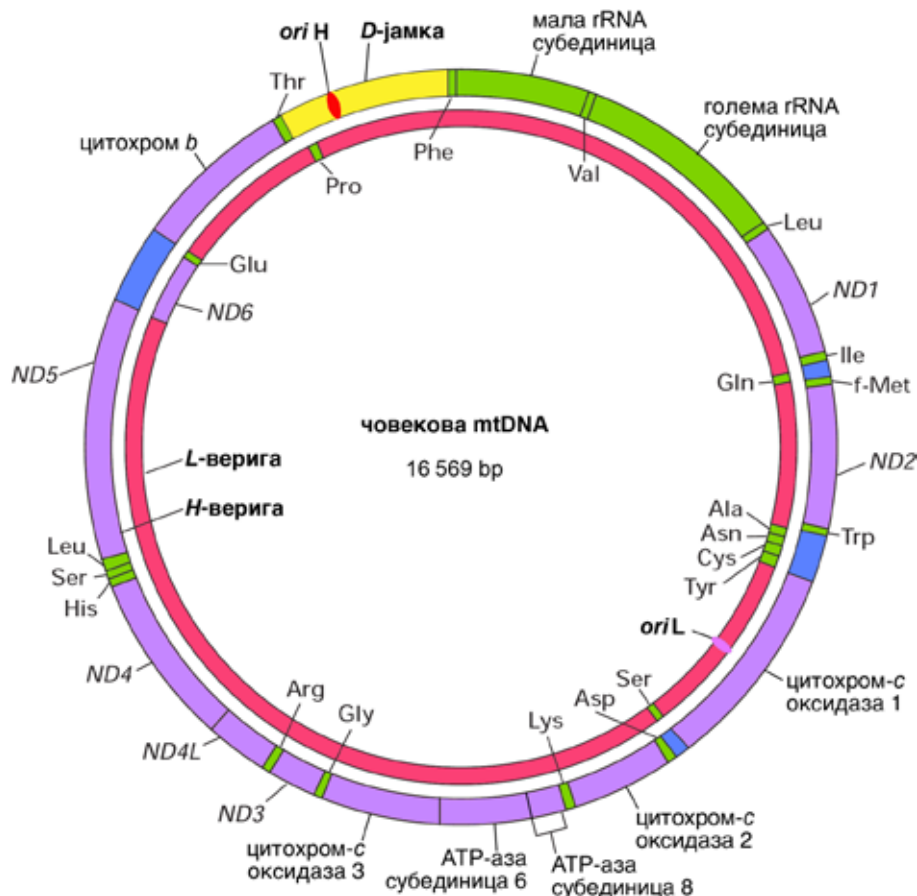
карактеристика	еукариотски геном	еубактериски геном	митохондриски геном	хлоропластен геном
вериги во DNA-молекулот	двоверижна	двоверижна	двоверижна	двоверижна
форма на DNA	линеарна	циркуларна	циркуларна	циркуларна
должина	голема	мала	мала	мала
хистонски протеини	има	нема	нема	нема
број на DNA молекули во поединечен геном	поголем број (по една во секој хромозом)	по една	по една (кај животните); по неколку (кај некои растенија)	по една
интрони во примарниот транскрипт (mRNA)	често	нема	нема	нема
интрони од група I	има	има	има	има
интрони од група II	нема	има	има	има
полицистронски mRNA молекули	исклучително ретки	чести	има	чести
5'-капа на mRNA молекулите	има	нема	нема	нема
3'-поли(A) опашка на mRNA молекулите	има	нема	само кај животните	нема
Шајн-Далгарнова секвенца	нема	има	ретко	само кај некои
отстапки од универзалниот генетски код	ретко	ретко	има	нема

Се претпоставува дека геномите на митохондриите и на хлоропластите потекнуваат од бактериски геноми кои останале „заробени“ во текот на еволуцијата. Имено, според т.н. ендосимбиотска теорија за потеклото на митохондриите и хлоропластите, овие органели се создале од бактериски клетки кои биле внесени во еу-

кариотските клетки преку ендоцитоза, по што, нивниот однос постепено еволуирал во симбиотски. Со текот на еоните, митохондрискиот геном постепено се редуцирал, а дел од гените се „преселиле“ во јадрениот геном. Во прилог на оваа теорија е забележителната сличност на DNA-молекулите од овие две органели со бактеријската DNA, како и определени сличности во однос на механизмите на репликација, транскрипција и транслација.

## Митохондриски геноми

Митохондрискиот геном е составен од двоверижна циркуларна DNA (**митохондриска DNA**, или скратено **mtDNA**) со должина од околу 16 kb, а содржи околу 37 гени. Кај човекот, таа има должина од 16 569 базни парови и кодира 13 протеински молекули, 22 tRNA и две rRNA-молекули (слика 16-14). Сепак, митохондрискиот про-



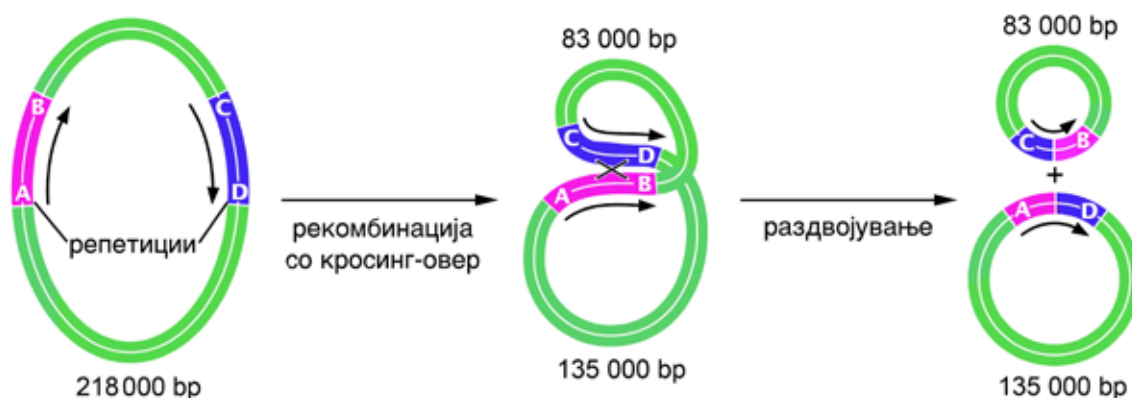
**Слика 16-14:** Шема на човековиот митохондриски геном. Поголемиот број од гените се кодирани од *H*-веригата. Се забележува присуство на одделни извори на репликацијата (*ori H* и *ori L*) за секоја од двете комплементарни вериги. Гените кои кодираат функционални RNA-молекули (tRNA и rRNA), се исцртани со зелена боја, а кои кодираат протеинските производи, со виолетова боја.

теом (збирот на сите протеини кои се наоѓаат во митохондријата) изнесува повеќе од 400 различни протеински молекули. Причината за тоа е што најголем број од митохондриските протеини се кодирани од јадрениот геном, а по нивната синтеза во рибозомите, тие се транспортираат од цитоплазмата и се внесуваат во митохондриите.

Двете комплементарни DNA-вериги се разликуваат по содржината на гуанинските нуклеотиди, во однос на цитозинските. Поради разликите во Сведберговите (*S*) вредности при ултрацентрифугирање, едната од двете комплементарни вериги е означена како **H** (од англ. *heavy* - тешка) и содржи поголем удел на гуанин, додека другата верига е наречена **L** (од англ. *light* - лесна) верига и содржи поголем удел на цитозински нуклеотиди. Интересно е што повеќето гени се кодирани од полесната верига.

За разлика од геномската DNA во еукариотското јадро, митохондриската DNA не е поврзана со хистонски, ниту со други протеини. Покрај тоа, геномот на митохондриите е мошне компактен, односно не содржи интрони и речиси нема некодирачки интергенски секвенци. Исклучок е регионот на *D*-јамката, каде што се лоцирани промоторите. Имено, митохондрискиот геном содржи само по два промотора, па, при транскрипцијата се синтетизираат два долги прекурзорни транскрипти од кои, со пресекување, се создаваат поединечните mRNA, tRNA и rRNA молекули. Покрај тоа, човековата митохондриска DNA речиси и не содржи репетитивни секвенци.

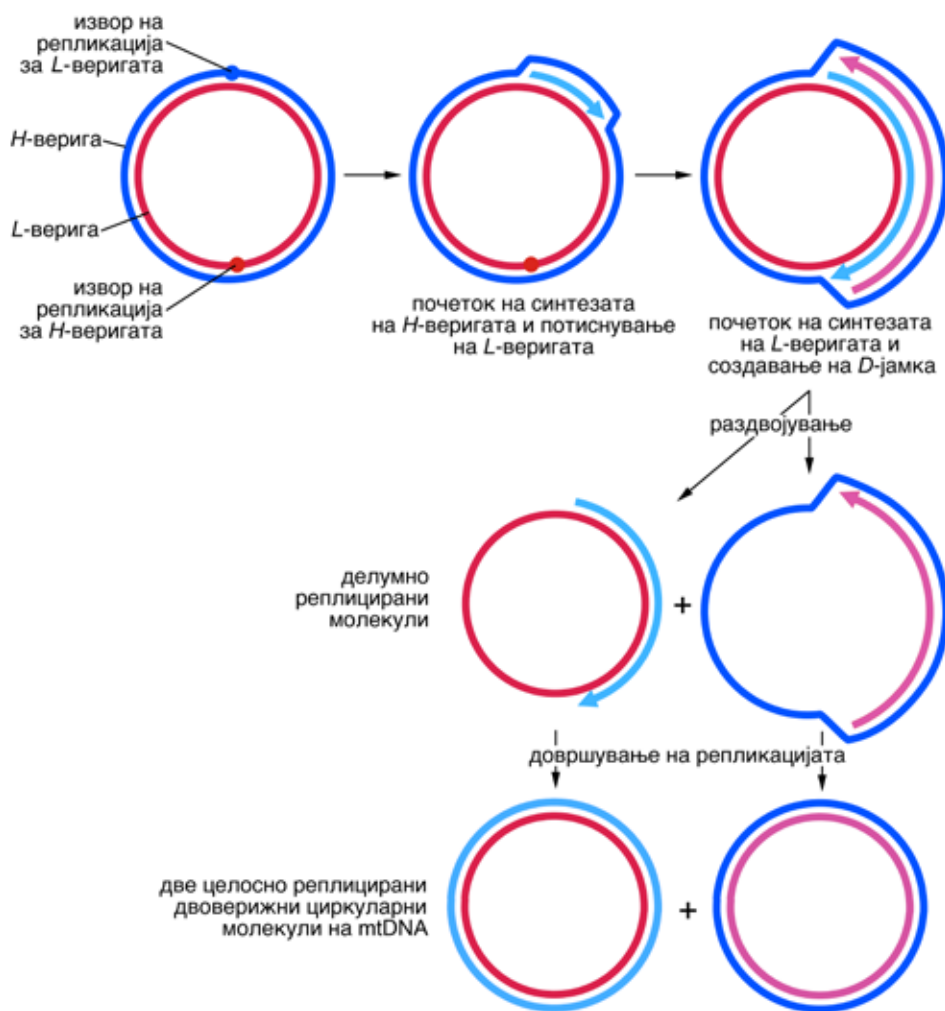
Најкомплексни и најдолги се геномите на митохондриите кај цветните растенија (ангиосперми), каде должината на митохондриската DNA се движи во опсег од 186 000, па, сè до 2 400 000 базни парови. Постојат значителни разлики во должината на митохондриската DNA дури и кај еволуциски блиските растителни видови. Се смета дека таквите разлики настануваат со интрамолекуларни рекомбинации. Во растителниот митохондриски геном се наоѓаат директни репетиции меѓу кои може да се извршува хомологна рекомбинација (кросинг-овер) со што се создаваат разни комбинации на помали циркуларни геноми (**слика 16-15**).



**Слика 16-15:** Хомологна рекомбинација меѓу директните репетиции кои доведуваат до варијации на должината на митохондриските геноми кај некои виши растенија.

## Репликација на митохондриската DNA

Репликацијата на митохондрискиот геном се одвива според единствен молекуларен механизам кој се разликува од трите претходно опишани модели: од класичниот модел за репликација (кај линеарните хромозоми), од тета-моделот (кај бактериските хромозоми) и од ротирачкиот модел (кај плазмидите и некои вируси). Имено, кај митохондриската DNA, секоја од двете комплементарни вериги содржи свој сопствен извор на репликација (*ori H* и *ori L*), а и двата се наоѓаат оддалечени еден од друг. Синтезата на едната верига започнува порано и доведува до истиснување (англ. *displacement*) на *H*-верига од комплементарната *L*-верига. Со текот на синтезата, ова истиснување создава структура која наликува на латинската буква *D*. Поради тоа, како и според англискиот израз за истиснување, репликацијата е означена како **модел на *D*-јамка**, ***D*-модел** или модел на истиснување на веригата (слика 16-16).



**Слика 16-16:** Репликација на митохондрискиот геном според моделот на *D*-јамка, наречен така поради изгледот на структурата која се создава во текот на процесот.



Синтезата, и тоа засебно за секоја од двете комплементарни вериги, ја извршува специјализираната **DNA-полимераза  $\gamma$** . Со оглед на тоа што митохондриската DNA во живите клетки е суперспирална, текот на репликацијата се неопходни и DNA-топоизомеразата, како и хеликазата. Важно е и што репликацијата на митохондриската DNA не се одвива синхронизирано со репликацијата на јадрениот геном.

## Хлоропластни геноми

Слично на митохондриите, и хлоропластите имаат своја сопствена **хлоропластна DNA (cpDNA)**, па, фенотипските карактеристики кои се кодирани од гените сместени на неа се причина за т.н. цитоплазматско наследување. Хлоропластите имаат многу подолга DNA и содржат поголем број гени отколку митохондриите. Должината на двоверижни DNA-молекули кои ги сочинуваат хлоропластните геноми значително варира меѓу растителните видови во опсег од 80 000 до 600 000 базни парови. И покрај обемните истражувања, сè уште не е јасно дали најголемиот дел од хлоропластниот геном егзистира во циркуларна или во линеарна форма. Овие молекули се суперспирални во голема мера, а не се поврзани со хистонски протеини. Во хлоропластните геноми на често испитуваните растителни организми просечно се наоѓаат по 4 гена за rRNA, по 30 - 35 за tRNA, како и гени кои кодираат поголем број рибозомски протеини, вклучувајќи ги и тие што учествуваат во фотосинтезата. Еден од најзастапените и најпроучуваните хлоропластни протеини е ензимот **рибулоза-1-,5-бифосфат карбоксилаза-оксигеназа (RuBisCO)**, кој учествува во фиксацијата на јаглеродот при фотосинтезата. Земајќи во предвид дека уделот на овој ензим зазема околу 50% од вкупното количество протеини кај растенијата, како и претпоставената растителна маса, пресметано е дека тоа е најобемно застапениот протеин на планетата Земја. Функционалниот протеин RuBisCO е составен од 16 субединици (осум идентични големи субединици и осум идентични мали), а интересно е што големата субединица е кодирана од хлоропластниот геном, а малата од јадрениот.

Како и во митохондриите, во секој хлоропласт се наоѓаат поголем број поединечни DNA-молекули. Со оглед на тоа што соодветните растителни клетки содржат повеќе хлоропласти, типичната растителна клетка има неколку илјадници примероци на хлоропластна DNA. Анализите на податоците добиени со секвенционирање на хлоропластните геноми од разни растителни видови укажуваат дека хлоропластната DNA има голем број сличности со прокариотските геноми, особено со цијанобактериите.

Молекуларните механизми на репликација на хлоропластниот геном се помалку проучени, пред сè поради континуираната дебата дали хлоропластниот геном е циркуларен или линеарен. Постојат докази дека репликацијата започнува со две *D*-јамки кои се движат бидирекциски, што наликува на тета-структурата. По првичниот циклус на репликација, синтезата може да продолжи да се одвива и со ротирачкиот механизам. Поновите истражувања укажуваат на тоа дека репликацијата на хлоропластната DNA вклучува рекомбинациски процеси.

Од друга страна, транскрипцијата и транслацијата на хлоропластната DNA се слични на тие кај бактериите, вклучувајќи ја и генската организацијата во единици слични на бактериските оперони. Сепак, кодоните не отстапуваат од универзалниот генетски код.



# ГЕНЕТИКА НА ИМУНОЛОШКИОТ СИСТЕМ

## Глава 17

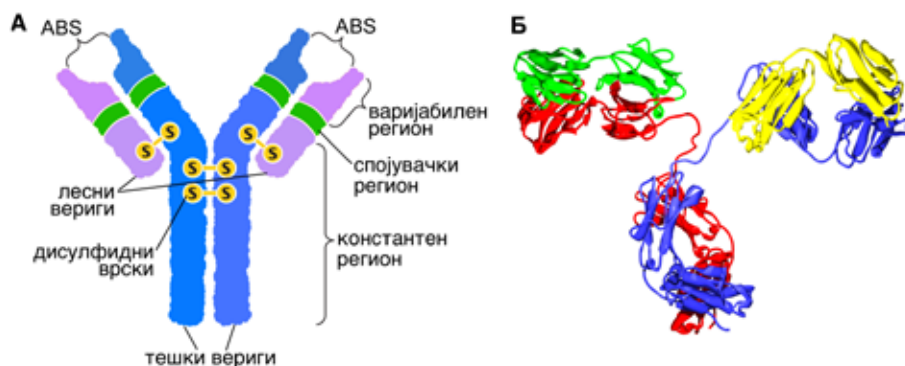
**И**мунолошкиот систем ги штити организмите од инфекции и од туѓи супстанции кои можат да навлезат во крвта или ткивата. **Антигените** се дефинирани како молекули, обично протеини, кои можат да предизвикуваат имун одговор. Антигените можат да бидат составни делови на микробиолошките агенси: бактериите, вирусите, габичките, но, често се и токсини или други супстанции кои се туѓи за индивидуата. Имунолошкиот систем може успешно да ги елиминира туѓите молекули или инфективните агенси преку мошне прецизно препознавање на нивните антигени.

Препознавањето на антигенот и неговата неутрализација или елиминација се врши од страна на клетките на **хуморалниот** или на **клеточниот имунитет како** две основни компоненти на имунолошкиот систем кои тесно соработуваат, но, суштински, имаат различни механизми на дејствување.

Главните извршители на хуморалниот имунолошки одговор кај ѝрбетниците се **антителата**, наречени и **имуноглобулини (Ig)**, од англ.: immunoglobulins) кои специфично ги препознаваат антигените. Антителата се sintetизираат од **В-лимфоцитите**, често наречени и **В-клетки**. Некои од имуноглобулинските молекули се наоѓаат на површината на овие клетки, а некои циркулираат низ крвта и определени телесни течности. Од друга страна, **Т-лимфоцитите**, т.е. **Т-клетките**, се главните извршители на клеточниот имунитет и директно ги препознаваат и се врзуваат со антигените присутни на површината на некои клетки од имуниот систем или антигените на инфицираните клетки. Слично како и В-клетките, секоја зрела Т-клетка поседува рецептори кои имаат генетски детерминирана специфичност кон еден тип на антиген. **Т-клеточните рецептори** се наоѓаат на клеточната мембрана и функционираат како површински рецептори за соодветниот антиген.

## 17.1 Основна структура на имуноглобулините и на Т-клеточните рецептори

Во основа, имуноглобулинскиот молекул е тетрамерен протеин составен од четири полипептиди: од две идентични **лесни вериги** и две идентични **тешки вериги** кои формираат карактеристична структура која наликува на латинската буква *Y* (слика 17-1). Двете тешки вериги меѓусебно се ковалентно поврзани со дисулфидни врски. Секоја од лесните вериги е поврзана со тешката полипептидна верига исто така со дисулфидни врски. Кај цицачите, лесните вериги можат да бидат или од типот: **капа (κ)** или од **ламбда (λ)**.

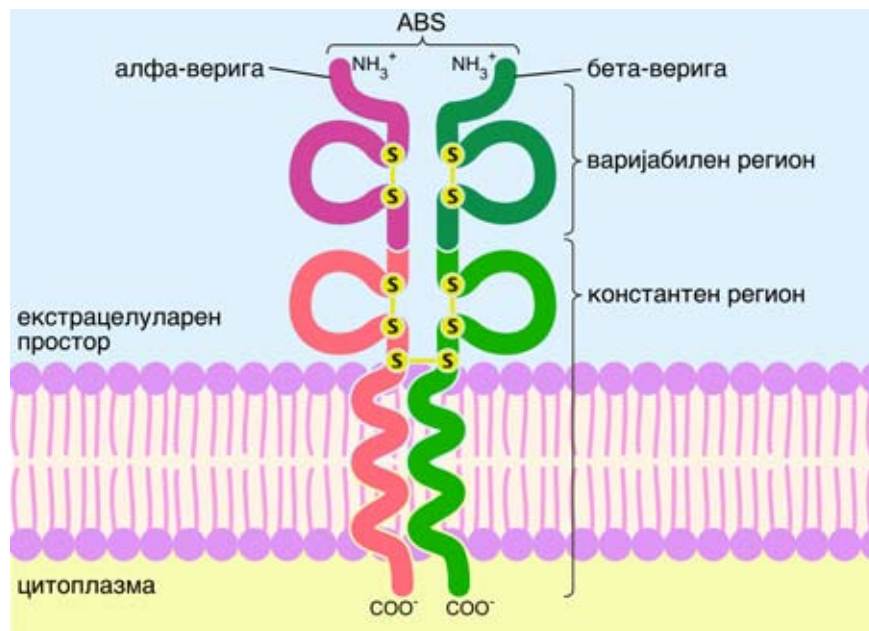


**Слика 17-1:** Структура на молекулот на имуноглобулин G. **A:** Шематски приказ на составните делови на имуноглобулинскиот молекул (антитело). ABS: место за врзување на антигенот. **B:** Компјутерски создадена слика на тридимензионалната структура на имуноглобулинот G. Двете тешки вериги се означени со сина и со црвена боја, додека двете лесни вериги со зелена и со жолта боја. Сликата **B** е во јавен домен на интернет и е достапна на [www.wikimedia.org](http://www.wikimedia.org).

Голем дел од аминокиселинската секвенца на лесните и на тешките вериги е слична или идентична меѓу разните имуноглобулински молекули, па, се нарекува **константен регион**. Наспроти тоа, на секој од amino-краевите на тешките и на лесните полипептидни вериги се наоѓа по еден **варијабилен регион** чија аминокиселинска секвенца се разликува од еден до друг имуноглобулински молекул. Меѓу константниот и варијабилниот регион се наоѓа кус **спојувачки регион**. Варијабилните региони од една лесна и од една тешка верига го создаваат **местото за врзување со антигенот (ABS)**, од англ.: *antigen-binding site*). Имено, препознавањето на антигенот и врзувањето со него се одвива по пат на мошне специфично, но, силно нековалентно врзување како резултат на молекуларната комплементарност на бочните групи од аминокиселинските остатоци кои ја градат структурата на ABS, од една страна, и, антигенската структура, од друга страна.

Слично како и В-клетките, секоја зрела Т-клетка поседува рецептори за антигенот кои имаат генетски детерминирана специфичност кон еден тип на антиген. Т-клеточните рецептори (**TCR**, од англ.: *T-cell receptor*) се структурно слични на имуноглобулините и се наоѓаат на клеточната мембрана функционирајќи како

површински рецептори. Повеќето Т-клеточни рецептори се составени од по една алфа- и една бета-полипептидна верига поврзани со дисулфидни врски (слика 17-2). Карбоксилниот крај од секоја верига е укотвен во клеточната мембрана, а спротивниот, аминокрај е екстрацелуларен и го препознава и врзува антигенот. Слично како и кај имуноглобулинските молекули, секоја од двете вериги од Т-клеточниот рецептор има **константен регион** и **варијабилен регион**. Местото за врзување со антигенот (ABS) го создаваат варијабилните региони од алфа- и од бета-полипептидната верига.



**Слика 17-2:** Шематска структура на рецепторот на Т-клетките (TCR). ABS: место за врзување на антигенот.

## 17.2 Генетски основи на создавањето на разновидноста на антителата и на Т-клеточниот рецептор

Едно од најзабележителните својства на имунолошкиот систем е неговата способност да препознае голем број на антигени, дури и такви, со кои организмот претходно не се соочил. На пример, се смета дека секој човечка индивидуа е способна за создавање на стотици милиони различни молекули на антитела, а секое антитело е способно да препознае различен антиген. Слично се однесува и на Т-клеточните рецептори, односно постојат енормен број на Т-клетки со различни Т-клеточни рецептори способни да препознаат ист толкав број на различни антигени. Со оглед на тоа што антителата и Т-клеточните рецептори се градени од полипептиди, нивните аминокиселински мора да бидат кодирани од посебни гени во хуманиот геном. Но, хипотезата заснована на таквата пресметка е невозможна знаејќи дека бројот на гени е далеку помал: само 20 000 до 30 000. Дилемата е уште поголема ако се земе

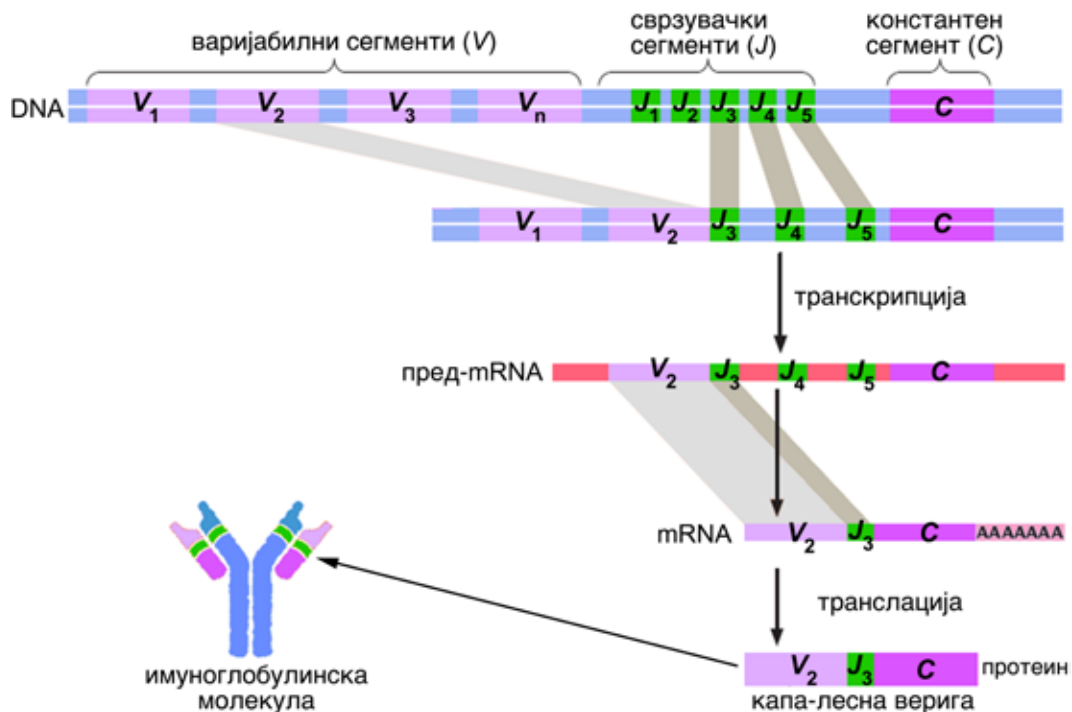
во предвид дека хаплоидниот човеков геном има вкупна должина од  $3,4 \times 10^9$  базни парови во кои теоретски не можат да се содржат нуклеотидните секвенци потребни за кодирање на сите молекули имуноглобулини и на Т-клеточни рецептори.

Еволуциското решение на оваа парадоксална загатка која со децении ги окупираше генетичарите и имунолозите, лежи во фактот дека прекурзорните гени кои ги кодираат антителата се составени од сегменти. Постојат голем број на копии од секој тип на сегмент, а меѓу нив има мали разлики во секвенците. При созревањето на лимфоцитите, сегментите се спојуваат заедно создавајќи функционален имуноглобулински ген. Определена копија од секој сегмент се спојува со друг сегмент по пат на случаен избор, а поради тоа што постојат повеќе копии од секој тип, постојат многу можни комбинации на сегментите. Оттаму, ограничен број на сегменти можат да кодираат полипептиди со различна аминокиселинска секвенца, како резултат на речиси неограничениот број на комбинации од сегментите. Тоа резултира со можноста за кодирање огромна разновидност на антителата кои се способни да препознаат најразновидни антигени.

Капа и ламбда вериригите се кодирани од посебни гени поставени на различни хромозоми. Секој ген се содржи три типа на сегменти: **варијабилни (V)**, **сврзувачки сегменти (J)** и **константен сегмент (C)**. Секвенците на V сегментите го кодираат поголемиот дел од променливиот регион на лесните вериги, сегментот C го кодира константниот регион од веригата, и J-сегментите содржат кус низ на нуклеотиди кои се користат при поврзувањето на сегментите V и C. Бројот на V, J и C-сегменти се разликува меѓу видовите вертебрални организми. Во човечкиот капа ген, постојат 30-35 различни функционални генски сегменти V, 5 различни сегменти J и еден C поставени еден по друг на истиот хромозом. Овој низ на сегменти е присутен во геномот на половите клетки, кои по оплодувањето ја создаваат ембрионската линија. Секој од V-генските сегменти има должина од околу 400 базни парови, а се одвоени еден од друг со DNA-секвенца долга околу 7000 базни парови. Генските сегменти J имаат должина од околу 30 базни парови и заедно се протегаат во вкупна должина од околу 1400 базни парови. Во текот на ембриогенезата, незрелите лимфоцити ги содржат сите генски сегменти V и J наследени од двете гамети. Подоцна, при созревањето на лимфоцитите, се случува интересен феномен кој е означен како **соматска рекомбинација** и со кој се создаваат разни комбинации од сегментите (во овој пример во геномот за лесните имуноглобулински вериги), а со тоа и се овозможува диверзитетот на антитела во организмот.

Процесот со кој се создава еден капа-лесниот полипептид е прикажан на **сликата 17-3**. Имено, соматските рекомбинации во рамките на еден хромозом овозможуваат поместување на еден од генските сегменти V непосредно до еден од сегментите J. Рекомбинацијата го поставува сегментот  $V_1$  (првиот од околу 35 различни V-генски сегменти) до  $J_3$  (третиот од петте J-генски сегменти), додека интервенирачките сегменти се губат. По завршувањето на соматската рекомбинација, овој регион од DNA-молекулот на В-клетката се транскрибира во пред-mRNA, која содржи еден V-генски сегмент и неколку J-сегменти, по кои следи C-генскиот сегмент. Со процесирањето на пред-mRNA молекулот се создава зрела mRNA која содржи секвенци од по еден сегмент V, J, и C. Оваа mRNA се користи за транслација, т.е. за синтеза на функционални лесни ланци од кои се создаваат имуноглобулинските молекули. На овој начин, секоја зрела човечка В-клетка синтетизира уникатен

вид на капа-лесна верига, а различните В-клетки произведуваат малку поразлични капа вериги, во зависност од комбинацијата на сегментите *V* и *J* кои се споени заедно.



**Слика 17-3:** Шематски приказ на процесот на соматска рекомбинација со кој се синтетизира капа-лесната верига. Овој полипептид понатаму станува составен дел од молекулот на имуноглобулинот (антителото). Синтезата на имуноглобулинските ламбда-лесни вериги, како и на тешките вериги, се објаснети во текстот.

Генот што ја кодира ламбда-лесната верига е организиран на сличен начин, но, се разликува од генот капа по бројот на копии од различните генски сегменти. Процесот на соматските рекомбинации се одвива меѓу сегментите на истиот начин како и кај капа генот, создавајќи голем број можни комбинации на ламбда-лесни ланци. Генот што ги кодира имуноглобулинските тешки вериги, исто така, содржи сегменти *V*, *J* и *C*, но, овој ген поседува и **сегмент за разновидност (*D*)**. Со тоа се создаваат уште поголем број на комбинации од различни видови на лесни и тешки вериги. Самите соматски рекомбинации се извршуваат од **ензимите RAG1 и RAG2** кои најпрво создаваат двоверижни DNA-прекини кај специфични нуклеотидни секвенци наречени **рекомбинациски сигнални секвенци** кои се наоѓаат бочно на секој од генските сегменти *V*, *D*, *J*, и *C*. Во натамошниот процес учествуваат повеќе DNA-репарациски протеини кои, воспоставувајќи фосфодиестерски врски, ги поврзуваат на краевите на поединечните сегменти.

Покрај соматската рекомбинација, огромната разновидност на антителата дополнително се постигнува и со други механизми. Различни типови лесни вериги потенцијално можат да се комбинираат со разни типови тешки вериги, создавајќи



уникатни функционални имуноглобулински молекули, со што значително се зголемува бројот на можните варијации во антитела. Рекомбинацискиот процес кој ги поврзува генските сегменти *V*, *J*, *D* и *C* во геномот на В-клетките е непрецизен, при што често се делетираат или вметнуваат по неколку случајни нуклеотидни парови на местата на поврзување на рекомбинираните сегменти со што уште повеќе се зголемува варијацијата помеѓу антителата. Ова е основа на т.н. **разновидност на местата на поврзување**.

Третиот механизам за зголемување на имуноглобулинската разновидност е **соматската хипермутација**, процес кој доведува до висока мутациска стапка во гените кои ги кодираат полипептидите во составот на антителата. Овој процес се иницира при деаминирање на цитозинските остатоци, по што ги конвертира во урацилски. Урацилот, пак, се препознава и се заменува од страна на DNA-репарациските механизми кои се склони кон грешки и често го заменуваат со погрешни бази, предизвикувајќи мутации.

Преку процесите на соматска рекомбинација, на разновидноста на местата на поврзување на сегментите, како и со соматската хипермутација, секој В-лимфоцит стекнува уникатен низ на генетски информации кој кодира антитела специфични за определен антиген и кој се разликува од тие во другите лимфоцити.

Гените кои ги кодираат алфа- и бета-веригите од Т-клеточниот рецептор се организирани многу слично како гените кои ги кодираат тешките и лесните имуноглобулински вериги, односно секој ген е составен од сегменти кои се подложени на соматска рекомбинација пред транскрипцијата. Генот за алфа-веригата кај човекот во почетокот се состои од 44 до 46 *V*-генски сегменти, 50 *J*-сегменти, и еден сегмент *C*. Структурата на генот за бета-веригата е слична, освен тоа што содржи и генски сегменти *D*. Алфа и бета-веригите се комбинираат по случаен пат, а учествува и феноменот на спојувачка разновидност. Од друга страна, досега не се најдени експериментални докази за постоење на соматска хипермутација во гените за Т-клеточниот рецептор.

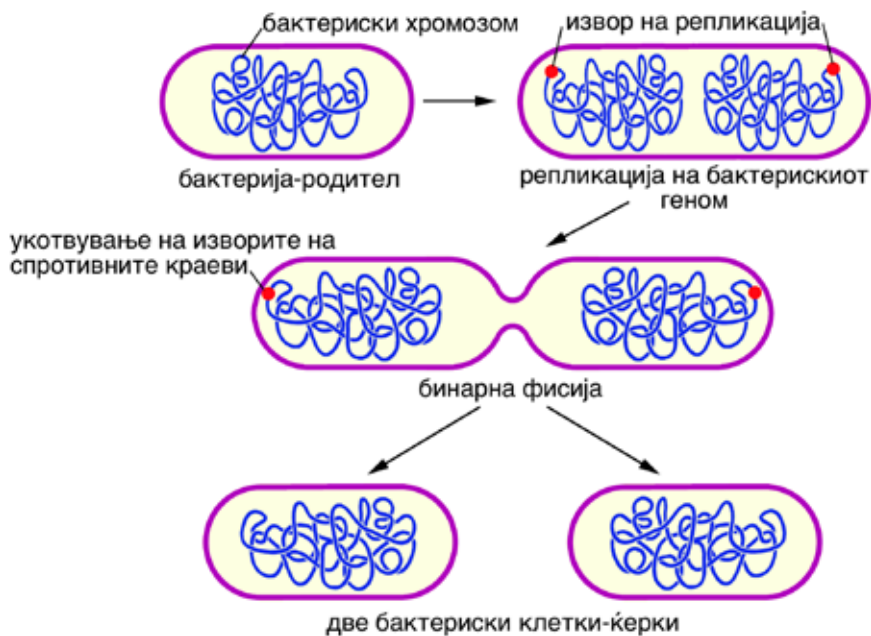
# ГЕНЕТСКИ АСПЕКТИ НА КЛЕТОЧНАТА ДЕЛБА И ЦИКЛУС, РАЗВОЈОТ И ДИФЕРЕНЦИЈАЦИЈАТА

## Глава 18

**К**леточната делба и дифернцијација се есенцијални процеси кои се одвиваат постојано во текот на животот на повеќеклеточните организми. Клеточната делба е неопходна за размножувањето на едноклеточните и за размножувањето, развојот, растот и одржувањето на повеќеклеточните организми.

### 18.1 Клеточна делба

Прокариотските клетки, воопштено, се размножуваат со **проста делба** (т.н. **бинарна фисија**) со што настануваат две клетки-ќерки. Нивниот геном е составен од еден циркуларен хромозом кој, по DNA-репликацијата, се распределува во двете бактериски клетки при нивната делба (**слика 18-1**). Со тоа, двете клетки-ќерки



**Слика 18-1:** Шематски приказ на простата делба кај прокариотските клетки.

наследуваат по една идентична копија на геномот. Процесот е толку брз, што, при оптимални услови, некои бактерии се делат на секои 20 минути, па, од една единствена клетка, за само 24 часа настануваат по неколку милијарди клетки.

За разлика од бактериските клетки, еукариотските се делат со посебна клеточна делба (митоза) која обезбедува софистицирани механизми за пренесување на генетските информации од една клетка во нејзините клетки-потомци. Процесот на делба на еукариотските клетки е дополнително усложнет поради далеку поголемите геноми кои се распределени во повеќе хромозоми.

По исклучок, митозата е вклучена во асексуалното размножување кај некои едноклеточни еукариоти какви што се некои протозои, алги и габи. Сепак, кај најголемиот број еукариоти, репродукцијата е сексуална и овие организми се диплоидни, односно секој од хромозомите е присутен во парови. Кај повеќеклеточните диплоидни еукариотски видови, телесните (соматски) клетки содржат по еден пар (две копии) од секој хромозом, додека нивните полови клетки (гамети) содржат хаплоиден број хромозоми (по еден од секој пар соматски хромозоми).

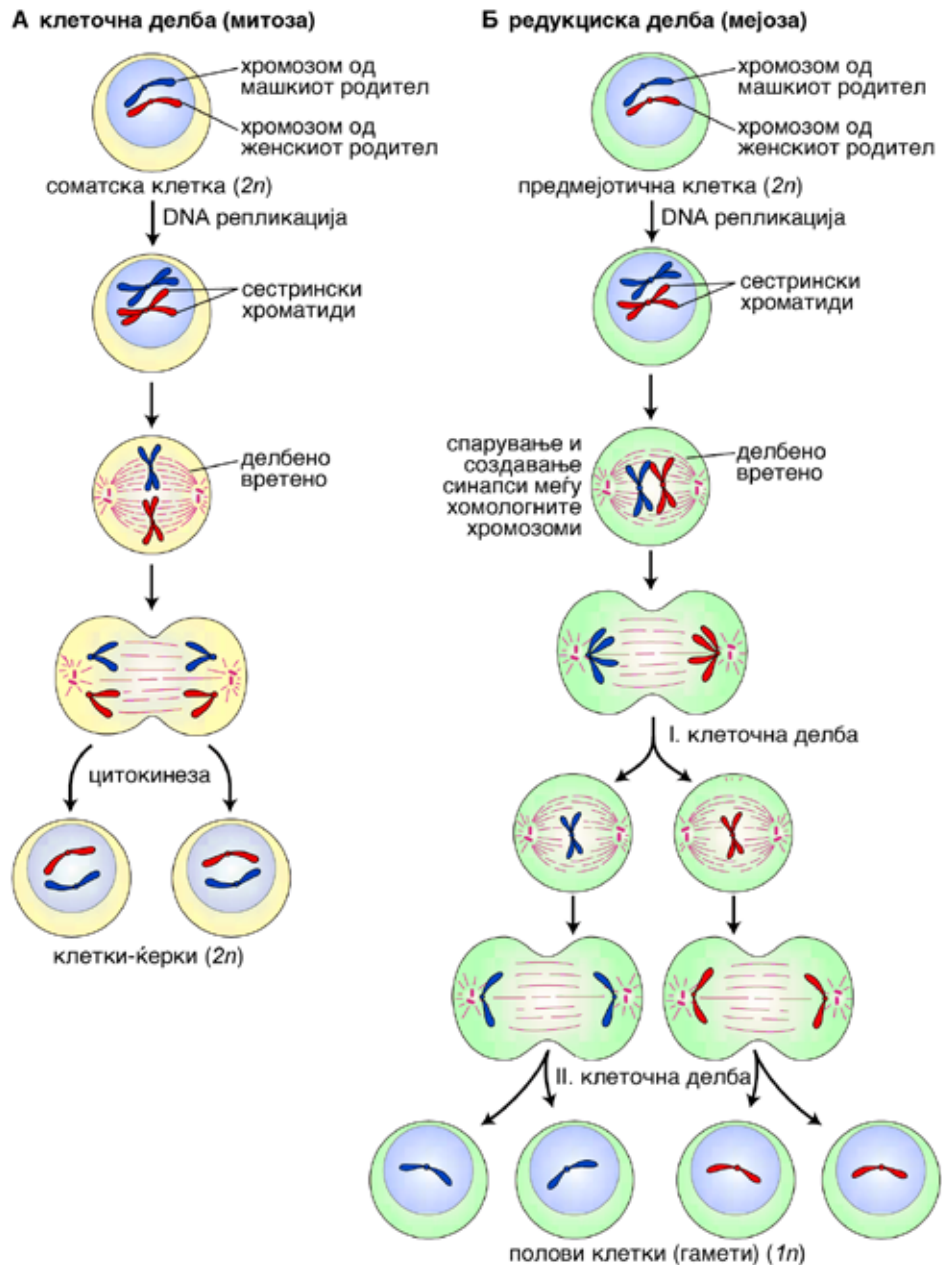
## Митоза и мејоза

Кај диплоидните еукариотски клетки репликацијата на геномот во текот на интерфазата претходи на самата делба на клетката. Со оглед на тоа што секој хромозом е составен од по две, теоретски, идентични сестрински хроматиди, критично е важно секоја од нив да се раздвои и да се распредели во двете клетки-ќерки, со што се обезбедува наследување на идентичниот геном. Иако митозата е континуиран процес, од морфолошки аспект, можат да се забележат неколку фази кои, многу поедноставено, се прикажани на **сликата 18-2, А**.

Во текот на **профазата**, започнува поинтензивно кондензирање на хромозомите и создавање на делбеното вретено. При **прометафаза** настанува разградување на јадрената обвивка (нуклеолема) и прицврстување на кинетохорните микротубули со секоја од сестринските хроматиди.

Основната карактеристика на **метафазата** е порамнување на хромозомите на екваторијалната рамнина (наречена и метафазна плоча). Сестринските хромозоми се одвојуваат во текот на **анафазата** и се движат повлекувани од микротубулите кон центрозоите сместени на спротивните полови од делбеното вретено. Во **телофазата**, секоја од сестринските хроматиди пристигнува на спротивните полови од делбеното вретено, повторно се создава јадрената обвивка и се намалува кондензираноста на хромозомите. Раздвојувањето на цитоплазмата на двете клетки-ќерки (а кај растителните клетки и создавањето клеточен ѕид) се случува при **цитокинезата**. Конечниот резултат на митозата се две клетки-ќерки кои имаат, теоретски, идентичен генетски материјал. При цитокинезата се преполовува и цитоплазмата заедно со клеточните органели, но, засега, не се најдени прецизни механизми кои го регулираат правилното поделување во двете клетки-ќерки кои настануваат по делбата. Оттаму, двете настанати клетки немаат секогаш идентичен број на митохондрии или на рибозоми, на пример.

Во текот на созревањето на половите клетки кај еукариотските организми се одвива специјализирана **редукциска клеточна делба-мејоза**. Двете најважни карак-



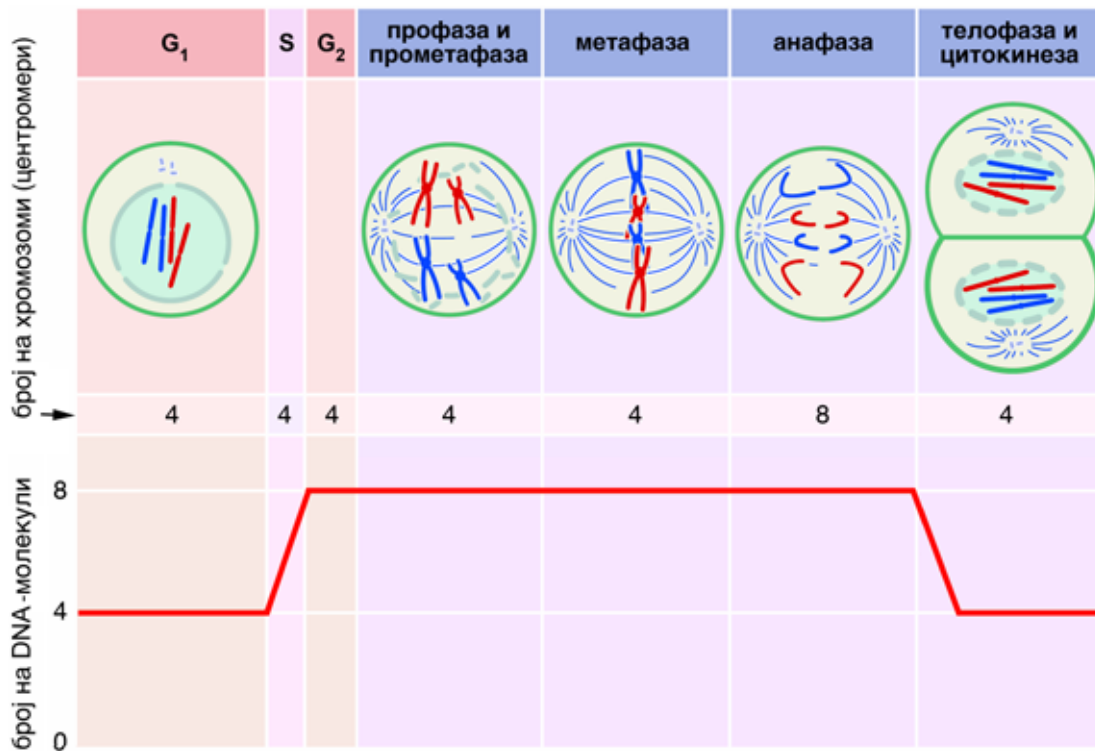
**Слика 18-2:** Споредба на обичната клеточна делба (митоза) и редуциската делба (мејоза). Заради појасен приказ, во секоја клетка на шемата се нацртани само по два хромозома од еден хромозомски пар, а се означени со црвена и сина боја. **А:** кај митозата нема рекомбинација ниту редуција на бројот на хромозомите, па, секоја од клетките-ќерки го наследува истиот диплоиден број хромозоми ( $2n$ ). **Б:** кај мејозата, која се одвива во текот на гаметогенезата, се случува рекомбинација меѓу хомологните хромозоми (кросинг-овер) и редуција на хромозомите во гаметите на хаплоиден број ( $1n$ ). Заради поголема прегледност, не се прикажани сите поединечни фази на делбите.

теристики со кои мејозата функционално се разликува од митозата се: редукција на бројот на хромозомите (оттаму и се нарекува редукциска делба), како и генетските рекомбинации (кросинг-овер) меѓу случајни региони од хомологните хромозоми (од еден ист пар). Редукцијата на бројот на хромозомите на половина се случува поради отсуство на DNA-репликација во текот на втората клеточна делба од мејозата, поради што секој од хромозомите е застапен со само по еден еднохроматиден хромозом, а не во парови. Како што се гледа од **сликата 20-1, Б**,

Крајниот резултат на мејозата се четири гамети чиј генетски материјал не е целосно идентичен, токму поради кросинг-оверот.

Важно е да се воочат големите разлики меѓу митозата и мејозата. Кај митозата, двете клетки-ќерки наследуваат по една копија од истиот геном, без редукција на бројот на хромозоми и, освен при исклучоци, без рекомбинации меѓу хомологните хромозоми (кросинг-овер). Исто така, важно е да се има предвид дека репликацијата на геномската DNA предизвикува удвојување на количеството на DNA во клетката пред нејзината делба (**слика 18-3**).

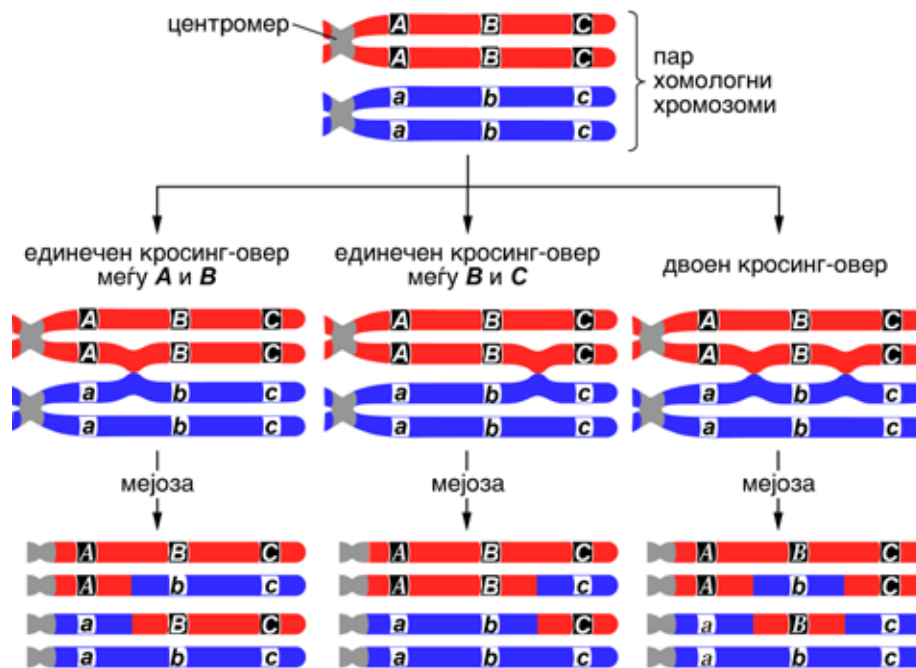
Покрај тоа, бројот на хромозоми во клетката е еднаков на бројот на функционални центромери, додека бројот на DNA-молекули е еднаков на бројот на хроматиди.



**Слика 18-3:** Споредба на бројот на хромозомите со бројот на DNA-молекулите во текот на клеточниот циклус.

## Врзани гени

Како што е претходно веќе објаснето, Менделовите принципи на сегрегација и на независна распределба на алелите во гаметите се применливи само при следење на карактеристики кодирани од гени кои се наоѓаат на различни хромозоми или се доволно оддалечени еден од друг на истиот хромозом (слика 18-4).



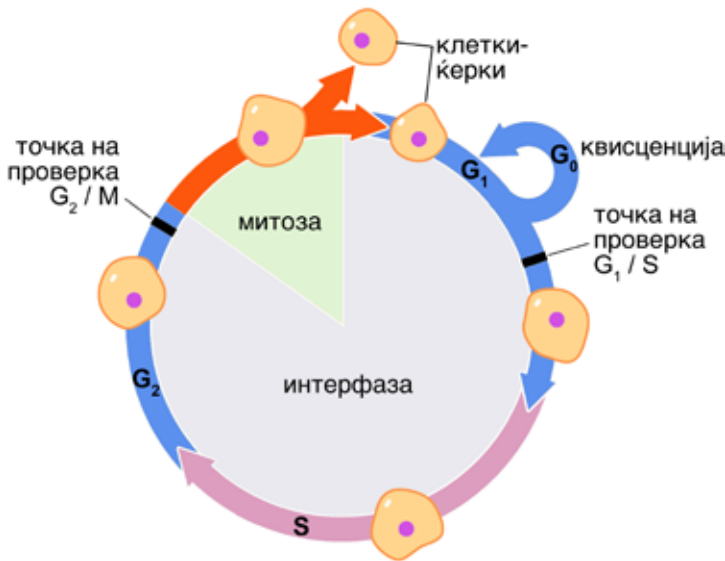
**Слика 18-4:** Три типа на кросинг-овер меѓу три врзани генски локуси. Двата хомологни хромозоми се прикажани со две различни бои, додека алелите се доминантни или рецесивни.

Доколку два различни гени се лоцирани доволно блиску еден до друг на истиот хромозом, тогаш заедно се рекомбинираат при мејозата, па, се нарекуваат **врзани гени**, односно припаѓаат на иста **група врзани гени**.

## 18.2 Клеточен циклус

За разлика од прокариотските, еукариотските клетки се делат со посебна клеточна делба (митоза) која обезбедува софистицирани механизми за пренесување на генетските информации од една клетка во нејзините клетки-потомци. Не само што еукариотскиот геном е многу поголем од тој на прокариотите, туку е и распределен во повеќе хромозоми. Тоа дополнително го усложнува процесот на делба на еукариотската клетка. Со изразот клеточен циклус сликовито се опишува временската низа на случувања во текот на кои клетката се подготвува и се дели на две клетки. Тоа е еден од најкритичните процеси во живите клетки и обезбедува речиси перфектен пренос на генетските информации од една во друга клеточна генерација.

Секој нов циклус започнува со тукушто поделената клетка-ќерка, се протега низ нејзиниот раст, метаболизам, развој и подготовка за делба. На крајот од циклусот, оваа клетка се дели во две клетки-ќерки, по што може да започне следниот циклус (слика 18-5).



**Слика 18-5:** Редоследот на процесите на делба на една во две клетки-ќерки во определен временски интервал се прикажува како клеточен циклус.

нивната релаксираност. Митотската фаза ја опфаќа самата клеточна делба во текот на која се одвива делбата на јадрото (митоза, во потесна смисла на зборот) и на цитоплазмата (цитокинеза).

Интерфазата меѓу двете клеточни делби вклучува и репликација на геномот (т.е. синтеза на DNA во секој од хромозомите), па, оттаму и се обележува како **S-фаза**. Но, интерфазата е подолга од самата DNA-репликација и ги опфаќа периодите пред и по S-фазата се означуваат како:  $G_1$  и  $G_2$ , соодветно. Кратенката G потекнува од почетната буква на англискиот збор: *gap* (растојание, меѓупростор).

Во текот на  **$G_1$ -фазата**, се одвива раст на клетката, синтеза на неопходните протеини и нејзина подготовка за делба и кај цицачите обично трае околу 10 часа. Кон крајот на  $G_1$ -фазата се наоѓа критичен момент кој се нарекува **точка на проверка кај преминот  $G_1/S$**  или **рестрикциска точка (R)**. Доколку соодветните протеини кои се задолжени за контрола на клеточниот циклус „дозволат“ премин низ оваа точка на проверка, циклусот продолжува понатаму.

Некои клетки кои понатаму не се делат преминуваат во т.н.  **$G_0$ -фаза** која се нарекува и состојба на клеточна **квисценција**, од латинскиот збор за стивнување. Клетките можат да останат во ваква состојба подолг временски интервал, понекогаш и до крајот на животот на организмот. Но, при исполнувањето на потребните услови или при соодветни стимулирања (со определени фактори на раст, на при-

Според опсежните истражувања во *in vitro* услови (во култура на клетки), голем број клеточни типови можат да го комплетираат својот клеточен циклус во текот на 16 до 24 часа, иако постојат и многу исклучоци. Од овој период, митозата опфаќа многу кус временски период, обично од околу 1 час.

Клеточниот циклус се состои од две главни фази: **интерфаза** и **M-фаза (митоза)**. Интерфазата го опфаќа периодот меѓу двете делби и во текот на оваа фаза клетката расте, се развива и се подготвува за делбата. Поединечните хромозоми не можат да се набљудуваат со светлосен микроскоп во текот на интерфазата, поради



мер), можат повторно да го продолжат започнатиот клеточен циклус.

Синтезата на DNA обезбедува целосна репликација на хромозомите и овозможува секоја од двете клетки-ќерки да имаат по еден хромозомски пар, а кај голем број мамалиски клетки трае околу 9 часа. Поради диплоидниот карактер на соматските еукариотски клетки, пред S-фазата (т.е. пред репликацијата на јадрениот геном) секој хромозом е составен од по една хроматида, додека по синтезата се состои од по две сестрински хроматиди.

По S-фазата, клетката навлегува во **G<sub>2</sub>-фазата** во текот на која се довршуваат уште некои биохемиски процеси кои се неопходни за започнување на митозата, а ја содржи и критичната **точка на проверка кај преминот G<sub>2</sub> / M**.

Заради споредба, кај типичните мамалиски клетки, G<sub>2</sub>-фазата трае околу 4 часа.

### 18.3 Молекуларни аспекти на клеточниот циклус и неговата регулација

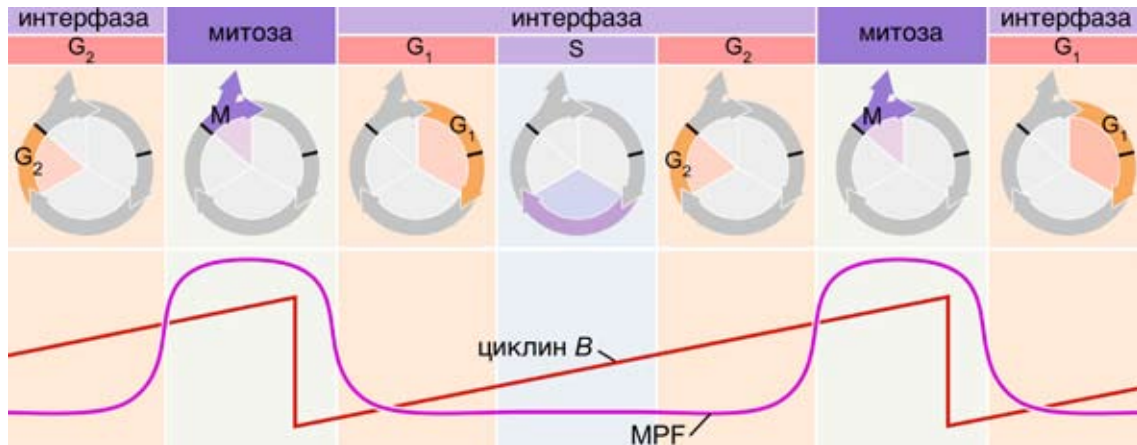
Регулацијата на клеточниот циклус кај повеќеклеточните организми е еден од најсложените биолошки феномени, па, не зачудува што во неговата регулација и извршување учествуваат екстремно голем број гени и нивните продукти.

Иницирањето на клеточната делба е сложен процес кој зависи од голем број фактори кои ѝ сигнализираат на клетка дали да се дели. Кај повеќеклеточните организми, циклусот на делба клетката може да започне само доколку постојат екстрацелуларни фактори на раст наречени **митогени**. Во нивно отсуство, клеточниот циклус запира кај рестрикциската точка R на преминот меѓу G<sub>1</sub> / S фазите и клетката влегува во, веќе споменатата, состојба на мирување (G<sub>0</sub>-фаза или квисценција). Токму во временскиот интервал од почетокот на G<sub>1</sub> фазата (т.е. од настанувањето на клетката-ќерка), па, сè до рестрикциската точка е неопходно координирано учество на повеќе митогени сигнали за да продолжи започнатиот клеточен циклус.

Еден од најмногу проучуваните молекуларни механизми кои се вклучени во регулацијата на клеточниот циклус се протеините наречени **циклини** и ензимите кои припаѓаат на фамилијата на **циклин-зависни кинази (CDK, од англ. cycline-dependent kinase)**. Имено, циклин-зависните кинази немаат ензимска активност сè додека не се правилно поврзани со соодветните циклини. Откога ќе го создадат комплексот, овие кинази вршат фосфорилација на целниот протеин. Од функционален аспект, можат да се издвојат три основни класи на комплекси меѓу циклините и циклин-зависните кинази: тие кои учествуваат во регулацијата на G<sub>1</sub>, на S и на M-фазата од клеточниот циклус. **комплексите G<sub>1</sub>-CDK** се вклучени во подготовката на клетката за започнување на S-фазата и тоа преку активирање на транскрипциските фактори задолжени за експресија на протеините и ензимите кои се неопходни за DNA-репликацијата, како и на гените кои ги кодираат самите комплекси од S-фазата. **комплексите CDK од S-фазата** директно го стимулираат започнувањето, одвивањето и завршувањето на DNA-репликацијата.

Овие комплекси обезбедуваат секој хромозом да се реплицира само еднаш. **Митотските CDK-комплекси** ја индуцираат кондензацијата на хромозомите и обезбедуваат правилна распределба на хромозомите во двете клетки-ќерки.

Клучната улога на комплексите циклин-CDK во регулацијата на клеточниот циклус може да се илустрира ако се анализира интрацелуларната концентрација на комплексот циклин *B* и на MPF во текот на фазите на клеточниот циклус (слика 18-6).

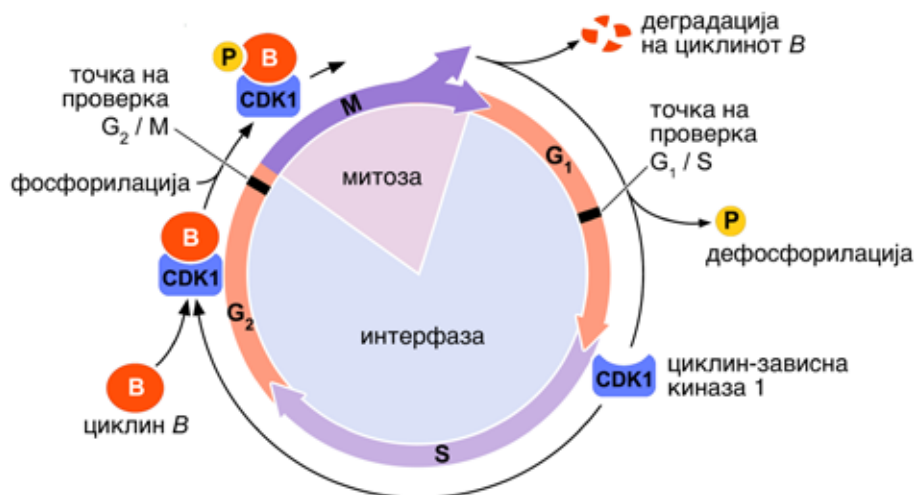


**Слика 18-6:** Шематски приказ на интрацелуларните релативни концентрации на циклинот *B* и на MPF-комплексот во текот на фазите од клеточниот циклус.

Циклинот *B*, на пример, нековалентно, но, многу специфично се врзува со циклин-зависните кинази 1 (CDK1), создавајќи комплекс наречен **фактор кој ја поттикнува митозата (MPF, од англ. *M-phase promoting factor*:).**

Како што се гледа од идеализираната шема, циклинот *B* постепено се акумулира во текот на интерфазата, достигнувајќи доволно високи концентрации во текот на  $G_2$  фазата кои овозможуваат CDK1 постепено да создава неактивни комплекси MPF.

Кон крајот од интерфазата (попрецизно, во  $G_2$  фазата), MPF-комплексот достигнува критично високо ниво што е неопходно за негова фосфорилација посредувана од посебни активирачки фактори (слика 18-7).



**Слика 18-7:** Шематски приказ на клеточниот циклус. Кратенките се објаснети во текстот.

Самата фосфорилација го трансформира неактивниот комплекс MPF во активен. Активната форма на MPF-комплексот, всушност, ја поседува протеин-киназната активност, односно катализираното ковалентно додавање на фосфатна група кон аминокиселинските остатоци од други целни протеини. Токму активниот комплекс MPF овозможува премин низ точката за проверка  $G_2/M$  и извршување на митозата (M). Понатаму, активниот MPF предизвикува разградување на јадрената мембрана, кондензирање на хромозомите, создавање на делбеното вретено и низа на други случувања кои се неопходни за одвивање на митозата. Иронично, активниот MPF-комплекс е автодеструктивен, па, предизвикува постепено разложување на циклинот *B*. Така, кон крајот на метафазата, циклинот *B* брзо се разградува, со што се намалува и концентрацијата на активниот комплекс MPF и се овозможува напредување на митозата низ анафазата, телофазата и цитокинезата, кон крајот на митозата.

Важно е што нарушувањата на регулацијата на клеточниот циклус се вклучени во настанувањето на малигните заболувања, што е подетално објаснето понатаму, во главата 19: Молекуларна биологија и генетика на малигните заболувања.

## 18.4 Генетика на развојот

Кај повеќеклеточните организми, развојот ги опфаќа сите промени и растот кои се случуваат од зиготот (клетка настаната со фузија на машката и женската полова клетка-гемета), постепените структурни и организациски промени на клеточно, ткивно и органско ниво, па, сè до создавањето на возрасната единка. Со делбите на зиготот започнува и постепена диференцијација на клетките проследена со специфична и сложена инактивација на определени гени од геномот на ембрионот. По завршувањето на ембриогенезата, секоја клетка во возрасниот организмот има своја посебна улога. Кај животните, на пример, мускулните клетки овозможуваат движење, а ентероцитите апсорпција на хранливите материи од цревата. Токму функционалната и структурната специјализација на различните клетки и органи на телото овозможуваат извршување на биолошките функции на целиот организам и опстанокот на индивидуата.

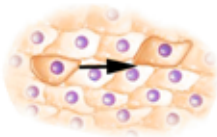
Генетиката на развојот ја проучува улогата на гените кои учествуваат во оркестрирањето на промените кои настануваат во текот на развојот на повеќеклеточните организми. Иако истражувањата во областа на развојот се вршат повеќе од 150 години, голем број од сознанијата се добиени во последниве неколку децении. Истражувањата во полето на компаративната генетика покажале дека постојат многу развојни сличности кај вишите организми. Во последниве неколку децении се случува речиси неверојатен напредок во разбирањето на генетиката развојот на молекуларно ниво. Користејќи неколку експериментални организми, какви што се *Drosophila melanogaster*, нематодата *Caenorhabditis elegans*, глушецот, рибата-зебра (*Danio rerio*) и цветното растение *Arabidopsis thaliana*, направени се бројни студии во кои се идентифицирани и карактеризирани гените кои се клучни во ембриогенезата кај овие видови. Со генетски анализи се идентифицирани голем број регулаторни гени кои ја контролираат функционалната мрежа на структурните гени кои се вклучени во развојните процеси. Особено се корисни истражувањата на мутантните аели кај организмите-модел со кои се откриваат причинско-последичните врски меѓу инду-

кторите, рецепторите, регулацијата на генската транскрипција и интеракциите меѓу клетките и ткивата во однос на морфолошките промени кои се случуваат во текот на развојот.

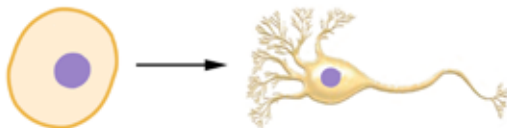
## Формирање на планот за градба на телото на организмот

Онтогенезата на вишите повеќеклеточни животни и растенија следи определена шема на телесна градба на соодветниот организам. Изразот шема или телесен план (*germ. bauplan*) се однесува на просторниот распоред на различни региони на телото, а на клеточно ниво, се должи на распоредувањето на поединечните клетките и нивната постепенa специјализација во текот на развојот на организмот. Овој процес се нарекува **морфогенеза**. На клеточно ниво, создавањето на возрасен организам од

**А** клеточна делба    **Б** клеточно движење



**В** клеточна диференциација



**Г** клеточна смрт со апоптоза



**Слика 18-8:** Основни клеточни настани во текот на развојот на повеќеклеточните организми. **А:** клеточна делба со митоза. **Б:** клеточно движење меѓу околните клетки. **В:** диференциација во специјализирани клетки. **Г:** клеточна смрт со апоптоза.

предизвика некоја клетка да се подели во две клетки-ќерки, а друг да мигрираат во прецизна насока од еден регион на ембрионот во друг. Покрај тоа, позиционирачките информации можат да ја стимулираат клетката да ја достигне конечната структура и биолошките функции кои се специфични за определен клеточен тип. Овој процес се нарекува **диференциација**. Една од дефинициите за развојот е дека тој претставува постигнување на диференцирана состојба на сите клетки на организмот (освен матичните клетки). На пример, клетките во фазата бластула (кога ембрионот е само топчеста структура на униформни клетки) се недефинирани, додека еритроцитите

зиготот (оплодената јајце-клетка) вклучува четири основни типа настани: делба, миграција, диференциација и апоптотична смрт на клетките (**слика 18-8**). Прогресивниот и координиран тек на овие случувања доведува до формирање на тело со определена шема на градба која е карактеристична за секој вид. Временски темпираната експресија на гените и локализација на генските продукти на прецизни региони во зиготот и во раниот ембрион се критични феномени кои придонесуваат за координираниот развој на организмот.

За да може организмот да стекне телесна градба која има уникатни морфолошки и функционални карактеристики, секоја клетка во текот на развојот на телото мора да прими сигнали наречени **позиционирачки информации** кои предизвика таа да стане клетка од соодветен тип врз основа на нејзината позиција во однос на другите клетки. При приемот на позиционирачките информации, клетките реагираат на различни начини. На пример, определен позиционирачки сигнал може

кај возрасните единки се целосно диференцирани клетки.

Позиционирачките информации можат да предизвикаат и програмирана смрт на клетката. Овој процес, познат како апоптоза, е честа појава во текот на нормалниот развој на ткивата и органите и со неа се елиминираат вишокот клетки од ембрионот. На таков начин се одвојуваат и обликуваат поединечните прсти на рацете и нозете во текот на ембриогенезата кај цицачите, на пример.

Клеточната диференцијација и апоптозата се подетално објаснети понатаму во оваа глава.

## Молекуларни механизми за позиционирачките информации во текот на развојот

Сигналните молекули кои ги пренесуваат позиционирачките информации и кои ги провоцираат развојните промени се нарекуваат **морфогени**. Најчесто тоа се растворливи молекули кои дифундираат и дејствуваат врз клетката во зависност од нивната концентрација. Повеќето морфогени се, всушност, транскрипциски фактори и други регулаторни протеини кои ја регулираат експресијата на соодветни гени.

Еден од најважните механизми за функционирање на позиционирачките информации е создавањето на **концентрациски градиент** на морфогените уште во самата јајце-клетка, а кој по оплодувањето се прераспределува со секоја делба на клетките. Имено, асиметрично високата концентрација на морфогените во едниот пол од цитоплазмата на јајце-клетката или на јајцето, како и постепеното (градуално) опаѓање на концентрација кон спротивниот пол, е клучен за развојот и ги определува оските и регионите на ембрионот. Точно определените концентрации на еден или на повеќе морфогени, т.е. на mRNA за транскрипциските фактори и на самите протеински продукти, директно влијаат врз судбината на клетките во дадениот регион. Токму од нив зависи дали, кога и колку пати клетката ќе продолжи да се дели, дали и во која насока ќе мигрират низ околните клетки, во каков клеточен тип ќе се диференцира и дали и кога ќе се самоуништи со апоптоза. Во литературата од областа на генетиката на развојот често се користи сликовитиот израз **клеточна судбина** за да се опишат крајните морфолошки особини кои ќе ги стекне клетката или група клетки во определен регион од ембрионот. Определувањето на натамошната развојна судбина на клетките се нарекува **детерминација**.

Покрај концентрациските градиенти на морфогените во ооцитата, важен молекуларен механизам за детерминација е и **асиметричната синтеза и екстрацелуларна дистрибуција** на морфогените молекули меѓу клетките во ембрионот. Во точно определени фази од развојот, определени клетки или група клетки можат да секретираат морфогени кои имаат влијание врз развојната судбина на соседните клетки од ембрионот. Концентрацијата на овие молекули обично е највисока непосредно до клетките кои ги секретирале.

Покрај нив, позиционирачките информации можат да делуваат и преку **молекулите за клеточна адхезија (CAM)**, кои се веќе спомнати во главата 6: Протеини. Имено, секоја клетка од ембрионот експримира специфична група на рецептори на клеточната мембрана кои се способни за адхезија со компатибилните рецептори од соседните клетки и/или со молекулите на екстрацелуларниот матрикс. Притоа,

клетките ги добиваат своите позиционирачки информации во зависност од контактите кои ги остваруваат со соседните клетки и со екстрацелуларниот матрикс.

Во определувањето на планот за морфолошката градба на телото на повеќе еклечочните организми се вклучени повеќе молекуларни механизми со учество на голем број гени. Ќе биде прикажан само развојот на *D. melanogaster* како еден од главните моделни-организми во областа на генетиката на развојот.

## 18.5 Генетика на развојот на *Drosophila melanogaster*

Ембрионскиот развој кај *Drosophila* започнува со фертилизацијата со која добива оплодена јајце-клетка (диплоиден зигот). Првите девет делби на јадрото се случуваат на секои 10 минути и создаваат мултинуклеирана клетка, т.н. синцициумски бластодрем. Во зедничката цитоплазма се создава градиент на концентрации на продуктите (протеини и mRNA молекули) на т.н. гени за поларност на јајцето. По 10. делба, јадрата мигрираат кон периферијата на јајцето, а по неколку делби се создава и група клетки на едниот пол. Кусо потоа, доаѓа до цитокинеза и секое јадро се обвива со клеточна мембрана со што се создава површински слој на клетки (клеточен бластодрем). Асиметричната експресија на определени гени во јадрата на ембрионот (освен тие на поларните клетки) ги определува оските на симетрија на ембрионот, што е основа за негово сегментирање, како клучна морфолошка промена во текот на развојот. Со експресијата на друга класа на гени, секој оформен сегмент добива свој идентитет и со секоја натамошна клеточна делба се гради ембрионот според телесниот план, а клетките постепено се диференцираат за точно определена функција. Процесот со кој позиционирачките сигнали предизвикуваат просторно-ограничен идентитет на клетките се нарекува **спецификација**.

По стадиумот на ембрион, следат три стадиуми на ларва, два стадиуми на куќла и на крајот, со метаморфоза, се формира возрасната единка. Целиот развој од зигот до возрасен организам, кај *Drosophila* трае 10 дена.

Во натамошниот текст ќе бидат обработени само генетските аспекти на развојот во стадиумот на ембрион кај *Drosophila*, кои се најдобро проучени и каде постојат најмногу сличности со развојот на вишите организми. Се разбира, не треба да се изгуби предвид дека ембриогенезата е далеку посложена кај вертебралните организми.

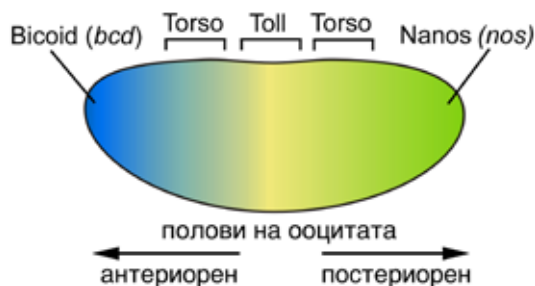
Генетската контрола на ембрионскиот развој на *Drosophila* е под контрола на две класи на гени: гените за поларност на јајцето (кои се веќе споменати) и зиготски гени.

Како што е погоре наведено, продуктите на **гените за поларност на јајцето** (наречени и **гени на матерналните ефекти**) се експримираат рано во текот на создавањето на јајцето (оогенезата), а концентрацискиот градиент на овие молекули кој се формира во цитоплазмата на ооцитата уште пред фертилизацијата е клучен за развојот на јајцето, а подоцна и за ембрионот. На пример, концентрацискиот градиент на протеинот Bicoid (кодирани од генот *bcd*), како и на mRNA-транскриптите од овој ген се највисоки во антериорниот пол на ооцитата. Спротивно, концентрацијата на транскриптите и на протеинот Nanos (продукти на генот *nos*) е највисока во постериорниот, а градуално опаѓа кон антериорниот пол (слика 18-9). Овие генски про-



дукти ја дефинираат надолжната (антеро-постериорна) оска на симетрија, како и половите на ембрионот. Покрај нив, меѓу двата претходни градиенти е присутна висока концентрација на трансмембранскиот рецептор Toll кој е важен за определување на дорзо-вентралната (грбно-стомачната) оска на ембрионот. Четвртиот сигнал кој се синтетизира и на двата пола е трансмембранскиот тирозин-киназен рецептор наречен Torso кој е клучен за детерминирање на предниот (главен) и задниот (опашен) регион од ембрионот. Овие морфогени дејствуваат на тој начин што ја активираат или ја потиснуваат експресијата на своите целни гени во точно определени фази на ембрионскиот развој. Регулацијата на генската експресија не е само временски, туку е и просторно ограничена во текот на развојот, што е и клучно за целиот процес.

**Слика 18-9:** Шематски приказ на ефектот на концентрациските градиенти на протеините кои се продукти на гените за поларност на јајцето. Концентрацијата на протеинот Bicoid и на соодветната mRNA (прикажани со сина боја) се највисоки во anteriорниот пол, а опаѓаат постепено кон постериорниот пол на јајце-клетката. Спротивно е со протеинот Nanos (чија концентрација е прикажана со зелена боја). Присутни се и протеините Toll кој ја определува дорзо-вентралната оска, како и протеинот Torso кој подоцна ги детерминира регионите на главата и на опашот во ембрионот. Заради прегледност, на цртежот е прикажана само цитоплазмата на ооцитата, без јадрото.



На пример, кога регионите од ембрионот на *Drosophila* се изложени на висока концентрација на протеинот-морфоген наречен Bicoid, се развиваат во структури кои се карактеристични за предниот дел на телото.

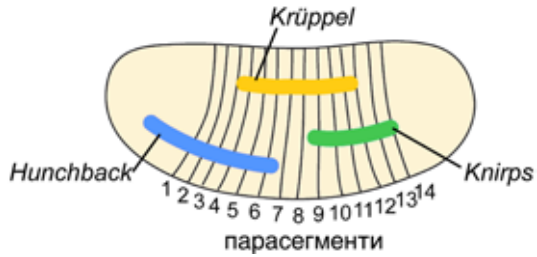
**Зиготските гени** се експримираат во клетките на ембрионот, подоцна од гените за поларност на јајцето. Со долгогодишно проучување на примероци со мутации во овие гени, (за што во 1995 година е доделена Нобеловата награда за физиологија или медицина) откриени и карактеризирани се два типа на зиготски гени: сегментациски и хомеотски.

### Сегментациски гени

Експресијата на **гените за сегментација** кај *Drosophila* предизвикуваат создавање на серија на паралелни напречни сегменти во ембрионот и го определуваат бројот, големината и поларноста на секој сегмент. Досега се идентифицирани преку 20 сегментациски гени кај *Drosophila*. Постојат три класи на сегментациски гени: гени „gap“, гени за парните правила и гени за поларност на сегментите.

Антеро-постериорниот концентрациски градиент на морфогените кои се продукти на гените за поларност на јајцето ја активираат првата класа сегментациски гени веднаш по фертилизација: „gap“-гените кои предизвикуваат груба поделба на ембрионот на широки региони, а ги индуцираат и гените за парните правила (**слика 18-10**).

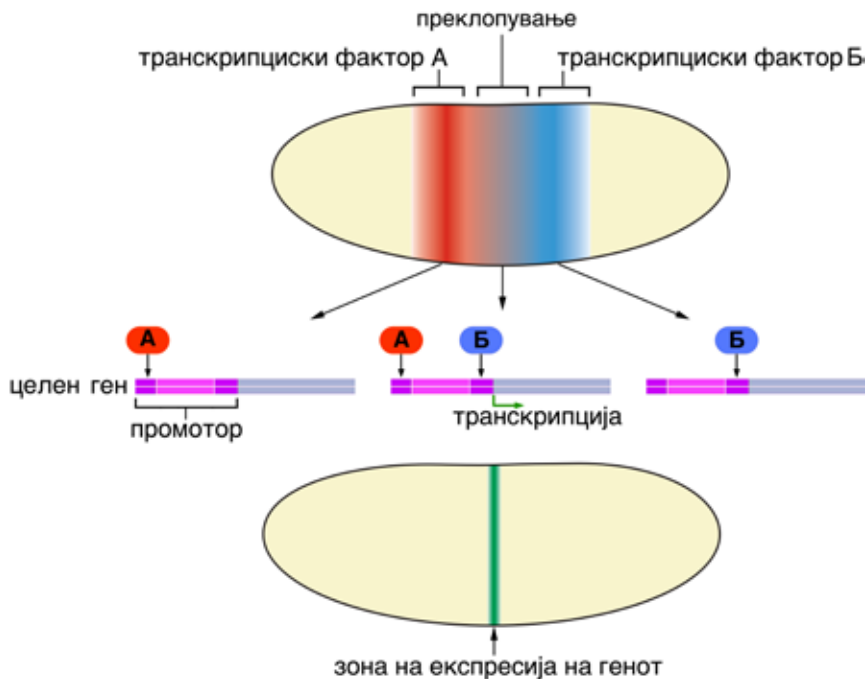




**Слика 18-10:** Зони на локална експресија на подобро проучените „gap“-гени за сегментација во ембрионот на *Drosophila*. Гените *Hunchback*, *Krüppel* и *Knirps* создаваат три широки зони во раниот развој на ембрионот. Заради појасна претстава на просторната поставеност, прикажани се и 14-те парасегменти кои ќе се формираат подоцна.

**Гените за парните правила**, пак, предизвикуваат поделба на ембрионот на седум помали региони, секој со широчина од по 2 сегмента и ги индуцираат гените за поларност на сегментите. Интересно е што градиентите на експресија на гените за парните правила се преклопуваат наизменично, а само во регионите каде се присутни и двата транскрипциски фактори може да се индуцира експресија на гените за поларност на сегментите (слика 18-11).

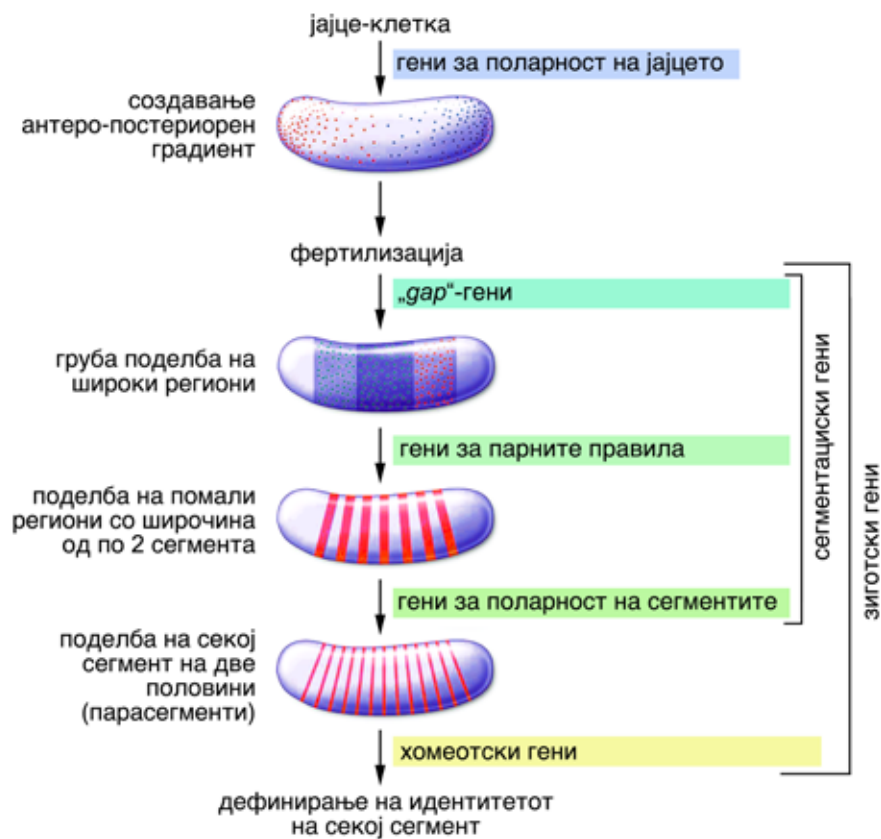
**Гените за поларност на сегментите** предизвикуваат поделба на секој сегмент на две половини: антериорни (предни) и постериорни (задни) со што се создаваат



**Слика 18-11:** Создавање на нови шаблони на експресија во ембрионот на *Drosophila* преку ефектот на преклопување на регионите со различни генски продукти. Имено, само во зоната каде истовремено се присутни транскрипциските фактори А и Б (продукти на гените за парни правила), тие се врзуваат со промоторот на својот целен ген (некој од гените за поларност на сегментите) и индуцираат негова експресија. Наспроти тоа, во регионите каде е присутен само едниот транскрипциски фактор (А или Б), нема активирање на промоторот и отсуствува експресија на генот. Заради прегледност, прикажана е само еден напречна зона на ембрионот, иако се наоѓаат најмалку седум.

вкупно 14 парасегменти. Гените (*hedgehog* и *wingless*, на пример) кодираат протеини кои се секретираат екстрацелуларно и делуваат на соседните групи на клетки. Тоа предизвикува ембрионот напречно да се подели на 4 сегменти кои ја формираат главата, на 3 торакални и на 8 до 9 абдоминални сегменти.

Важно е да се има предвид дека постои хиерархиска контрола на генската експресија. Имено, антеро-постериорниот концентрациски градиент на морфогените (продуктите на гените за поларност на јајцето) ја активираат првата класа зиготски сегментациски гени веднаш по фертилизација, а тие, ги активираат каскадно една по друга останатите групи на зиготски гени, сè до хомеотските гени (слика 18-12).



**Слика 18-12:** Хиерархиска регулација на генската експресија на клучните гени во текот на раниот развој на *D. melanogaster* од фертилизацијата (со која се создава диплоиден зигот), па, сè до дефинирањето на идентитетот на ембрионските сегменти. Активацијата на секој последователен тип на ген е каскадна, од горе кон долу на сликата.

## Хомеотски гени

Едни од клучните гени за определување на идентитетот на регионите од ембрионот по должината на антеро-постериорната оска, односно сегментацијата кај повеќеклеточните организми се **хомеотските** или поретко наречени **селекторни гени**. Нивното откривање во средината на 1980-тите години довело до драстично напредување на истражувањата поврзани со генетиката на индивидуалниот развој (онтогенезата) и еволуцијата на организмите.

Во суштина, експресијата на хомеотските гени ја определува развојната судбина на клетките во сегментите од ембрионот со своите специфични фенотипски карактеристики. На пример, судбината на клетките од сегментот T2 во ембрионот на *Drosophila* е да го формираат торакалниот сегмент со по еден пар крилја и нозе. Судбината на клетките во секој сегмент од телото на овој инсект е утврдена во раната фаза од ембриогенезата, многу порано отколку што морфолошките промени стануваат видливи.

Хомеотските гени се дел од генетската хиерархија која ја контролира ембриогенезата, па, и самите се регулирани од страна на други гени. Од повисоката хиерархија, регулирани се од „*gap*“-гените, од гените за парните правила и од гените за поларност на сегментите. Покрај тоа, можат да бидат регулирани и од гените со иста хиерархија. На пример, групата на гени познати како *Polycomb* ја потиснуваат експресијата на хомеотските гени во клетките и тоа точно во оној регион од ембрионот каде не треба да делуваат. Ваквото специфично потиснување на генската експресија се постигнува со ремоделирање на хроматинската структура со што се отежнува или, целосно, се оневозможува транскрипцијата на соодветните гени. Спротивно, во клетките на оние делови од ембрионот каде што хомеотските гени се активни, продуктите на *Trithorax*-гените ја одржуваат еухроматинската структура на геномот достапна за транскрипциската машинерија. Оркестрираната активност на поголем број генски продукти предизвикува секој поединечен хомеотски ген да биде експримиран само во точно определен сегмент на ембрионот.

Интересно е што во DNA-молекулот, хомеотските гени се поредени еден по друг со истиот редослед како што се експримираат по должината на антеро-постериорната оска на ембрионот (**слика 18-13**). Повеќето хомеотски гени кодираат транскрипциски фактори кои ги определуваат морфолошките карактеристики на секој сегмент. Кодирачката секвенца на голем број хомеотски гени (*Hox*, на пример) содржи повторувања на една иста консензусна секвенца со должина од 180 базни паров позната како **хомеобокс** (англ. *homeobox*). Протеините кои се кодирани од ваквите гени содржат повторувања на карактеристични мотив: хеликс-завој-хеликс, кои се наречени **хомеодомени** и со кои директно се поврзуваат со соодветни DNA-секвенци при генската регулација. Секој хомеодомен има должина од 60 базични аминокиселински остатоци и е кодиран од соодветниот хомеобокс.

***Hox*-гените** опфаќаат цела фамилија на сродни гени кои се наоѓаат само кај животните, а не и кај останатите еукариотски организми. Кај *Drosophila* се познати два комплекса на *Hox*-гени: *Antennapedia* и *Bithorax*, наречени според ефектите од мутациите. Имено, мутациите во определени гени од комплексот *Antennapedia* предизвикуваат развој на органи каде што не би требале да постојат (антени на место на предните нозе, на пример). Ваквата генска експресија во погрешна група клетки или во погрешен регион од ембрионот во текот на развојот се нарекува **ектопична експресија**. Од друга страна, мутациите во комплексот *Bithorax* предизвикуваат удвојување на торакалниот сегмент на инсектот.

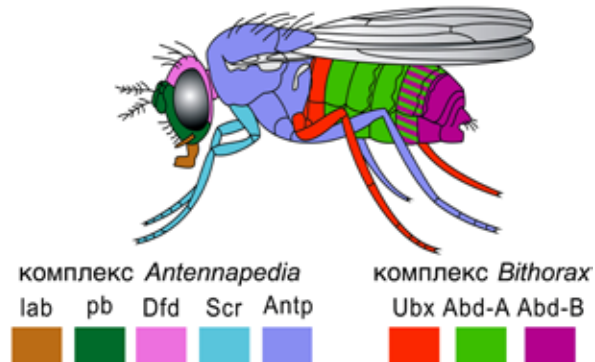
Гените кои се активираат со хомеотските протеини играат улога и во меѓуклеточните сигнални патишта. Активирањето на овие сигнални патишта, им овозможува на индивидуалните клетки и групи на клетки да стекнат правилна морфологија и функција во текот на развојот.

По овој ран развој на ембрионот на *Drosophila*, следи органогенезата и на гла-

вата, тораксот, абдоменот, нозете и антените на инсектот.

Треба да се има предвид дека онтогенезата на вертебралните организми е далеку посложена и помалку проучена од прикажаниот, крајно поедноставен, приказ на развојот на моделниот организам *Drosophila*. Од друга страна, импресивно е што постои голема сличност гените вклучени во развојот на *Drosophila* со тие кај сите животни со билатерална симетрија на телото (вклучувајќи го и човекот). Се претпоставува дека постои висока еволуциска конзервираност на овие гени во теко тна последните околу 650 милиони години. Покрај тоа, постои позитивна корелација меѓу комплексноста на организмот и бројот на поединечни *Hox*-гени во неговиот геном.

Кај луѓето се опишани неколку десетици разни вродени малформации како резултат на мутации во некои од *Hox*-гените, какви што се синдактилијата (кусок прсти на нозете или рацете), вишокот или кусокот ребра, разни урогенитални малформации и други нарушувања настанати во текот на ембриогенезата.



Слика 18-13: Експресија на *Hox*-гените кај *D. melanogaster* кои го регулираат идентитетот на телесните делови. Тие се организирани во два генски кластера (комплекси): *Antennapedia*, кој содржи пет и *Bithorax*, кој содржи три *Hox*-гени. Прикажаните обоени коцки под секоја ознака за гените служи за сликовито прикажување на нивната експресија на прикажаниот цртеж на возрасната единка на *Drosophila*. Сликата е во јавен домен на интернет и е достапна на [www.wikimedia.org](http://www.wikimedia.org).

## 18.6 Клеточна диференцијација

Мултицелуларните организми, особено вишите, се градени од огромен број на клетки со специјализирана градба и функција. Понатаму, клетките и меѓуклеточниот простор се организирани во различни ткива и органи, во зависност од сложеноста на видот. Но, сите клетки кои се наоѓаат во еден повеќеклеточен организам настанале со делба на оплодената јајна клетка (зигот). Секако, оваа констатација се однесува на организмите кои се размножуваат по сексуален пат, какви што се мнозинството виши животни и растенија. Како што е претходно објаснето, со секоја делба во текот на развојот клетките стекнуваат сè посспецијализирана градба и функција, односно се диференцираат во определени клеточни типови. Кај возрасните единки, способноста за диференцијација е мошне ограничена и е присутна само во определени клетки од ткивата кои постојано или повремено се обновуваат или репарираат.

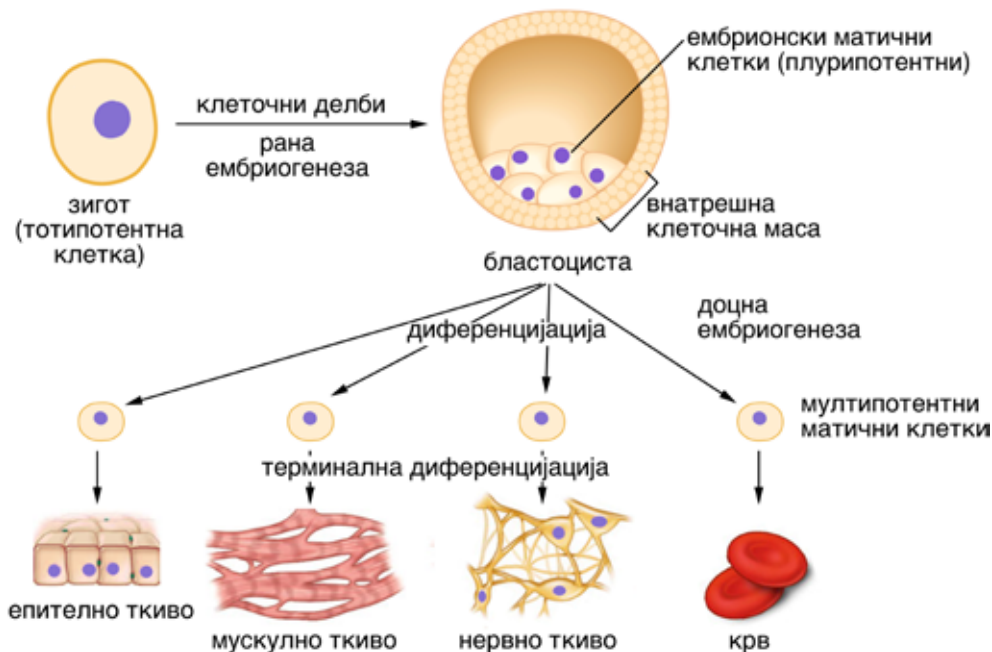
Најимпресивен факт во тој контекст е што секвенцата на геномската DNA е речиси идентична во сите клетки во текот на развојот на индивидуата, почнувајќи од зиготот, па, сè клетките во возрасната единка, но, нивната генска експресија драстично се разликува и е основната причина за диференцијацијата. Се претпоставува

вува дека процесот на диференцијација се заснова на прогресивно инактивирање на голем број гени во различни клетки од ембрионот, односно според шаблоните на **диференцијалната генска експресија**. Во литературата, оваа претпоставка се нарекува и хипотеза за променлива генска активност. Основниот концепт според оваа хипотеза е дека, иако, секоја клетка го содржи целиот геном, нејзиниот развој и диференцијација го определува токму диференцијалната транскрипција на селектирани гени од геномот. Се смета дека стимулирањето на клетните рецептори со специфични фактори на раст кои се произведени од други клетки, како и сигналната трансдукција играат важна улога во диференцијацијата на клетките. Постојат податоци за улогата на определени *microRNA* во регулацијата на генската експресија во овој процес. Сепак, поновите истражувања сугерираат дека епигенетските механизми се клучни за селективното стивнување на повеќето гени, наспроти многу помал број определени активни гени, во крајно диференцираните клетки. Основите на епигенетската контрола се претходно објаснети во главата 11: Регулација на генската експресија. Имено, стивнувањето на гените се врши со екстензивни геномски (т.н. глобални) модификации на хистонските протеини, како и со метилација на цитозинските остатоци на широки региони од *DNA*-молекулите. Повеќе студии укажуваат на тоа дека, паралелно со текот на диференцијацијата, расте и процентот на метилација на цитозинските остатоци во геномската *DNA*. Многу веројатно е дека овој процес предизвикува прогресивно и трајно инактивирање на гените, а клетката притоа станува сè подиференцирана и со сè поограничен број на активни гени кои можат да се експримираат. Интересно е што *DNA*-метилацијата корелира и со зголемувањето на хетерохроматинските региони во текот на диференцијацијата. Токму таквите епигенетски механизми обезбедуваат начин за стабилно одржување на својата диференцираност во текот на развојот, како и пренесување на истиот шаблон на стивнување низ клеточните генерации.

Досегашните сознанија укажуваат на тоа дека, кај повеќеклеточните организми, гените кои се вклучени во развојот, шаблоните на диференцијалната транскрипција, како и развојните механизми кои се резултат на овие процеси се еволуциски конзервирани. Оттаму и се очекува дека откријата кај организмите-моделите ќе се однесуваат и на еволуциски блиските организми. Од генетската перспектива, интензивно се работи на идентифицирање и систематизирање на поединечните гени кои се активни во секој посебен клеточен тип.

## Матични (стем) клетки

Со делби и диференцијација на оплодената јајце-клетка кај вишите еукариотски организми се создава целиот ембрион, односно сите клеточни типови во организмот (околу 220 кај цицачите). Во научната литература, поради ваквата способност, оплодената јајце-клетка се означува како **тотипотентна** (од лат. *toti*- форма на *totus* - севкупен, цел и *potens* - моќ, способност) (**слика 18-14**). Слична тотипотентност имаат и спорите на определени организми кои се размножуваат асексуално, какви што се голем број растенија, алги, габи и протозои. Интересно е што кај некои растенија, калусот може да се дедиференцира во тотипотентни клетки од кои може да израсне нов организам. Кај плаценталните цицачи, со делба на зиготот се создаваат и екстра-ембрионските ткива (плацентата), покрај сите ембрионски клеточни типови.



**Слика 18-14:** Поедноставен шематски приказ на постепено диференцирање на клетките настанати со делба на зиготот во текот на ембриогенезата и создавање на структурно и функционално специјализирани ткива. Како што клетките се диференцираат, така им се намалува потенцијалот за создавање на различни ткивни типови.

Во последниве неколку децении е осознаено дека способноста за поголем број клеточни делби и диференцијација немаат сите клетки во ембрионот, туку посебна класа наречени **ембрионските матични (стем) клетки**. Тие се недиференцирани и можат да создадат кој било клеточен тип во организмот. Поради тоа, ембрионските матични клетки се **плурипотентни** (од лат. *plurimus* - мошне многу, многубројни). Кај вертебралните, ембрионските матични клетки се способни за диференцирање во сите три герминативни ткивни слоеви: ендодерм (кој ја обложува мукозата на гастроинтестиналниот и респираторниот тракт), мезодерм (крв, мускули, коски и урогенитален тракт) и ектодерм (епидермис и нервно ткиво). Во текот на натамошните делби доаѓа до постепено и неповратно ограничување на активноста на гените и предизвикува структурно-функционална специјализација на клетката. Важно е што кај човекот и останатите плаценталните цицачи со делбата на овие клетки не може да се создаде самата плацента.

Матичните клетки кај возрасните организми (често означени само како **матични клетки**) немаат толкав голем потенцијал за диференцирање во различни клеточни типови, каков што го имаат ембрионските, па, се смета дека се **мултипотентни** (од лат. *multi* - повеќе). Овие клетки ги обновуваат и дополнуваат клетките кои умираат во нормални околности (како внатрешниот слој од мукозата на гастроинтестиналниот тракт, на пример), како и оштетените клетки. Матичните хематопоетски клетки во коскената срцевина можат да се диференцираат во еритроцити, леукоцити и тромбцити, но, не и во клетките на нервното или мускулното тки-

во, на пример. Интересно е што делбата и диференцијацијата на матичните клетки се асиметрични: едната од двете клетки-ќерки останува нецелосно диференцирана (т.е. останува матична клетка), додека другата се диференцира во крајниот клеточен тип. На тој начин, популацијата на матични клетки останува константна и покрај создавањето или обновувањето на крајно диференцираните клетки.

Крајно диференцираните ткива содржат матични клетки кои имаат способност за обновување, но, само во ист клеточен тип, па, се дефинираат како **унипотентни** клетки (од лат. *uni*- форма на *unus* - еден, единствен). Такви се, на пример, матичните клетки во мускулното ткиво и во кожата. Според повеќе автори, постои и посебна класа на клетки наречени **прогенитори** кои се разликуваат од матичните клетки според поограничениот број на клеточни делби и уште потесниот опсег на диференцирање во краен клеточен тип.

## Сенесценција

Одамна е забележано дека во култура на ткива во услови *in vitro*, повеќето клеточни линии (какви што се диплоидните хумани ембрионски фибробласти, на пример) создаваат т.н. монослој врз површината на стаклениот или пластичниот сад и рамномерно се делат околу 60 до 70 пати (приближно 8 месеци). Потоа, брзо престануваат да се делат, стануваат метаболично помалку активни и морфолошки делумно се менуваат. Во литературата, ограничениот број делби на клетките во *in vitro* култура се означува и како **Хајфликов лимит**, според научникот (Leonid Hayflick) кој прв го забележал овој феномен во 1960-тите години. Се смета дека овој феномен се случува поради скусување на теломерите во отсуство на заштитната функција на ензимот теломераза. Деталното објаснување на теломерите, феноменот на скусување при репликацијата и теломеразната активност е дадено претходно во текстот.

Ваквата состојба се нарекува **сенесценција** (од лат. *senex*-старост, старо доба). Сенесценцијата се разликува од претходно опишаната квисценција која е реверзибилна состојба и е нормална за некои клетки какви што се неврните кај луѓето. Спротивно, сенесценцијата се случува како резултат на оштетувањата на DNA-молекулот и, во извесна смисла, е поблага алтернатива на апоптозата.

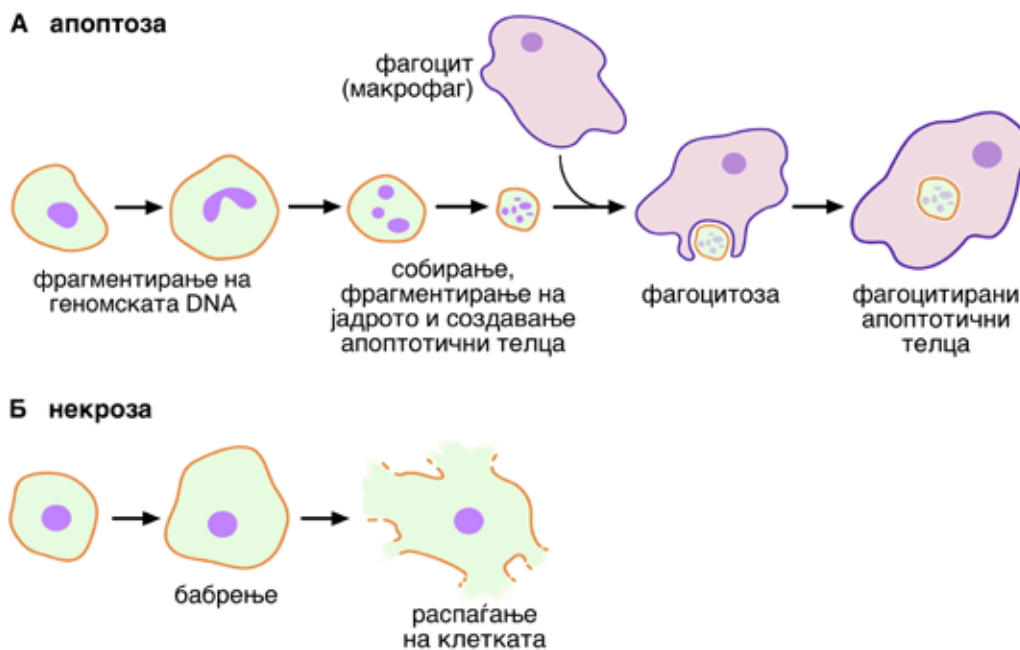
## 18.7 Апоптоза

**Апоптозата** или **програмираната клеточна смрт** е генетски контролиран процес кој е есенцијален за ткивното ремоделирање во текот на ембриогенезата и за одржување на хомеостатската рамнотежа на бројот на клетки кај возрасните организми. Пред повеќе од триесет години, тим на патолози за прв пат го опишал процесот на клеточна смрт кој е морфолошки различен од некрозата и го сковал изразот апоптоза, од грчките зборови: *αἴο* (*ало* = од) и *πτῶσις* (*птаџис* = паѓање). Изразите апоптоза и програмирана клеточна смрт често се користат како синоними во научната литература. Главните морфолошки промени кои се карактеристични за апоптотичните клетки се кондензирањето на хроматинот и збрчкувањето на јадрото (кариопикноза), неговото распарчување (кариорексија) и создавањето тем-



но обоени клеточни фрагменти наречени апоптотични телца. Апоптотичните клетки морфолошки се разликуваат од некротичните (слика 18-15).

За разлика од некрозата, која е патолошка форма на клеточна смрт, апоптозата е нормален процес кој е составен дел од ембриогенезата, развојот на имунолошкиот систем, како и од многу други физиолошки одговори. Пресметано е дека кај секој возрасен човек и во физиолошки услови, секој ден просечно изумираат по околу 60 милиони клетки преку апоптотична смрт. Овие клетки се надоместуваат со



**Слика 18-15:** Шематски приказ на морфолошките разлики меѓу апоптозата и некрозата. **А:** При апоптозата, најпрво се јавува фрагментирање на јадрената DNA, по што следи збрчкување на јадрото и драстично намалување на димензиите на клетката, која често станува фагоцитирана од макрофагите или други фагоцити. **Б:** При некрозата, клетката набрува, нема фрагментирање на хромозомската DNA и завршува со лиза (распаѓање), без нејзина фагоцитоза.

делба и диференцијација на стем-клетките од соодветното ткиво со што се одржува рамнотежата на бројот на клетки во ткивото на определен органи или негов дел. Сепак, во некои ткива, какво што е нервното, на пример, невроните не се обновуваат и нивниот број постепено опаѓа со возраста. Нарушувањата на деликатната рамнотежа на апоптозата често е причина за сериозни патолошки состојби. Прекумерната апоптоза или, пак, необновувањето на клетките кои исчезнале со апоптотична смрт е инволвирано во патогенезата на голем број чести и значајни заболувања какви што се исхемичните коронарни и церебрални состојби, невродегенеративните болести, сидата и други. Спротивно, недостаточната апоптоза може да предизвика хиперплазија (прекумерен број на клетки) и е вклучена во процесот на малигна трансформација која резултира со канцер. Покрај тоа, недоволното ниво на апоптоза во определени клетки на имуниот систем е главната причина за низа автоимуни заболувања.

## Молекуларни механизми на апоптозата кај цицачите

Голем број клетки во вишите повеќеклеточни организми се програмирани да се самоуништат со апоптоза и преживуваат само со постојано експонирање со антиапоптотични сигнали. Откога ќе се активира, апоптозата се одвива низ повеќе чекори оркестрирани од импресивно голем број на молекули кои ја сочинуваат апоптотичната машинерија чии компоненти, од функционален аспект, можат да се поделат на сензорни и ефекторни молекули.

**Сензорните молекули** се одговорни за екстрацелуларно и за интрацелуларно следење на појавата на физиолошки и патолошки сигнали за почнување на процесот на апоптоза. Овие сензорни молекули се рецептори или кои се сместени на клеточната мембрана или се интрацелуларни и со нив можат да се врзат сигналите (лиганди) за преживување или за смрт на клетката. Сензорите ја регулираат втората класа на компоненти: **ефекторните молекули** кои ги извршуваат чекорите неопходни за апоптотичниот процес. **Каспазите** се фамилија на протеолитички ензими чие име е кованица од англ.: *caspase - cysteine-dependent aspartate-specific proteases*) и имаат главна улога во апоптозата, некрозата и инфламаторните (воспалителни) процеси. Каспазите се синтетизираат и опстојуваат подолго време како нефункционални прекурзори (зимогени или, поконкретно: **прокаспази**), а се активираат со нивно протеолитичко пресекување. Активирање најчесто се врши со каскада на последователни реакции на активирање на една прокаспаза со друга во каспаза (слично како факторите за коагулација).

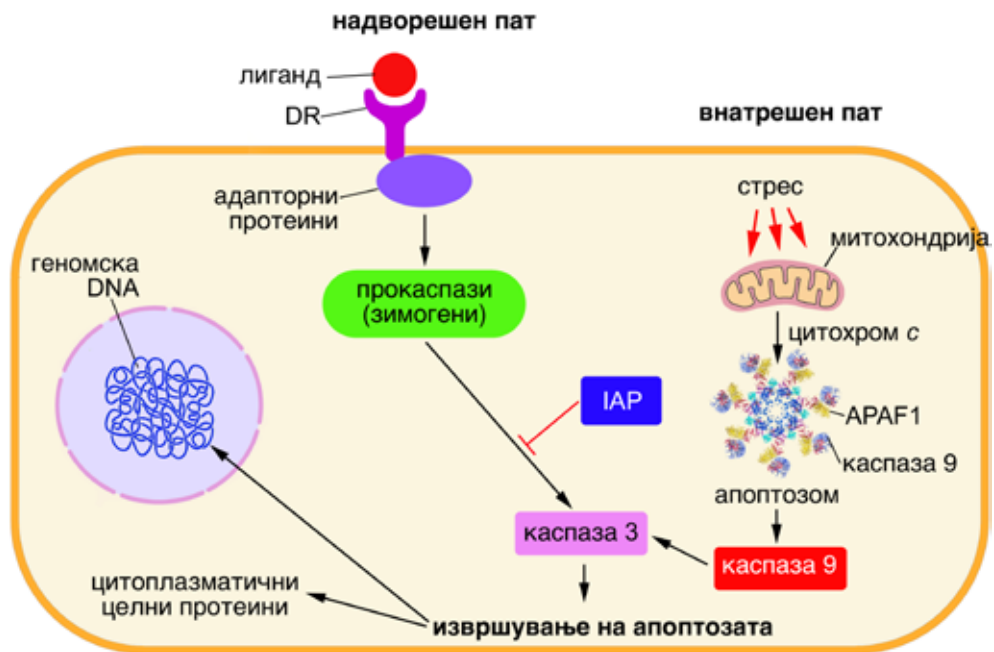
Постојат два главни клеточни апоптотични сигнални патишта кои водат кон програмираната клеточна смрт: надворешниот и внатрешниот пат.

**Надворешниот (екстринсичен) или рецепторен пат**, е посредуван со „рецепторот на смртта“ (**DR**, од англ. *death receptor*) кој е сместен во клеточната мембрана. Поврзувањето на соодветниот лиганд каков што е, на пример: **Fas**, со екстрацелуларниот домен од рецепторот DR предизвикува негова активација и создавање на комплекс на протеински молекули наречен **сигнален комплекс за индуцирање на смрт (DISC)**, од англ. *death-inducing signaling complex*). Комплексот DISC, преку низа на интрацелуларни реакции го пренесува сигналот каскадно и, на крајот, доведува до апоптоза (**слика 18-16**).

Кај **внатрешниот (митохондриски, интринсичен) пат** или **пат индуциран со стрес**, клучен чекор е пермеабилзирањето на митохондриската мембрана што доведува до отпуштање на **цитохромот c**, на други каспази, како и на **факторот за индукција на апоптозата (AIF)**, од англ. *apoptosis induction factor*). Цитохромот c кој се ослободува од митохондриите предизвикува создавање на **апоптозом**, т.е. на мулти-протеински комплекс кој е составен од цитохром c, **каспаза 9**, АТР и од адаптерниот протеин **АРАФ-1**, со што се стимулира и амплифицира активацијата на каспазата 9.

И кај двата апоптотични патишта, активираната каспаза 3 и другите ефекторни молекули предизвикуваат кондензација на хроматинот, фрагментација на геномската DNA, протеолитичка деградација на низа клеточни протеини (ламин, на пример) и, последователно, смрт на клетката.

Апоптозата подлежи и на негативна (антиапоптотична) регулација која делува антагонистички на проапоптотичните регулатори. Еден од ендегените негативни регулатори на апоптозата е **протеинот-инхибитор на апоптозата (IAP)**, од англ. *inhibitor of apoptosis*)



**Слика 18-16:** Поедноставен шематски приказ на двата основни апоптотични патишта. Надворешниот пат се активира при врзување на соодветен лиганд (протеинот Fas, на пример) со површинскиот рецептор DR. Примарна улога во активацијата на внатрешниот пат играат митохондриите. Активацијата на кој било од двата пата доведува до извршување на апоптозата. Инхибиторниот протеин IAP делува блокирачки врз пренесувањето на проапоптотичниот сигнал. Кратенките се објаснети во текстот.



# МОЛЕКУЛАРНА БИОЛОГИЈА И ГЕНЕТИКА НА МАЛИГНИТЕ ЗАБОЛУВАЊА

## Глава 19

**М**алигните заболувања се втора најчеста причина за смртност во развиениот свет, веднаш по кардиоваскуларните болести. И покрај широко распространетото користење, изразот канцер, всушност, опфаќа класа од стотина хетерогени заболувања за кои е заедничка малигната пролиферација на клетките и кои, доколку не се лекуваат ефективно, доведуваат до смрт на организмот. Попрецизно, изразот канцер (рак) се користи за малигните тумори на цврстите ткива, додека леукемиите се малигни неопластични заболувања на белата крвна лоза. Повоопштен стручен израз е неоплазма (потекнува од старогрчкиите зборови: νεο - ново и πλασμα - создавање, раст) и се однесува и на бенигните и на малигните тумори.

### 19.1 Кус историјат на проучувањето на канцерот

Поновите истражувања укажуваат на тоа дека канцерот се појавил рано во текот на еволуцијата на метазојските организми (уште пред најмалку 600 милиони години). Оттаму, очекувано е да се најдат знаци за тумори во фосилните остатоци кај праисториските животни, особено кај сочуваните скелети од диносауруси, хоминоиди и други вертебрати. Засега, лезија со голема веројатност за присуство на тумор е најдена кај фосилот кој потекнува од оклопната риба *Dinichthys* од доцниот девон (датира пред повеќе од 350 милиони години) пронајден во Кливленд, Охајо (САД). Еволуциски најстар фосил кај кој сигурно е докажана неоплазма е најден во Северна Америка кај делумно сочуваниот скелет од фосилизираната риба *Phanerosteon mirabile* од периодот на раниот карбон (пред околу 3000 милиони години). Кај вертебралните фосили, докажан малиген тумор (хондросарком) е најден во остатоците од тераподниот диносаурус (*Allosaurus fragilis*) со потекло од доцна Јура најдени во Јута (САД). Подоцна е најдена фосилна коска со повеќе лезии кои одговараат на метастази во остатоци од голем терестричен диносаурус најден во Колорадо (САД), исто

така од периодот Јура. Во секој случај, возможно е дека бројот на тумори е потценет кај праисториските животни, со оглед на тоа што заболените индивидуи биле лесен плен за грабливците, па, можно е да не оставале фосилни остатоци.

Најдени се докази за тумори кај Египетските мумии постари од 5000 години. Покрај тоа, идентифицирани се и хиероглифи со опис на тумор на дојка (определена старост на документот е околу 1600 години п.н.е.). Идентификацијата на хиероглифи со опис на тумор на дојка (определена старост на документот е околу 1600 години п.н.е.) укажуваат на тоа дека овие заболувања биле познати на старите Египќани. Покрај тоа, археолозите пронашле документи од Сумерскиот период во Месопотамија (околу 3000 години п.н.е.) во кој детално се опишува заболување кое одговара на определен тип на рак. Слични описи во документи со старост од пред околу 2000 години п.н.е. се најдени и во Санскритските записи, како и во древната Кина. Околу 300 години п.н.е., Хипократ го нарекол ова заболување: рак (*καρκίνοσ*) поради неопустливата природа на болеста, слична на истоименото животно. Оттаму потекнува и изразот карцином. Подоцна, Целсус (приближно 25-50 година) го превел називот на латински - *cancer*. Убеден во своите размислувања засновани на дисекциите кои ги вршел, Римскиот лекар Гален (*Aelius Galenus or Claudius Galenus*) (129-199/217 година) сметал дека ракот настанува поради неправилно мешање на телесните течности. Многу ретки се докажаните тумори во сочуваните човечки остатоци од преантичките и античките времиња. Тоа укажува на интересниот заклучок дека канцерот бил веројатно редок кај праисторискиот човек и во античкиот период.

Според историските записи, се стекнува впечаток дека туморите стануваат почести во Средниот век. Во 1775 година, Сер Пот (*Sir Percivall Pott*) остроумно го поврзал експонирањето кон чад од оцаците кај оџаچارите со честата појава на карциноми на кожата на скротумот. Тоа е прв доказ на професионална експозиција и прв доказ дека канцерот може да биде предизвикан со енвиронментален карциноген. Модерниот патолошки осврт кон клеточната теорија за канцерот го поставил Вирхов (*Rudolf Ludwig Karl Virchow*) кон крајот на 19-тиот век, а произлегува од својата прочуена теорија: секоја клетка потекнува од клетка (лат. *Omnis cellula e cellula*).

Проучувајќи ги под микроскоп, фон Ханземан (*David von Hansemann*) во 1890 година, забележал дека малигните клетки при делба имаат бизарни делбени вретена и разни хромозомски аберации. Неколку години подоцна, Бовери (*Theodor Boveri*), претпоставил дека канцерот е последица на нарушувањата на хромозомите и клеточната делба, и со тоа, за прв пат ја поставил генетската основа на малигните заболувања. За жал, неговите согледувања не наишле на пошироко прифаќање во научната заедница во тоа време.

Во првата половина на 20-иот век се направени низа на клучни откритија: вирусната етиологија на некои форми на рак кај животните, улогата на имуниот систем и на хормоните во развојот на малигните болести, малигните стем-клетки и ангиогенезата, како и поврзаноста на пушењето со ракот.

Интензивниот развој на научните истражувања и откритија поврзани со канцерот продолжува и во втората половина на 20-иот век: повторно е возобновена улогата на мутациите во канцерогенезата, опишани се специфични хромозомски транслокации кај некои типови леукемии, откриени се тумор-супресорските гени, а подоцна и онкогените, забележана е важноста на апоптозата и на околните немалигни клетки во развојот на туморите, воспоставена е хипотезата за клонална еволуци-

ја на ракот и за канцерогенеза во повеќе чекори, улогата на епигенетските промени и нарушувањата на клеточниот циклус, како и на наследната предиспозиција кај некои тумори. Во последниве дваесет години, актуелни се истражувањата за механизмите на генетска нестабилност кај канцерот и научната и клиничката важност од профилирањето на генската експресија кај поединечните неоплазми. Пред десетина години се објавени резултатите од првите клинички студии за користењето на т.н. таргетирана терапија на канцерот.

Нема сомнение дека поновиот развој на молекуларната биологија и генетика овозможил најголем исчекор во научните истражувања на малигните процеси и примена на добиените сознанија во праксата.

## 19.2 Дефиниции за канцерот

Првичните научни дефиниции за канцер биле повеќе дескриптивни и непрецизни. На пример, една дефиницијата за тумор од 1922 година е: „ткивен израсок кој е независен од законите кои важат за останатите органи на телото“. Во приближно истиот период, функционалната карактеристика на канцерот била дефинирана на следниов начин: „неопластичниот израсок нема никаква корисна функција за организмот“. Подоцнежните дефиниции за канцерот варираат според контекстот кој го опишуваат. Некои автори неопластичниот процес го дефинирале како неконтролирана клонална пролиферација на клетките која може да настане во речиси кој било клеточен тип во организмот. Други автори канцерот го опишувале како заболување при кое клетките пролиферираат (се делат) во несоодветен број и во несоодветни локации во организмот. Едно од гледиштата кон неопластичниот процес е нарушувањето на рамнотежата, т.е. на одржувањето константен број и големина на клетките во определено ткиво или орган (**слика 19-1**).

**Слика 19-1:** Шематски приказ на хомеостатската рамнотежа меѓу клеточната делба и смрт во нормалните клеточни популации и ткива кај возрасните организми.



Современите концепти на малигните неоплазми се базираат врз неколку различни клучни аспекти: од тоа дека канцерот е заболување на геномот, пред сè, но, и дека ги вклучува нарушувањата на фундаменталните процеси на клеточните функции какви што се клеточниот циклус, сигналната трансдукција, репарацијата на DNA, апоптозата и други.

### Основна терминологија

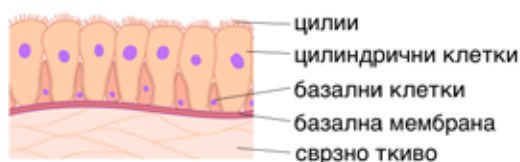
Неконтролираната пролиферација на клетките и нивната инвазија во околните ткива, како и способноста да се пренесуваат во оддалечени места во организмот се клучни карактеристики за малигното однесување на канцерот. За разлика од малигните, бенигните тумори најчесто се помалку опасни за организмот (освен во определени анатомски локации, како во мозокот, на пример), не метастазираат и немаат толкав потенцијал за дисеминирање на болеста, како ракот.



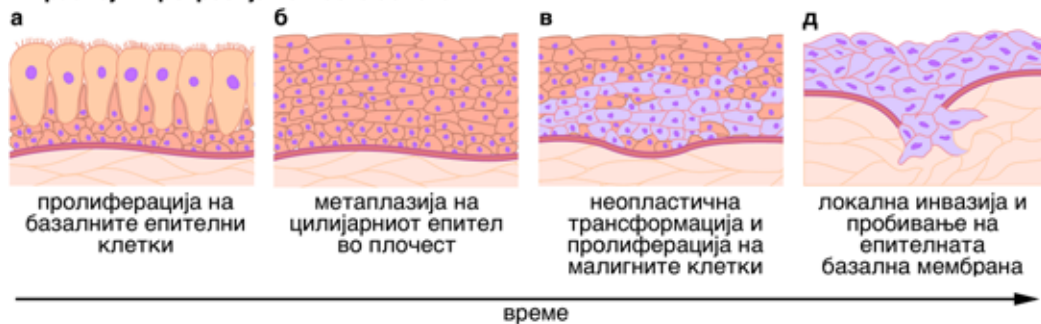
Крајно поедноставено, бенигните тумори на епителното ткиво се нарекуваат воопштено епителиоми, а попрецизно, во зависност од ткивниот тип (на пример, аденомите се бенигни тумори на жлездестиот епител). Бенигните тумори кои потекнуваат од мезенхималните ткива се нарекуваат според ткивниот тип: миоми (мускулно ткиво), хондроми (рскавично ткиво), остеоми (коскено ткиво) итн. Наспроти тоа, малигните тумори од епително потекло се нарекуваат карциноми. Аденокарциномите се малигни неоплазми на жлездестиот тип на епително ткиво, додека планоцелуларни (или сквамозни) се карциномите на повеќеслојниот епидермален тип епител. Малигните тумори на мезенхималните ткива се нарекуваат саркоми, на пример: миосарком, хондросарком, остеосарком итн. Леукемиите и лимфомите се малигни неоплазми на белата крвна лоза и на лимфното ткиво, соодветно. Малигната трансформација опфаќа низа на постепени морфолошки и функционални промени на нормалното ткиво во малигно (слика 19-2). Кај карциномите, неопластичната трансформација создава локална туморска формација која може да резултира со инвазија на базалната мембрана, навлегување на малигните клетки во лимфните и крвните садови и дисеминирање на неоплазмата на оддалечени места во организмот.

Малигната трансформација може да се случи во речиси секој клеточен тип и во секој орган од човековиот организам.

#### А нормален респираторен епител



#### Б развој и прогресија на неоплазмата



**Слика 22-2:** Шематски приказ на постепени морфолошки промени при малигната трансформација на нормалниот респираторен епител од белодробното ткиво во инвазивен карцином. **А:** цртеж според идеализиран изглед на хистолошки пресек од нормалното респираторно епително ткиво со цилиндрични епителни клетки кои имаат трепки (цилии). **Б:** постепена прогресивна трансформација на епителот во малиген тумор. Етиолошкиот фактор (на пример, хронично пушење) доведува до поинтензивна пролиферација на базалните клетки во епителот (**а**), а потоа и до метаплазија, односно промена на епителот во попримитивен тип: од респираторен цилиндричен во повеќеслоен плочест (**б**). Натомошната трансформација на клетките доведува до создавање на карцином *in situ* (**в**), а потоа и инвазивен карцином кој ја пробива на базалната мембрана (**д**) и има потенцијал за локална инвазија на ткивата и метастазирање преку крвните и лимфните садови од сврзното ткиво.

### 19.3 Епидемиологија на малигните заболувања

Канцерот е втора најчеста причина за смртност во развиениот свет, веднаш по кардиоваскуларните болеси. Статистички, речиси секој трет човек од Западната цивилизација ќе се стекне со малигно заболување во текот на својот живот, а кај секој петти ќе предизвика смрт. Во Светски рамки, секој осми смртен случај е последица на ракот. Пресметано е дека само во 2008 година, во Светот се откриени нови 12,7 милиони случаи на малигни заболувања, а починале 7,6 милиони заболени.

Стапката на смртноста (морталитетот) од најчестите форми на малигни неоплазми во Светски рамки, изразен на годишно ниво на популација од 100000 жители во истата година, е прикажан во **табелата 19-1**.

<b>Табела 19-1: Морталитет од малигни заболувања во Светски рамки во 2008 г.</b>	
<b>орган</b> (прикажани се само по 6 најчести за секој пол)	годишна стапка на смртност (на 100000)
<b>мажи</b>	
бели дробови и бронхи	22,5
црн дроб	11,3
желудник	11,0
колоректум	7,6
хранопровод	6,5
простата	6,1
<b>жени</b>	
дојка	13,7
бели дробови и бронхи	12,7
колоректум	8,6
грло на матка	8,2
желудник	8,2
црн дроб	4,6

Извор: GLOBOCAN 2008, Интернационална агенција за истражување на канцерот (IARC, од англ. International Agency for Cancer Research). Податоците се стандардизирани во однос на возраста и пресметани се за 2008 година.

Пресметаниот морталитет од шесте најчести типови малигни неоплазми во Република Македонија, изразен на годишно ниво на популација од 100000 жители, е прикажан во **табелата 19-2**.

Стапките на инциденција (т.е. бројот на нови случаи на некоја популација, најчесто на 100000 жители, изразен на годишно ниво) на определени видови рак значително се разликуваат ширум светот. Сепак, кога луѓето мигрираат од едно место на живеење во друго, нивната инциденција на канцер станува сè послична со онаа на луѓето кои подолго живеат на новата локација. За таквата промена на епидемиолошкиот профил често се потребни повеќе децении, што укажува дека факторите од животната средина делуваат во текот на подолг временски период додека предизвикаат рак. Покрај тоа, епидемиолошките студии утврдиле дека голем број енвайронментални агенсии ја зголемуваат веројатноста за појава на рак. Најголем број од овие агенсии се мутагените хемиски соединенија, но, постојат и канцерогени агенсии кои не се мутагени, какви што се алкохолот и естрогенот, на пример.

**Табела 19-2: Морталитет од малигни заболувања во Македонија во 2011 г.**

<b>орган</b> (прикажани се само по 6 најчести за секој пол)	годишна стапка на смртност (на 100000)
<b>мажи</b>	
бели дробови и бронхи	61,8
желудник	22,6
простата	14,3
црн дроб и жолчни патишта	12,9
колон	10,8
ректум	10,5
<b>жени</b>	
дојка	26,3
бели дробови и бронхи	12,4
желудник	10,9
колон	9,5
панкреас	7,9
јајник	7,9

Извор: Институт за јавно здравје на Република Македонија (Малигни неоплазми во Република Македонија 2009-2001). Податоците се стандардизирани во однос на возраста и пресметани се за 2011 година.

Еклатантен пример за хемиски канцероген агенс е чаdot од цигарите: луѓето кои пушат во текот на поголем број години имаат многу поголем ризик од рак на белите дробови, отколку луѓето кои не пушат, а ризикот се зголемува со бројот на консумирани цигари и времетраењето на пушењето. Досега се идентифицирани голем број на хемиски канцерогени агенси: голем број индустриски продукти (некои пестициди и индустриски нуспродукти), продукти од микроорганизмите (афлатоксините, на пример), како и природни соединенија и минерали (какви што се нафтата и азбестот).

Канцерогено дејство можат да имаат и некои физичките агенси (UV-светлина и јонизирачкото зрачење).

Акутната или хроничната експозиција кон хемиските и физичките канцерогени агенси драстично го зголемува ризикот од определени типови на малигни неоплазми. Важно е што дури и малите дози кон кои организмот е изложен во текот на подолг период, можат да имаат кумулативен ефект и значителен потенцијал за развивање на рак.

Во мутагените агенси кои предизвикуваат рак се вклучени и биолошки ентитети какви што се некои вируси како што е објаснето подолу во текстот.

Епидемиолошките студии укажуваат на корелациите меѓу определени енвайронментални фактори и инциденцијата на канцер. На пример, црнодробниот рак е релативно редок во Западните земји, а е најчестиот тип на канцер во Кина и во соседните земји, најверојатно заради високата застапеност на инфекција со вирусот хепатитис С и присуство на афлатоксини во храната кај оваа популација.

Покрај ови агенси од надворешната средина, утврдени се и определени здравствени фактори кои имаат епидемиолошко влијание врз појавата на канцер, какви што се зголемената телесна тежина и физичката неактивност.

## 19.4 Канцерот како најчесто генетско заболување

Уште одамна е забележана поврзаноста на генетските фактори со разните типови на канцер, како и дека повеќето агенси (јонизирачкото зрачење и некои хемиски соединенија) кои предизвикуваат генетски нарушувања се, исто така, и канцерогени. Покрај тоа, пред четириесетина години е откриено дека определени цитогенетски абнормалности (транслокации и анеуплоидии, на пример) често се наоѓаат кај некои форми на канцер. Дополнително сознание кое допринело кон расветлување на генетската природа на ракот е и ретката форма на ретинобластом (малигна неоплазма на ретината) кај децата која се наследува автозомно доминантно. Сепак, најголемиот број случаи на канцер не следат некоја форма на класично генетско наследување (во смисла на доминантност или рецесивност), па, долго била игнорирана концепцијата за генетската природа на овие заболувања.

Голем број епидемиолошки истражувања ја поддржуваат хипотезата дека повеќето видови рак настануваат случајно во соматските клетки во текот на нивната делба и диференцијација во текот на ембриогенезата или кај возрасната индивидуа. Имено, постојат многу докази дека мутациите кои се случуваат кај најголем процент од типовите на канцер **не се наследни**, туку настануваат спорадично во населението како резултат на изложеност кон определени хемиски соединенија, физички агенси или вируси кои се присутни во животната средина.

Еден показател дека наследноста нема голем удел кај настанувањето на поголемиот број типови на канцер е степенот на конкорданција (изразот е претходно објаснет). Имено, конкорданцијата е ниска за ист тип на рак кај роднини од прв степен, какви што се браќата и сестрите, па, дури и кај идентичните близнаци. Со други зборови, истата форма на канцер ретко се јавува и кај братот и кај сестрата или и кај едниот и кај другиот близнак, односно близначка. Оваа констатација се однесува на повеќето форми на рак кај населението во целина, иако постојат определени исклучоци.

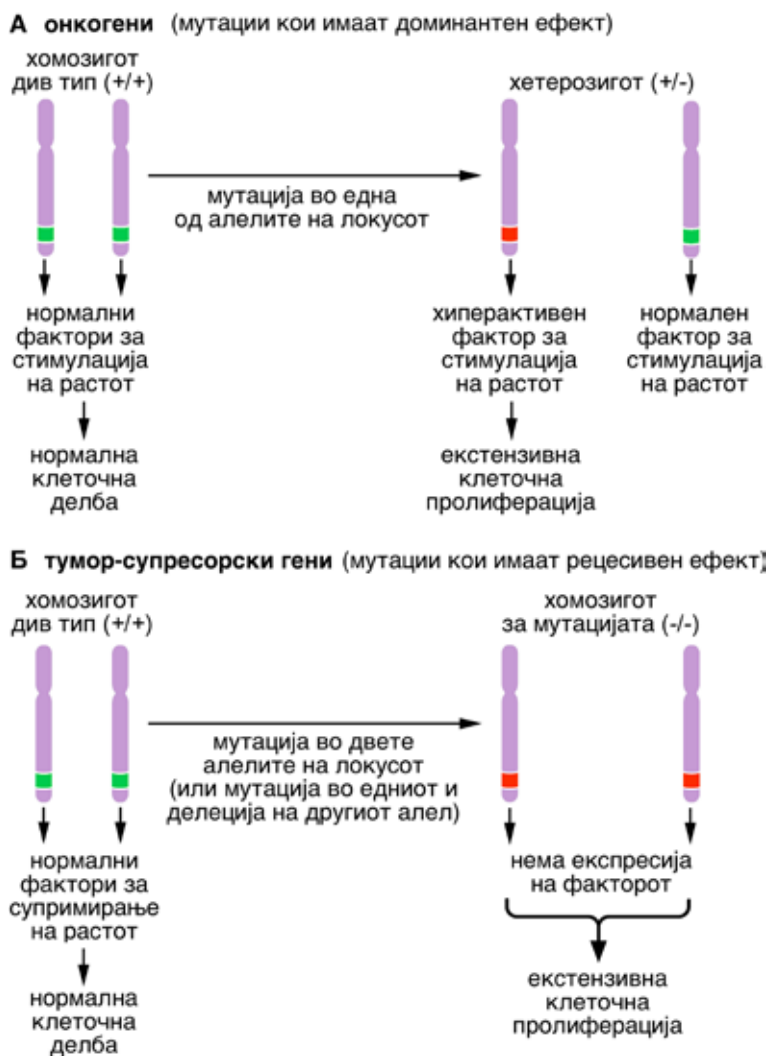
Истражувањата спроведени во последниве неколку децении несомнено укажале дека кај сите досега проучени форми на канцер кај луѓето се јавуваат помалку или повеќе изразени генетски абнормалности. Современиот став е дека канцерот е генетско заболување, предизвикано од мутации и други генетски абнормалности во соматските клетки, додека помалку од околу 1% од сите типови на канцер се херидитарни. Ваквиот пристап имплицира дека канцерот е најчестото генетско нарушување кај човекот, но, генетските промени ги афектираат соматските клетки. Оваа констатација делува изненадувачки наспроти широко распространетото сфаќање дека најчестите генетски заболувања се наследните.

Покрај тоа, се смета дека секој поединечен тип на неоплазма и секој заболел пациент со канцер се уникатни. Се смета дека сите типови на канцер имаат слична патогенеза и се последица на Дарвиновата еволуција во геномите на повеќеклеточните виши анимални организми. Ваквата микроеволуција се заснова на два процеса: континуирано акумулирање на случајни мутации во геномите на поединечните клетки, од една страна, и природната селекција која делува врз промените на фенотипските карактеристики на тие клетки, од друга страна. Од тој аспект, некои автори сметаат дека секој поединечен пациент со рак е посебен, неуспешен, природен експеримент на еволуцијата.

## Концепт за онкогени и тумор-супресорски гени

Од историски аспект, мутираните форми на гените кои се поврзани со појавата на рак кај експерименталните животни првично биле наречени онкогени. Подоцна е утврдено дека онкогените всушност се составени од две групи на гени меѓу кои постојат крупни разлики во однос на ефектот врз малигната трансформацијата. Имено, активирачките мутации или прекумерната експресија на едната група гени имаат доминантен ефект и доведуваат до неконтролирана активност и поттикнување на непрестаната клеточна делба и раст, па, првичниот термин **онкогени** е резервиран за нив (слика 19-3, А). Спротивно, инактивирачките мутации во некој од другата група гени има рецесивен ефект и нивната недостаточна биолошка активност ја поттикнува неконтролираната клеточна пролиферација, па, се наречени **тумор-супресорски гени** (слика 19-3, Б).

Подоцна е предложено немутираните форми на онкогените да се наречат протоонкогени, но, не постои аналогно означување и за тумор-супресорските гени.

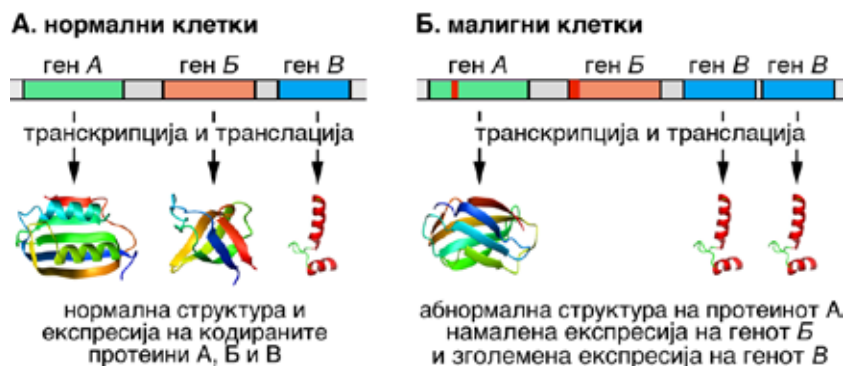


**Слика 19-3:** Влијанието на мутациите врз клеточната пролиферација е различно кај онкогените во споредба со тумор-супресорските гени. Нормалните алели (од див тип) во соодветниот локус на генот шематски се прикажани со зелена боја, додека мутираните алели се обоени црвено. **А:** мутациите во протоонкогените имаат доминантен ефект, па, доволно е само едниот алел да стекне активирачка мутација за да се наруши клеточниот циклус. **Б:** инактивирачките мутации во тумор-супресорските гени се рецесивни поради тоа што, за да се предизвика дерегулацијата на клеточниот циклус, неопходно е и двете алели да не кодираат функционален протеински продукт.

Сликовито изразено, некои автори ги споредуваат мутираните онкогени со расипаната педала за гас во автомобилот што предизвикува неконтролирано и пребрзо возење, додека мутираните тумор-супресорски гени ги споредуваат со дефектната кочница, при што постои голем ризик од несакани последици.

Повеќе детали за онкогените и тумор-супресорските гени се дадени понатаму во оваа глава.

Молекуларните механизми кои се одговорни за нарушувањето на функции на клучните гени за канцерогенезата вклучуваат: квантитативни промени во DNA-секвенцата (точкести супституциски мутации, делеции и инсерции), како и квантитативни промени на генската експресија (поради генски дупликации, амплификации, реаранжмани на гените, инсерција на ретровирусни секвенци и други) (слика 19-4).



**Слика 19-4:** Шематски приказ на некои од промените во протеинската структура и на генското дозирање кај малигните клетки. **А:** кај нормалните клетки од соодветниот ткивен или клеточен тип постои карактеристична комбинација на правилно експримирани протеински производи на гените. **Б:** кај малигните клетки, активирачките или инактивирачките точкести мутации предизвикуваат абнормална конформација на протеините, а со тоа ја менуваат (засилуваат, намалуваат или целосно ја нарушуваат) нивната функција. Покрај точастите мутации, амплификациите, дупликациите или делециите на гените доведуваат до нарушувања на нивоата на експресија на нивните протеински производи, во однос на тие кај здравите клетки.

Промените на нивоата на експресија на протеинските производи можат да бидат резултат и на мутации во промоторите на афектираните гени, како и на епигенетски ефекти (промена на метилацијата на генот, на пример). Покрај нив, карактеристично е и губењето на хетерозиготност (т.е. делеција на една копија од алелната DNA-секвенца), промени во бројот на поединечни хромозоми со истовремена геномска нестабилност, како и промени во микросателитната DNA.

Клетките на повеќето малигни неоплазми содржат разни хромозомски аберации. Во текот на последниве децении, генетичарите дебатираат дали овие абнормалности се причина или, пак, се последица на малигната трансформација. Некои типови на неоплазми се константно поврзани со специфични хромозомски аберации. На пример, кај околу 90% од пациентите со хронична миелоидна леукемија е присутна реципрочна транслокација меѓу хромозомите 22 и 9, а подетално е објаснета подолу во текстот.

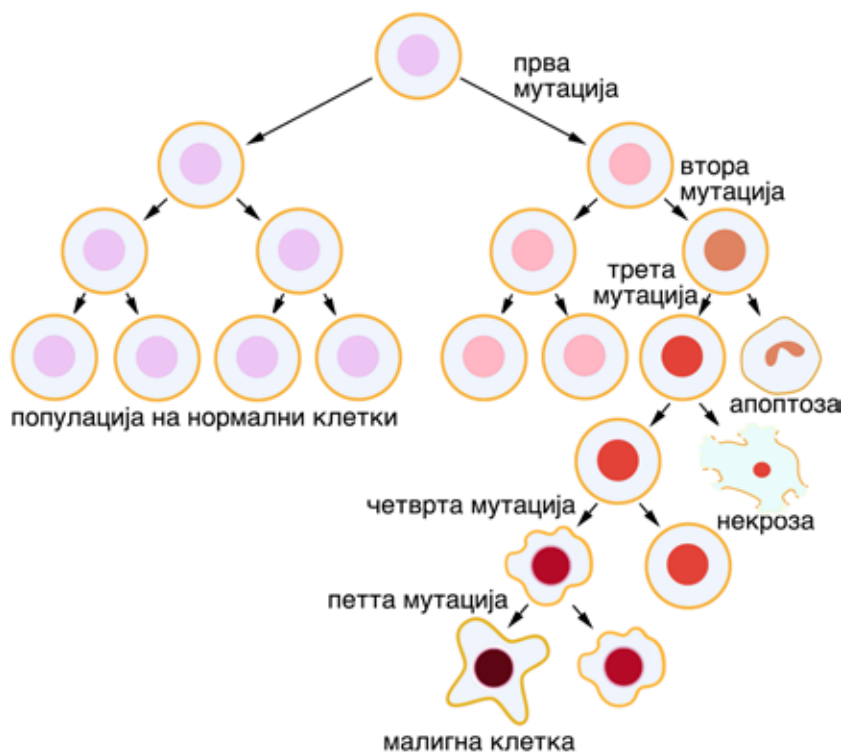
Мутациите во гените кои кодираат протеини кои учествуваат во хромозомската сегрегација можат да предизвикаат анеуплоидии и други цитогенетски абнор-



малности, а со тоа, учествуваат во малигната трансформација. Голем број малигни клетки се анеуплоидни, а хромозомските аберации какви што се дупликациите, делециите, инверзиите и транслокациите на определени гени, јасно придонесуваат за прогресијата на ракот.

### Клонална еволуција кај неоплазмите

Поедноставено, процесот на малигна трансформација започнува кога во една клетка се случува мутација која предизвикува невообичаено брз клеточен циклус. Во текот на пролиферацијата, доаѓа до појава на определен клон од клетки кои имаат иста мутација. Бидејќи клетките на овој клон се делат побрзо од нормалната стапка, наскоро ги надраснуваат по бројност останатите клетки. Дополнителните случајни мутации која се случуваат во некои од клетките на клонот уште повеќе можат да ја подобрат пролиферативната успешност, па, клетките кои имаат по две мутации наскоро стануваат најбројни во клонот клетки (слика 19-5).



**Слика 19-5:** Шематски приказ на процесот на клонална еволуција на клетките во кои се акумулираат мутации во разни гени и кое постепено предизвикува генетски, биохемиски и морфолошки промени и резултира со создавање на популација на малигни клетки.

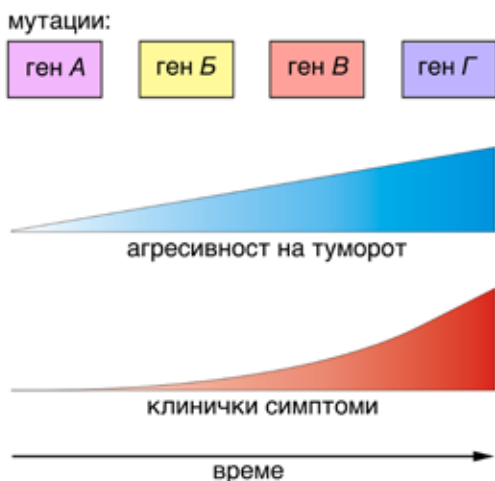
Постепено, во поединечните клетки се појавуваат и други случајни мутации и генетски абнормалности кои можат имаат различни последици врз поединечните клетки или врз нивните субпопулации. Критичната комбинација на мутации и други



генски абнормалности може да ги активира сочуваните молекуларни механизми за детекција на геномски промени и да ја одведе клетката во апоптоза. Некои мутации во определени гени можат да бидат неспоиви со натамошниот живот на клетката и да предизвикаат нејзина некроза. Спротивно, сосем различна комбинација на генски промени можат да доведат до адаптивни способности на клетките и до други особини какви што се: уште поголемата пролиферација и поагресивно однесување, нечувствителност кон антипролиферативните и кон апоптотичните сигнали, активирање на теломеразата и многу други.

Овој процес, наречен клонална еволуција, постепено доведува до селективна предност на клонот клетки кој содржи определена комбинација на генетски промени што ги прави поуспешни во делбата и преживувањето во однос на немалигните клетки. Имено, кај клетките кои сè уште не акумулирале такви мутации, ќе се активираат клеточните механизми за репарација на мутациите или ќе се индуцира апоптозата. Стапката на клоналната еволуција зависи од фреквенцијата со која се појавуваат новите мутации. Интересно е што секој генетски дефект кој му овозможува на клонот клетки стекнување на уште повеќе мутации, всушност ја забрзува прогресијата на малигната трансформација. Оттаму, не зачудува што гените кои ја регулираат репарацијата на DNA често се мутирани во клетките на напредните типови канцер, а наследните нарушувања на овие репаративни механизми обично се карактеризираат со зголемена инциденција на канцер. Поради тоа што клеточните механизми за репарација на DNA вообичаено ги елиминираат повеќето случајни мутации, токму клетките со неисправни механизми имаат поголема веројатност да ги задржат случајните мутации отколку нормалните клетки, вклучувајќи ги и мутациите во гените кои ја регулираат клеточната делба.

Важно е да се има предвид дека акумулирањето на генетските промени е проследено со интензивирање на клеточната пролиферација и со зголемување на агресивноста на клоналната популација на клетки кон здравите структури на околните клетки и ткива, а подоцна во текот на процесот и со метастазирањето и воопшто, влошување на клиничката слика како последица на неоплазмата (слика 19-6).



**Слика 19-6:** Шематски приказ на постепено акумулирање на мутации во повеќе гени во малигните клетки што доведува до зголемување на агресивноста на растот на туморот и до брза појава на клиничките манифестации на болеста.

## Мутациска стапка кај клетките на канцерот

Кај луѓето, пресметаната стапка на соматски мутации изнесува околу  $10^{-6}$  по ген во секоја клеточна делба и главно се должи на грешки при DNA-репликацијата. Со оглед на тоа што во текот на просечниот животен век на човекот се случуваат околу  $10^{16}$  клеточни делби, во тој период се јавуваат по  $10^{10}$  генски мутации во организмот. Сепак, речиси сите мутации успешно се поправаат со еден или со оркестрирана активност на повеќе репарациски механизми кои се претходно опишани. Постојат голем број докази дека една мутација не е доволна за појава на клинички манифестно малигно заболување кај луѓето.

Експерименталните податоци индицираат дека една од главните молекуларни карактеристики на малигните клетки е токму повисоката стапка на мутации и, воопшто, геномската нестабилност, во споредба со клетките од нормалното ткиво на истата индивидуа. Високиот степен на геномска нестабилност е познат како **мутаторен фенотип**.

Иронично е што, според некои истражувачи, всушност, мутациите во гените задолжени за геномската стабилност (претежно вклучени во DNA-репарациските механизми) се јавуваат релативно рано во процесот на малигна трансформација на нормалните клетки и предизвикуваат нагло зголемување на мутациската стапка на растечкиот клон клетки. Во текот на клоналната еволуција, маѓепсаниот круг на постојано зголемување на мутациската стапка доведува до стекнување случајни мутации кои можат да резултираат со нови фенотипски карактеристики на клонот клетки и нивна селективна експанзија. Овие автори сугерираат дека процесот на малигна трансформација би бил неефикасен и пребавен доколку не би била вклучена геномската нестабилност предизвикана од мутациите во наведените гени.

Поновите истражувања покажуваат дека во секоја поединечна малигна клетка има по десетици илјади различни мутации, но, само мал број од нив се критично важни за процесот на малигна трансформација и одржување на малигниот фенотип.

## Функционална класификација на гените вклучени во канцерогенезата

Се смета дека клучно за патогенезата на канцерот е постепеното акумулирање на поголем број молекуларни абнормалности кои доведуваат до стекнати (ненаследени) клеточни карактеристики. Таквите молекуларни нарушувања се должат на веќе опишаните механизми (активирачки или инактивирачки мутации, зголемена или намалена експресија итн.) во протоонкогените, тумор-супресорските гени, но, и во други гени кои, навидум, не припаѓаат на овие две основни класи на гени кои се вклучени во малигната трансформација на клетките.

Заради поголема систематичност, еминентниот истражувач во областа на биологијата на канцерот Вајнберг (Robert Weinberg), во исклучително цитираниот труд објавен во 2000 година, предложил модел според кој малигните клетки во солидните тумори (исклучувајќи ги леукемиите) имаат особини кои можат да се класифицираат во шест функционални групи на фенотипски карактеристики - белези.

Тие основни белези, според Вајнберг, се:

1. мутации во протоонкогените предизвикуваат континуирана клеточна пролиферација;
2. мутации во тумор-супресорските гени предизвикуваат клетките да станат нечувствителни на антипролиферативни сигнали;
3. прекумерна експресија на антиапоптотичните сигнали или потиснатата експресија на проапоптотичните сигнали предизвикуваат избегнување на апоптозата;
4. активирање на теломеразата овозможува неограничен репликациски потенцијал;
5. клетките стануваат способни за инвазија на соседните ткива и дисеминирање во оддалечени органи (метастазирање) и
6. создавање на нови крвни садови во туморското ткиво (неоангиогенеза или неоваскуларизација) овозможува непречен раст на малигните тумори.

Се разбира, ваквата класификација не исклучува меѓусебни интеракции меѓу молекулите кои учествуваат во некои од функционалните групи, односно, определени генски продукти можат да имаат биолошки ефекти врз повеќе од една функционална група. Тоа само покажува колку е висока комплексноста на молекуларните механизми кај канцерот.

## 19.5 Онкогени и патишта за пренесување на сигналот за делба

Регулацијата на клеточниот циклус ја вршат голем број на внатрешни и надворешни сигнали. Екстрацелуларните сигнали се во форма на стероидни и пептидни хормони, како и протеински фактори за раст и транскрипција фактори. Овие молекули можат да се врзат со специфични рецептори на клеточната мембрана и да предизвикаат серија на интрацелуларни реакции кои го пренесуваат сигналот до јадрото или до други интрацелуларни молекули. Овој тип на систем, во кој надворешен сигнал активира каскада од интрацелуларни реакции кои на крајот доведуваат до специфичен одговор, се нарекува сигнална трансдукција, а неговото нарушување е често поврзано со голем број типови на канцер.

Сигналната трансдукција започнува со врзување на екстрацелуларниот сигнален молекул со специфичен рецептор кој е укотвен во клеточната мембрана. Рецепторите за овие молекули обично имаат три дела: екстрацелуларен домен кој стрчи екстрацелуларно и со кој се врзуваат сигнални молекули; трансмембрански домен, кој поминува низ мембраната спроведувајќи го сигналот во клетката и интрацелуларен домен кој се протега во цитоплазмата. Пренесувањето на сигналот од рецепторот, преку интрацелуларните молекули, па, сè до самите гени, се врши преку последователна активација на протеините. Имено, при врзување на сигналниот молекул, интрацелуларниот домен подлежи на хемиска модификација или на конформациска промена со која сигналот се пренесува каскадно на следниот интрацелуларен молекул кој го посредува соодветниот сигнален пат.

Новоактивираниот протеин го активира следниот молекул во патот, и на овој начин, сигналот се пренесува со каскада на реакции и на крајот доведува до самиот одговор, односно до стимулирање или инхибиција на клеточната делба.

Активацијата често подразбира додавање или отстранување на фосфатни групи или предизвикување промени во структура или конформацијата на протеинот. Еден од најдобрите примери за тоа, особено во дидактички цели, е сигналната трансдукција при регулацијата на клеточниот циклус посредувана со **Ras-протеинот**. Имено овој протеин функционира како GTP-аза и во неактивната форма, е врзан со гуанозин дифосфат, додека во активната форма, е врзан со гуанозин трифосфат (слика 19-7).



**Слика 19-7:** Функционален циклус на немутираниот протеин Ras. Врзувањето на GTP предизвикува активација на протеинот Ras и ја поттикнува клеточната делба, додека хидролизата на GTP до GDP и пирофосфат, го инактивира.

Патот на сигнална трансдукција се активира кога факторот на раст, во овој пример епидермалниот фактор на раст (EGF), се врзува со рецепторите на клеточната мембрана (слика 19-8).

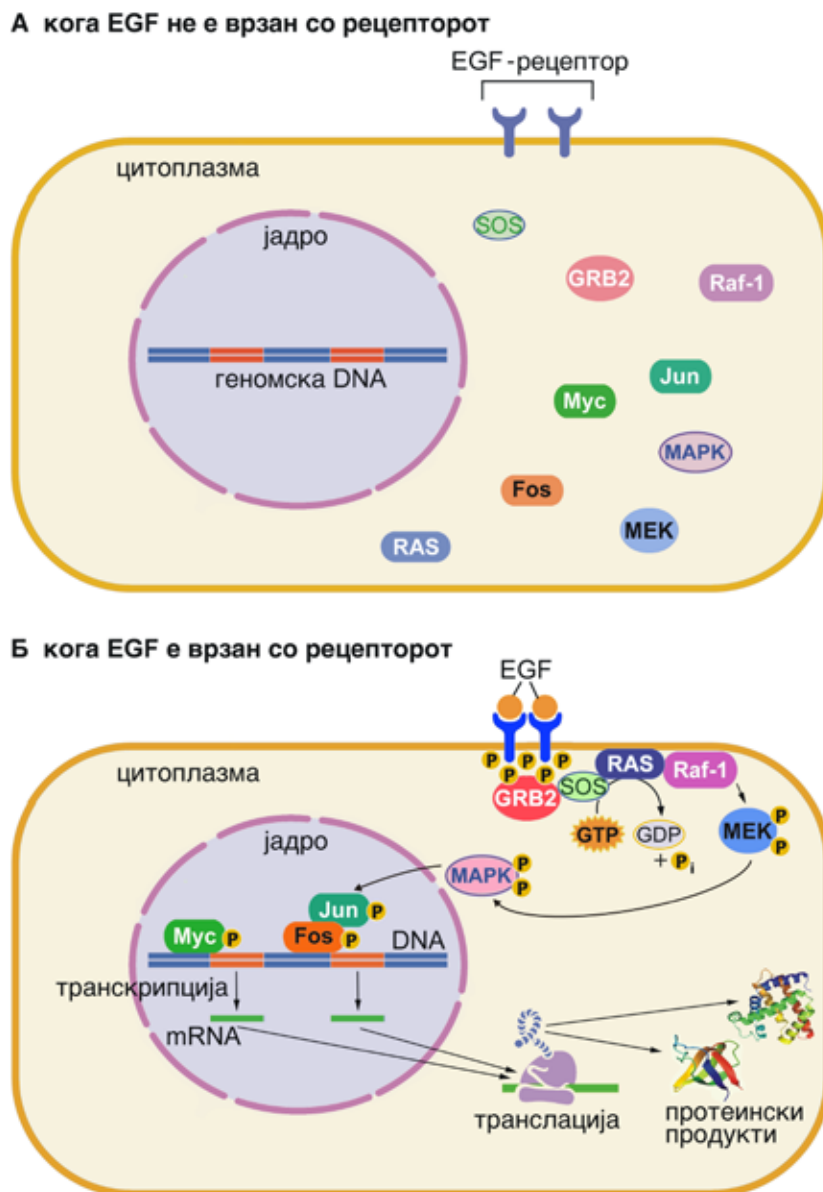
Врзувањето на EGF предизвикува конформациска промена на рецепторот, создавање негов димер и фосфорилација што предизвикува т.н. **адаптерни молекули** да се поврзат со рецепторот и самите да се активираат. Адаптерните протеини GRB2 и SOS каскадно го пренесуваат активирачкиот сигнал на неактивниот Ras (врзан со GDP) со што тој го заменува молекулот на GDP со GTP и со тоа станува активиран. Понатаму, протеинот Ras се врзува со друг протеин наречен Raf-1 и го активира, при што се хидролизира еден молекул на GTP до GDP, а Ras повторно се враќа во неактивна состојба. Активираниот Raf потоа започнува каскада на реакции, преку фосфорилација на протеинот MEK, завршувајќи со активирање на ензимот MAP-киназа. Активираниот MAP-киназа се преместува во јадрото и, исто така преку фосфорилација, активира повеќе транскрипциски фактори кои ја стимулираат трансクリпцијата на определени гени вклучени во регулацијата на клеточниот циклус. На овој начин, првичниот надворешен сигнал, на крајот, предизвикува стимулирање на клеточната делба. Идентифицирани се голем број други патишта на сигнална трансдукција кои влијаат врз клеточниот циклус и врз пролиферацијата.

Протеинските продукти на досега откриените протоонкогени, кои можат да мутираат во онкогени, се фактори на раст и нивните соодветни рецептори, интрацелуларни сигнални молекули или се транскрипциски фактори (табела 19-3).

Заедничка карактеристика на сите овие молекули е што, кога се кодирани од мутираните онкогени или кога се прекумерно експримирани, вршат постојано и неконтролирано стимулирање на клеточниот циклус и пролиферацијата. Мутираните, прекумерно активни форми на некои гени кои ја регулираат апоптозата, исто така, се класифицирани како онкогени.

Досега се пронајдени повеќе типови на мутации кај малигните клетки со кои протоонкогените се конвертират во онкогени. Во најголем број случаи, овие мутации се од типот на стекнување на функција, а последиците можат да бидат: зголемена експресија на генскиот продукт, негова перманентна активација или експресија

во клетки каде не би требало да бидат експримирани. Молекуларните механизми кои најчесто доведуваат до абнормална активација на протоонкогените во онкогени се должат на супституциски несинонимни мутации, хромозомски транслокации, генски амплификации и интегрирање на вируси



**Слика 19-8:** Шематски приказ на сигналната трансдукција посредувана со протеинот Ras. Врзувањето на екстрацелуларниот епидермален фактор на раст (EGF) со соодветниот рецептор лоциран на клеточната мембрана предизвикува низа на реакции со кои овој стимулирачки сигнал се пренесува во јадрото на клетката, каде се менува експресијата на определени гени и поттикнува клеточна делба. Активираниите форми на протеините (фосфорилирани или со променета конформација) се обоени со поинтензивни бои.

**Табела 19-3: Примери за протоонкогени**

ген:	функција на протеинскиот продукт:
<b>фактори на растот</b>	
<i>sis</i>	тромбоцитен фактор на раст
<i>int-2</i>	фибробластен фактор на раст
<b>рецептори за фактор на растот</b>	
<i>erbB</i>	трансмембрански рецептор за EGF (епидермалениот фактор за раст)
<i>trk</i>	трансмембрански рецептор за CSF-1
<b>интрацелуларни сигнални протеини</b>	
<i>ras</i>	GTP/GDP-врзувачки протеин
<i>raf</i>	серин/треонин-киназа
<i>src</i>	тирозин киназа
<b>транскрипциски фактори</b>	
<i>myc</i>	транскрипциски фактор
<i>jun</i>	транскрипциски фактор
<i>erbA</i>	стероиден рецептор

### Супституциски мутации на гените *RAS* кај малигните тумори

Мутациите со кои се кодира изменета аминокиселинската секвенца на кодираниот протеин може да се илустрира преку примерот на протоонкогенот *RAS*. Откриено е дека кај околу 75% од карциномите на панкреасот и кај околу 50% на тироидната жлезда и дебелото црево имаат мутации во некој од фамилијата гени *RAS*. Ваквите мутации кодираат мутантни протеини Ras кои можат да се врзат со GTP, но, не можат да го хидролизираат до GDP, и остануваат заглавени во активирана форма, постојано стимулирајќи ја клеточната делба.

Во хуманиот геном се наоѓаат 4 функционално различни, но, еволуциски конзервирани *ras* гени: *HRAS*, *KRAS-4a*, *KRAS-4b* и *NRAS*. Нивното мутирање е опишано голем број малигни неоплазми. Еден од најдолго и најдобро проучуваните примери е единечната нуклеотидна супституција на кодонот 12 во протоонкогенот *HRAS*. Оваа промена го конвертира во мутиран онкоген *HRAS* кој кодира само една променета аминокиселина во мутантниот протеин Ras, но, доволна да го заглави во перманентно активирана состојба (слика 19-7).

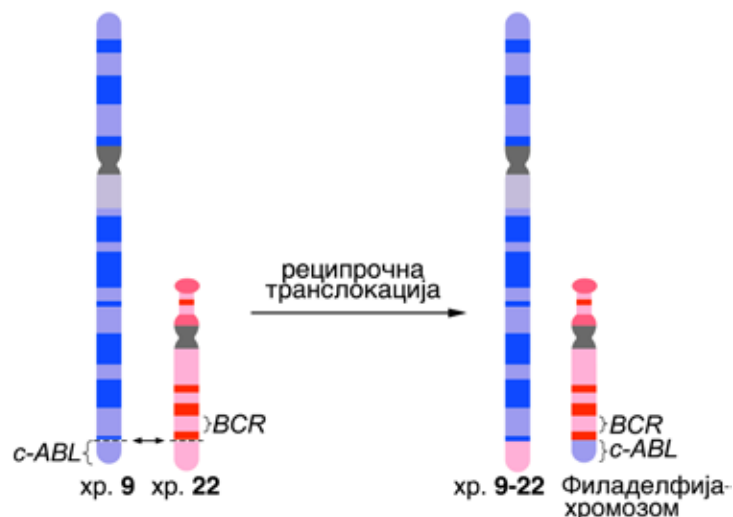
Прикажана е нуклеотидната секвенца на дел од немутираниот хуман протоонкоген *HRAS* (со обележаните кодони и соодветно кодираните аминокиселински остатоци од протеинот RAS), како и од онкогенот со несинонимната мутација во кодонот 12:

кодон:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	...	188	189
норм. <i>HRAS</i>	ATG	ACG	GAA	TAT	AAG	CTG	GTG	GTG	GTG	GGC	GCC	GGC	GGT	...	CTC	TCC
	Met	Thr	Glu	Tyr	Lys	Leu	Val	Val	Val	Gly	Ala	Gly	Gly	...	Leu	Ser
мут. <i>HRAS</i>	ATG	ACG	GAA	TAT	AAG	CTG	GTG	GTG	GTG	GGC	GCC	GTC	GGT	...	CTC	TCC
	Met	Thr	Glu	Tyr	Lys	Leu	Val	Val	Val	Gly	Ala	Val	Gly	...	Leu	Ser

## Активација на протоонкогенот *c-ABL* со хромозомска транслокација

Како што е веќе споменато, транслокацијата меѓу хромозомите 22 и 9 е карактеристична за најголемиот број случаи со хронична миелоидна леукемија. Оваа реципрочна транслокација предизвикува спојување (фузија) на кодирачката секвенца од протоонкогенот *c-ABL* (од 9. хромозом) со промоторот и кодирачката секвенца од генот *BCR* (од 22. хромозом) (слика 19-9). Протеинот кодиран од нормалниот протоонкоген *c-ABL* има функција на тирозин-киназа која е вклучена во интрацелуларната сигнална трансмисија. При опишаната транслокација, новосоздадениот фузиран ген *BCR-cABL* кодира химерен протеин BCR-ABL со нова функција. Без транслокацијата, генот подлежи на ригорозна регулација и е активен само во ограничени околности. Спротивно, тој станува постојано позитивно регулиран под дејство на силниот промотор од *BCR* генот кој е постојано активен во леукоцитите.

**Слика 19-9:** Реципрочна транслокација меѓу долгите краци на 9. и 22. хромозом се смета за клучна во патогенезата на најголемиот број случаи со хронична миелоидна леукемија. Прикажан е карактеристичниот скусен хромозом кој се нарекува Филаделфија, според градот каде првпат е откриен.



Тоа предизвикува протоонкогенот *cABL* прекумерно да се експримира, што доведува до постојана стимулација на делбата на клетките. Ваквиот молекуларен феномен во миелоидната лоза на леукоцитите, доведува до нивна неконтролирана пролиферација, што е клучно за развојот на хроничната миелоидна леукемија.

## Генска амплификација и вирусна интеграција

Зголемувањето на бројот на од некој ген преку повеќекратна локална репликација на само мал дел од DNA-молекулот во хромозомот се нарекува **генска амплификација**. Овој механизам нормално не постои кај цицачите, но, е честа појава кај малигните клетки. Познати се голем број на примери на прекумерна активност на онкогени во човековиот геном како последица на генска амплификација. Досега се пронајдени повеќе типови амплификации на онкогенот *c-MYC* кај голем број неоплазми.



## 19.6 Тумор-супресорски гени

Самото име тумор-супресорските гени го добиле според тоа што нивните инактивиращки мутации (т.н. мутации со која се губи функцијата на овие гени) се поврзани со зголемување на веројатноста од појава на рак, односно се вклучени во процесот на малигна трансформација. Првиот тумор-супресорски ген кај луѓето е идентифициран при генетските истражувања на ретинобластомот, ретка форма на канцер кој се јавува во мрежницата на окото. Некои луѓе имаат наследено предиспозиција за развој на оваа болест во првите неколку години од животот. За споредба, ненаследната форма на ретинобластомот, која е предизвикана од енвиронменталните фактори, има тенденција да се појави на многу подоцнежна возраст, и тоа многу ретко.

Врз основа на овие факти, Кнадсон (Alfred Knudson) во 1971 година предложил модел според кој се неопходни мутации и во двата алела од истиот ген за да се развие ретинобластомот. Подоцна, овој модел е наречен **хипотеза за два погодока** (две мутации). Имено, луѓето со херeditарна предиспозиција за ретинобластом веќе имаат еден мутиран алел кој е наследен од еден од нивните родители, па, доволна е само уште една дополнителна мутација во другиот алел од истиот тумор-супресорски ген за да се појави болеста. Од друга страна, кај индивидуите со ненаследна форма на ретинобластомот мора да се случат двете мутации во истиот генски локус во истата ретинална клетка. Со оглед на тоа што ретината содржи повеќе од 1 милион клетки, веројатноста за таква мутација во една од овие клетки во рана возраст е статистички малку веројатна, па, ненаследната форма на оваа болест се појавува доцна во животот и само ретко.

Неколку примери на тумор-супресорски гени и функциите на нивните протеински продукти, се наведени во **табелата 19-4**.

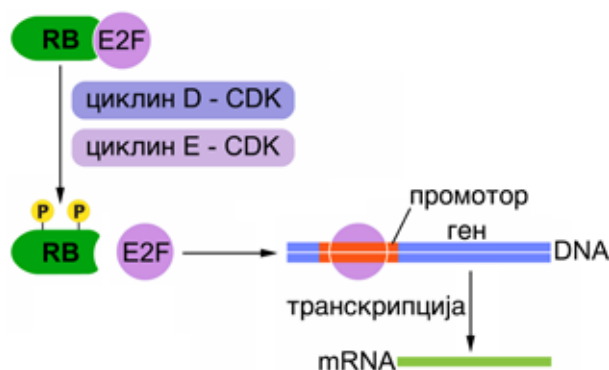
Табела 19-4: Примери за тумор-супресорски гени	
ген:	функција на протеинскиот продукт:
<b>гени кои ја инхибираат клеточната делба</b>	
<i>rb</i>	негативен регулатор на транскрипцискиот фактор E2F
<i>p16</i>	протеин-киназа која негативно ги регулира циклин-зависните кинази и го контролира преминот од G <sub>1</sub> во S фазата
<i>APC</i>	негативен регулатор на сигналниот пат <i>Wnt</i>
<i>NF1</i>	протеинот NF-1 го стимулира хидролизањето на GTP од страна на RAS
<i>VHL</i>	протеинот VHL ги насочува кон убиквитин-посредувана протеолиза некои протеини кои делуваат стимулативно врз клеточниот циклус
<b>гени кои го одржуваат интегритетот на геномот</b>	
<i>p53</i>	транскрипциски фактор кој учествува во регулацијата на клеточниот циклус кај точките за проверка и во регулирањето на експресијата на определени гени; општ сензор за генотоксично оштетување; наведување кон апоптоза
<i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i>	протеините BRCA1 и BRCA2 се вклучени во репарацијата на оштетената DNA; учествуваат и во регулацијата на клеточниот циклус кај точките за проверка

Во научната литература, тумор-супресорските гени кои, влијаејќи врз мутационата стапка, индиректно учествуваат во одржувањето на интегритетот на геномот понекогаш се нарекуваат и **гени-домари** (англ. *caretakers*, домари, негуватели), додека тие кои директно го регулираат клеточниот циклус, диференцијацијата и апоптозата се нарекуваат **гени-вратари** (англ. *gatekeepers*).

## Тумор-супресорски ген *RB*

Оригиналниот модел предложен од Кнадсон подоцна е проучен и на молекуларно ниво. Утврдено е дека клучен за развојот на ретинобластом е тумор-супресорскиот ген наречен ***RB*** (од англ. *retinoblastoma*), лоциран на долгиот крак на хромозомот 13. За разлика од повеќето индивидуи кои имаат две немутирани адели на генот *RB* (адели од див тип), лицата со наследна форма на ретинобластом наследиле еден немутиран и еден мутиран алел кои се присутни во сите соматски клетки. Меѓутоа, во текот на трансформацијата на клетките во малиген ретинобластом, дивниот тип на алелот *RB* го претрпува и вториот погодок (т.е. мутација), што предизвикува недостаток на функционален тумор-супресорски протеин **pRB**. Се смета дека, барем кај ретинобластомот, ваквото нарушување е доволно за малигна трансформација на клетката и создавање на овој тип на рак. Сепак, досегашните сознанија покажуваат дека, кај најголемиот број форми на малигни неоплазми, се потребни мутации во неколку клучни гени.

**Слика 19-10:** Шематски приказ на интеракцијата меѓу протеинот RB и транскрипцискиот фактор E2F во регулацијата на клеточната делба. Нивото на фосфорилација на протеинот pRB, а со тоа и неговата интеракција со E2F, директно го контролираат преминот  $G_0/G_1$  во текот на клеточниот циклус.



Улогата на протеинот pRB во регулацијата на клеточниот циклус е расветлена на молекуларно ниво со голем број студии. Имено, интеракцијата на протеинот RB со **транскрипцискиот фактор E2F** има круцијална функција во регулацијата на клеточниот циклус и на рамнотежата меѓу клеточната диференцијација и пролиферација. Дефосфорилираниот протеин pRB се врзува со факторот E2F со што го одржува во неактивна состојба (слика 19-10). Спротивно, во текот на  $G_1$  фазата, циклинот D1 се врзува со циклин-зависните кинази CDK2 и CDK4 што предизвикува фосфорилација и активација на pRB. Притоа, факторот E2F се одвојува од фосфорилираниот pRB, се врзува со соодветните промотори и ја активира транскрипцијата на определени гени кои се неопходни за започнување на DNA-репликацијата. Со тоа се овозможува поминување низ точката за проверка  $G_1/S$  од клеточниот циклус како предуслов за започнување на клеточна делба.

Нарушувањата во патиштата посредувани со pRB предизвикуваат ослободување на факторот E2F со што се овозможува извршување на клеточната делба и се предизвикува нечувствителност на клетката кон антипролиферативни сигнали.

Покрај ретинобластомот, молекуларните абнормалности на *RB* генот се наоѓаат и кај повеќе неоплазми какви што се: ситноклеточниот белодробен карцином, остеосаркомот, карциномите на мочниот меур, простата и цервиксот и други. Интересно е што експерименталните глумци кои се хомозиготни за мутираните алели на *RB* умираат рано во текот на ембриогенезата, што укажува на виталната важност на овој генски продукт.

## Тумор-супресорски ген *TP53*

Без сомнение, еден од најекстензивно и најдолго проучуваните тумор-супресорски гени е *TP53* (многу често означен и како ген *p53*). Кај сите вертебрални организми, тој има улога на главен тумор-супресорски ген, па, во едукативни цели се нарекува и чувар на геномот. Неговиот протеински продукт е транскрипцискиот фактор *p53* кој е наречен така според молекулската маса на протеинот (53 kDa, односно 53000).

Неговата основна улога е мониторирање на геномската стабилност и определувањето на клеточниот одговор при различни форми на клеточен стрес. Имено, генот *p53* може да се индуцира при UV- или јонизирачко зрачење, хипоксија, генотоксични агенси и други форми на клеточен стрес и да ги детектира оштетувањата во геномската DNA, како и нарушувањата на сигналните патишта кои ја крегулираат клеточната делба. Експериментално е утврдено дека дури и само еден двоверижен прекин во геномската DNA може да биде доволен за мерливо зголемување на нивоата на протеинот *p53* во клетката. Интересно е што оваа промена не настанува поради зголемена транскрипција на генот *p53*, туку поради посттранслациска стабилизација на протеинот *p53* кој, инаку, е многу лабилен и има кусо полувреме на живот во клетката.

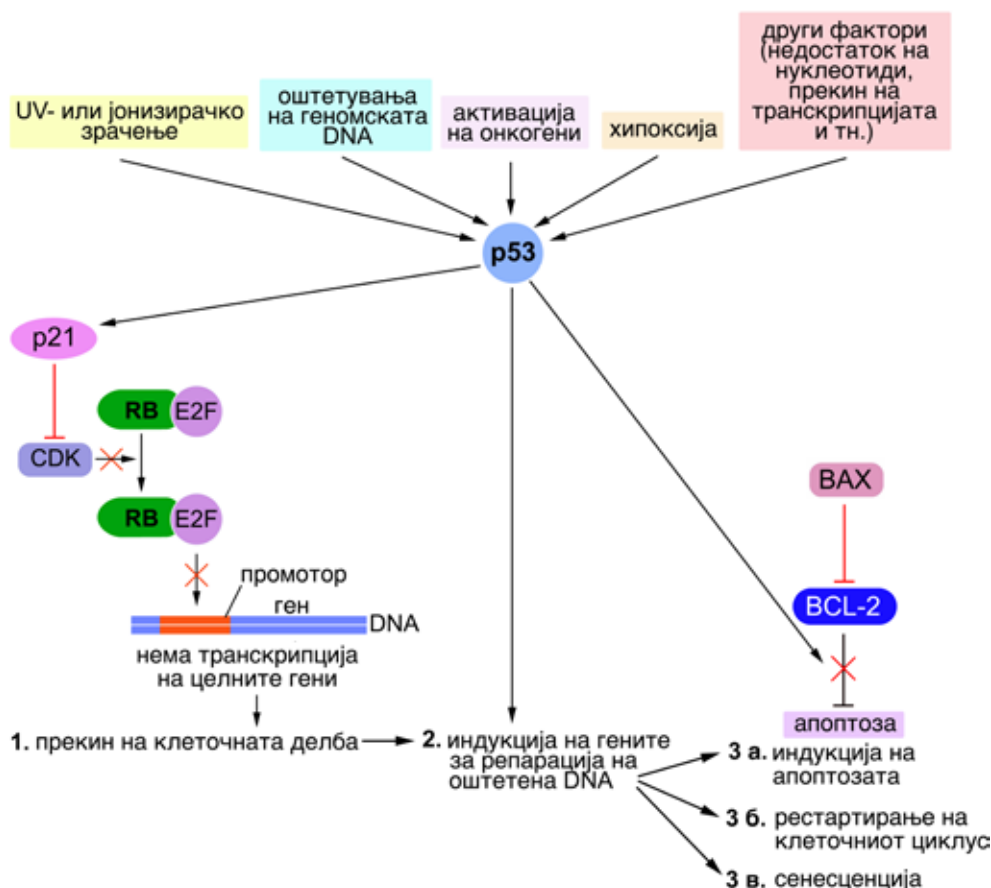
Регулацијата на овој протеин е исклучително комплексна, но, поради дидактичко поедноставување може да се издвои протеинот *Mdm2* како еден од клучните молекули кои директно ја регулираат биолошката активност на *p53*. Имено, нефосфорилираниот *Mdm2* создава комплекс со *p53* и го одржува во неактивна состојба. Покрај тоа, протеинот *Mdm2* постојано го убиквитинира *p53*, со што пре-



**Слика 19-11:** Шематски приказ на регулацијата на биолошката активност на *p53* со протеинот *Mdm2*. Во отсуство на стресни сигнали, комплексот меѓу протеините *Mdm2* и *p53* го одржува биолошки неактивниот и убиквитиниран *p53*. Соодветните стрес-сигнали предизвикуваат фосфорилирање на *Mdm2*, со што се ослободува протеинот *p53* кој станува активен и постабилен, со што неговата концентрација во јадрото расте и ги индуцира целните гени.

дизвикува негова лабилност и кус полуживот поради насоченоста кон протеазомска деградација. Но, при фосфорилирањето на Mdm2, комплексот се разрушува и p53 станува биолошки активен и постабилен, со што неговите концентрации се зголемуваат, па, како транскрипциски фактор, може да се врзе со промоторите на соодветните целни гени и да ги индуцира (слика 19-11).

Зголемените нивоа на активниот протеин p53 можат да предизвикаат директно индуцирање на повеќе од 100 целни гени, а преку меѓупротеинските интеракции, може индиректно да влијае врз многу поголем број целни гени. При активација, протеинот p53 може да предизвика неколку клучни одговори: индукција на механизмите за репарација на оштетената DNA, прекинување на клеточната делба и, најдрастичниот, апоптотична смрт на клетката (слика 19-12).



**Слика 19-12:** Шематски приказ на клучните фактори кои го активираат p53 и основните ефекти од активацијата. Првиот ефект е прекин на клеточната делба посредуван преку инхибиторниот ефект на p21 врз CDK, по кој следи индукција на повеќе гени чии продукти се вклучени во DNA-репарациските механизми. Доколку репарацијата не е доволно успешно завршена, p53 предизвикува индукција на апоптозата преку антиапоптотичниот протеин BAX. При делумна успешност на поправката на оштетената DNA клетката многу може да влезе во состојба на сенесценција. Наспроти тоа, ако репарацијата е доволно успешна, клеточниот циклус може да продолжи.

Еден од основните одговори кон генотоксичниот стрес е предизвикување прекин на клеточниот циклус. Протеинот p53 директно индуцира експресија на транскрипцискиот фактор p21 кој е инхибитор на циклин-зависните кинази (CDK). Како последица на тоа, CDK не го фосфорилираат протеинот RB во доволна мера, па, тој останува поврзан со транскрипцискиот фактор E2F и не може да се поврзе со промоторите на целните гени што е неопходно за продолжување на клеточната делба. Со тоа, клеточниот циклус запира во фазата G<sub>1</sub>.

Друг клеточен одговор кој директно го посредува p53 е индукцијата на повеќе гени чии продукти се вклучени во репарациските механизми, пред сè за нуклеотидна и за базна ексцизија. Улогата на p53 е особено изразена при т.н. **глобална геномска репарација**, како суптип на механизмот на нуклеотидна ексцизија.

Протеинот p53 предизвикува и трет основен одговор кон стресот преку индукција на антиапоптотичниот протеин BAX. Тоа резултира со инактивација на проапоптотичниот протеин BCL-2, со што не може да се изврши патот на апоптотичната смрт на клетката. Алтернативно, во зависност од обемот на геномските оштетувања и успешноста на репаративните процеси, клеточниот циклус може да продолжи или, пак, клетката може да влезе во фазата на сенесценција.

Со сите овие ефекти, p53 има круцијална улога во одржувањето на геномската стабилност.

Бројните истражувања покажале дека *TP53* е најчесто мутиран ген кај малигните неоплазми. Мутираниот протеин p53 нема способност да ги мониторира клеточните стрес-сигнали, па, изостануваат активирачките механизмите за поправка на оштетувањата во геномот, запирањето на натамошната клеточна делба и апоптозата, како крајна опција. За разлика од голем број други тумор-супресорски гени кај кои се најдени делеции во малигните клетки, генот *TP53* најчесто станува целосно или делумно нефункционален поради супституциски мутации кои имаат доминантно-негативен ефект врз кодираниот протеин p53. Со оглед на тоа што функционалниот p53 егзистира како хомотетрамер, доволно е само еден од мономерните полипептиди да има мутирана аминокиселинска секвенца, па, да се наруши функционалноста на целиот комплекс. Интересно е што мутираниот p53 има многу подолго време на полуживот и, иако е со намалена биолошка активност, значително се акумулира во јадрата на малигните клетки. Овој феномен долго време предизвикувал недоразбирање кај истражувачите, па, првично, генот *TP53* бил погрешно означен како онкоген.

## 19.7 Редуцирана апоптоза

Растот на неоплазмите не се должи само на клеточната пролиферација, туку и на инхибицијата на апоптозата, што е еден од кардиналните белези на малигните клетки. Се смета дека избегнувањето на апоптозата е помалку или повеќе изразено во сите типови на канцер. Можната улога на апоптозата кај канцерот е претпоставена уште пред 40 години кога е забележано дека, во услови *in vitro*, култивираниите клетки од хормонски-зависен карцином нагло се самоуништуваат со апоптоза при недостаток на хормонот во клеточниот медиум. Подоцна е откриен онкогенот *BCL-2* чија прекумерна експресија има антиапоптотичен ефект.

Како што е претходно објаснето, сите нуклеирани клетки во вишите повеќеклеточни организми имаат потенцијал за самоуништување со програмираната клеточна смрт, т.е. со апоптоза. Клучните гени кои ја регулираат апоптозата се генот *TP53* и протеините кодирани од генската фамилија *BCL-2*. Генот *Bcl-2* (B-cell lymphoma-2) е првиот идентифициран онкоген за кој е покажано дека делува преку продукција на истоимениот апоптотичен инхибитор. Генот *BAX* припаѓа на истата фамилија, но, неговиот протеински продукт има антиапоптотичен ефект. Во нормални околности, протеините *BCL-2* и *BAX* директно ја регулираат апоптозата преку нивно меѓусебно



поврзување во неактивен хетеродимерен комплекс *BCL-2*-*BAX* (слика 19-13).

Спротивно, хомодимерот *BCL-2*-*BCL-2* предизвикува инхибирање на апоптотичниот процес, додека хомодимерот *BAX*-*BAX* го стимулира овој процес. Рамнотежата на ваквите интеракции директно зависи од релативните локални концентрации на овие два протеина. Оттаму, не зачудува што прекумерната експресија на генот *BCL-2* е инволвирана во малигната трансформација кај голем број неоплазми. Секако, нарушувањата на апоптозата кај канцерот може да биде последица на мутации или други абнормалности и на други гени.

Радиотерапијата и хемиотерапијата кои се користат со децении како конвенционални неоперативни третмани на малигните заболувања, всушност дејствуваат примарно индуцирајќи апоптоза кај малигните клетки. Иронично е што токму нарушувањата на апоптотичните патишта кај клетките на канцерот можат да бидат причина за резистентноста кон овие третмани.

## 19.8 Зголемена теломеразна активност

Повеќето клеточни линии етаблирани од малигни тумори имаат потенцијал за речиси бесконечен број делби и, со тоа, за култивирање во услови *in vitro* (клеточни култури). Ваквиот фенотип на имортализација е стекнат во текот на неопластичната прогресија и се смета за есенцијална карактеристика на малигниот раст. Експерименталната инактивација на тумор-супресорските протеини *p53* и *pRB* делумно го продолжуваат репликацискиот лимит, но, сепак, порано или подоцна, доаѓа до кризата која резултира со сенесценција или апоптоза.

Репликациската криза е проследена и со масивна апоптоза на малигните клетки, а се надоместува дури откако ќе се зголеми теломеразната активност. Оттаму, бројот на клетки во некој малиген тумор е далеку помал отколку делбите кои се случиле во текот на неговата прогресија. Досегашните истражувања укажуваат

дека кај 85-90% од разните типови канцер постои зголемена активност на теломеразата што претставува **најчестото** и **најконзистентното** поединечно молекуларно нарушување кај малигните клетки. Наспроти тоа, теломеразата воопшто не е активна во повеќето бенигни тумори.

Воопштено, се смета дека теломеразната експресија кај малигните тумори го детерминира нивниот капацитет за неограничена пролиферација. Експерименталната експресија на теломеразата во нормални човечки култури на клетки доведува до нивна имортализација, ги стабилизира нивните теломери и го продолжува репликацискиот животен век, но, сепак не е доволна за индуцирање на фенотип на трансформирана клетка. Од друга страна, инхибицијата на теломеразната активност кај малигните клетки ја прекинува елонгацијата на теломерите и го ограничува нивниот раст и делба. Сепак, постојат голем број експериментални податоци кои укажуваат на тоа дека самата теломеразна експресија не е иницирачки настан во текот на неопластичната трансформација на клетката. Кај моделот на хумани фибробласти во клеточна култура, неопходни се повеќе други генетски промени за експериментално трансформирање на клетките кои се веќе позитивни за теломеразна активност. Таква е, на пример, прекумерната експресија на мутантната варијанта на *HRAS* онкогенот поради конститутивно активирање на патиштата на сигнална трансдукција, експресија на големиот Т-антиген од SV40 за блокирање на pRB и на p53 кои се критични за текот на клеточниот циклус, како и на малиот Т-антиген од SV40 за инхибиција на фосфатазната активност. Кај моделите на глумечки тумори, теломеразата е прекумерно експримирана иако хромозомите кај глумците имаат мошне долги теломери.

## 19.9 Инвазија на околните ткива и метастазирање

Локалната инвазија на немалигните ткива и дисеминирањето на малигните клетки низ крвната и лимфната циркулација во оддалечени органи се најсериозните последици на еволуцијата на малигните тумори. Проширувањето во околните ткива е една од основните карактеристики на канцерот: пробивањето на базалната мембрана на епителното ткиво е патолошко-морфолошки знак за инвазивен карцином, на пример. Во текот на клоналната еволуција и селекцијата, малигните клетки можат да се стекнат со карактеристики кои им овозможуваат да мигрираат од туморската клеточна маса (**примарниот тумор**) и да извршат инвазија во околното ткиво и неговите структури, да навлезат во крвните садови (интравазација), да се пренесат преку циркулацијата до оддалечени органи и ткива, да излезат од крвниот сад (екстравазација), по што можат да создадат секундарни тумори наречени **метастази** (слика 19-14).

За да метастазираат, малигните клетки мораат да стекнат механизми за инвазија во здравото ткиво, пред сè преку разградување на екстрацелуларниот матрикс (ЕСМ), пробивање на базалната мембрана и сидовите на крвните и лимфните садови, активно клеточно движење и стапување во специфични интеракции со други протеини, цитокини и фактори на раст.

Во текот на дисеминацијата, малигните клетки доаѓаат во контакт и со васкуларниот ендотел, со циркулирачките леукоцити и тромбоцити и со плазмините про-





**Слика 19-14:** Илустрирање на процесот на инвазија на клетките од карциномот во околното ткиво (локална инвазивност), како и во крвните садови (метастазирање во оддалечени органи) и во лимфни садови (метастазирање во лимфни јазли).

теини. Откога циркулацијата ќе ги доведе во оддалечен орган или ткиво, малигните клетки се соочуваат со нова микросредина различна од примарната туморска маса на клетки и во која можат да пролиферираат и да создадат метастаза. Се чини дека токму интеракцијата на малигните клетки со здравите во новата средина е особено важен чекор во текот на метастазирањето. Имено, во текот на овој процес, неколку сигнални и регулаторни интрацелуларни и екстрацелуларни патишта мораат да се изменат со цел метастатските клетки да формираат секундарен тумор.

Иако молекуларните механизми кои се во основата на инвазијата на малигните клетки во околните ткива и метастазирањето не се доволно прецизно проучени, сепак, во последниве години се направени значајни откритија кои укажуваат на тоа дека овие за процеси се најважни три молекуларни процеси: ензимско разложување на ЕСМ, клеточна адхезија и подвижност на клетките.

## Разложување на ЕСМ

**Протеолизата на ЕСМ** е клучна за локалната инвазија кај сите малигни неоплазми и ја извршуваат неколку типа на протеолитички ензими: матрикс-металопротеинази, серин-протеази, цистеин-протеази и аспартил-протеази.

**Матрикс-металопротеиназите (ММР)**, наречени и металопротеази, се ендонуклеази кои се зависни од цинкови јони, а според типот на протеини од ЕСМ кои се способни да ги разградуваат, некои ММР имаат специфични имиња: колагенази, желатинази и стромелизин итн. ММР вклучуваат поголем број сродни ензими означени со кратенката и соодветниот број (на пример, ММР-2). Разградувајќи го ЕСМ со протеолитичка активност, ензимите ММР директно ја овозможуваат локалната инвазија на малигните клетки во околното ткиво, но, и го олеснуваат процесот на метастазирање. Уште првичните студии од оваа област укажуваат на критичната важност на ММР во метастатскиот процес и, поконкретно, нивната улога во разгра-

дувањето на ЕСМ и инвазијата на ткивата. Очекувано, природните и синтетските инхибитори на ММР драстично ја намалуваат ткивната инвазија и метастазирачката способност на клетките, како при експериментите во услови *in vitro*, така и во *in vivo*. Здравите клетки секретираат т.н. **ткивни инхибитори на ММР (ТИМР)**, од англ. *tissue inhibitors of matrix-metalloproteinases*) кои во нормални состојби одржуваат хомеостаза со ММР и го одржуваат структурниот и функционалниот интегритет на ткивата. Ваквата рамнотежа се нарушува во текот на инвазијата на малигните клетки поради повеќе причини од кои најдобро проучени се: зголемената експресија (на транскрипциско ниво) на ММР од страна на самите малигни клетки, секреција на сигнални молекули кои ги стимулираат нетуморските клетки од околните ткива самите да секретираат поголеми количества ММР или, обратно, да ја намалуваат секрецијата на ТИМР-молекулите. Освен тие механизми, некои вродени мутации и полиморфизми во гените за ММР и за ТИМР-молекулите ја зголемуваат веројатноста од рано метастазирање при појавата на малигни неоплазми.

Сето ова ги предизвикува молекулите на ММР и ТИМР да имаат голема важност во биомедицинските истражувања, како од аспект на прогноза на натамошниот тек на болеста, така и од потенцијален терапевтски аспект.

Од функционален аспект, и останатите групи на ензими (серин-протеази, цистеин-протеази и аспартил-протеази) вршат слично разградување на ЕСМ. Заедно со инхибиторите специфични за секој ензим, имаат важна улога во локалната инвазија и метастазирањето.

## Клеточна адхезија

Овој израз кој се однесува како на интерцелуларното (меѓуклеточно) поврзување, така и на интеракциите меѓу клетките и ЕСМ. Постојат голем број податоци кои укажуваат дека намалената интерцелуларна адхезивност на малигните клетки е клучна за зголемувањето на нивниот потенцијал за инвазија и метастазирање.

Молекулите кои учествуваат во клеточна адхезија (САМ) ги вклучуваат фамилиите на кадерици, селектини, интегрини и САМ-молекули слични на имуноглобулините. Комплексот меѓу **Е-кадерици** и **катенини** се смета за еден од најважните протеини за клеточната адхезија. Намалената експресија на овој комплекс во малигните клетки значително ја зголемува нивната инвазивност.

**Интегрините** се хетеродимерни трансмембрански рецептори чија основна функција е да обезбедат интеракција меѓу клетката и протеините на ЕСМ. Покрај тоа, интегрините влијаат врз транскрипцијата на гените за ММР.

## Клеточна мобилност

Активното движење на клетките има исклучително важна за инвазивноста и метастатскиот потенцијал на малигните тумори. Овој феномен се должи пред сè на реорганизирањето на актинскиот цитоскелет, а е оркестриран со активноста на поголем број молекули. Меѓу повеќе истражуваните е фамилијата на **малите Rho-GTP-ази** која вклучува неколку протеини (Rho, Rac и Cdc42) кои го пренесуваат экс-

трацелуларниот сигнал за хемотакса (привлекување на клетките) до соодветните интрацелуларни ефекторни молекули. Ефекторните молекули директно ја спроведуваат полимеризацијата на актинските микротубули, наизменично создавање на филоподиуми и ламелиподиуми, со кои клетките се одвојуваат од подлогата и се движат низ ткивата и ЕСМ. Експерименталната инхибиција на клеточната подвижност значително го намалува метастатскиот потенцијал на малигните клетки кај лабораториските животни.

### 19.10 Ангиогенеза

Растот на нови крвни садови (неоваскуларизација или неоангиогенеза) е неопходен за одржување и раст на малигните тумори, како и за нивното метастазирање. Имено, туморската маса со дијаметар под 1-2 мм обично не е васкуларизирана и размената на хранливи материи, метаболити и гасови се одвива по пат на дифузија. Со натамошниот раст на туморот, ваквиот механизам станува недостаточен, па, е неопходно растење на нови крвни садови кои ќе го подржат брзиот раст и интензивниот метаболизам на клетките во малигниот тумор.

Оттаму и стекнувањето на способност за неоангиогенеза е една од кардиналните карактеристики на канцерот. Во процесот на ангиогенезата се вклучени различни индуктори и инхибитори кои ја регулираат пролиферацијата на ендотелните клетки и на миграцијата.

Меѓу факторите на раст, за кои е докажано дека ја стимулираат ангиогенезата, се наоѓаат: васкуларниот ендотелиски фактор на растот (VEGF), базичниот фактор на фибробластен раст (bFGF), тромбоцитниот ендотелиски фактор на растот (PD-ECGF) и тромбоцитниот фактор на растот (PDGF). Од друга страна, немутираниот протеин p53 делува инхибиторно врз ангиогенезата, а ваквиот ангиостатски ефект отсуствува кај малигните тумори чии клетки имаат мутиран p53.

### 19.11 Поврзаност на канцерот со вируси

Вирусите кои можат да предизвикаат малигни неоплазми при инфекцијата се нарекуваат **онкогени вируси**. Проучувањето на вирусната канцерогенеза има долга историја поради фактот што токму првите онкогени се откриени кај некои анимални вируси. Всушност, геномите на ваквите вируси содржат мутирани вирусни онкогени кои потекнуваат од нормалните протоонкогени од еукариотските клетки и чија функција е регулација на клеточниот циклус. Инсерцијата на ваквите вирусни онкогени во инфицираните клетки има доминантен ефект како да е присутен мутиран алел од онкогенот на еукариотскиот геном.

Некои вируси, каков што е **хуманиот папилома вирус (HPV)**, од англ. *human papillomavirus* содржат гени чии продукти (вирусните протеини E6 и E7) специфично се врзуваат со клеточните тумор-супресорски протеини p53 и pRB, соодветно, предизвикувајќи нивна инактивација.

Некои од вирусите за кои постои епидемиолошка поврзаност со определени форми на малигни неоплазми се прикажани во **табелата 19-5**.

**Табела 19-5: Поврзаност на вирусите со определени типови на канцер**

вирус:	типови на канцер:
хуман папилома вирус (HPV)	карцином на цервикс, вулва и penis
хепатитис-С вирус (HPV)	хепатоцелуларен карцином
хуман вирус на Т-клеточна леукемија (HTLV-1)	Т-клеточна леукемија кај возрасни *
хуман вирус на Т-клеточна леукемија (HTLV-2)	леукемија на влакнестите клетки *
Епштајн-Баров вирус (EBV)	Баркитов и Хочкинов лимфом, назофарингеален канцер *
хуман херпес-вирус тип 8	Капошиев сарком

\* поврзаноста е утврдена само кај определени популации и некои географски локации

## 19.12 Херeditарна сконост кон канцер

Иако најголемиот број случаи на канцер се спорадични и се последица на соматските мутации кои не се наследени, постојат и поретки типови на рак каде наследната компонента има главна улога. Погоре во текстот е веќе опишан херeditарниот тип на ретинобластом кај децата кој е и најчестиот пример за канцер каде мутираниот алел од клучниот тумор-супресорски ген е наследен од едниот родител. Покрај тој пример, откриени се повеќе други наследени заболувања или синдроми кај кои постои изразена предиспозиција кон определени типови на канцер (**табела 19-6**).

Некои автори предложиле и трета група гени чии мутации ја зголемуваат приемчивоста кон канцер: **гени за средината** (англ. *landscapers*, кои се однесуваат на пејсажот, односно, пределот во еколошки контекст). Овие гени кодираат протеини кои учествуваат во структурата на стромата (т.н. микроенvironментална средина) околу самите малигни клетки. Такви се, на пример, протеините на екстрацелуларниот матрикс, клеточната адхезија, меѓуклеточната комуникација, матрикс-металопротеиназите и други. Покрај тоа, во екстрацелуларниот матрикс се наоѓаат и голем број протеолитички ензими кои ги разложуваат факторите на раст, молекулите за клеточна адхезија и други протеини, со што не дозволуваат прекумерна пролиферација на целните клетки. Мутираните протеолитички ензими со намалена активност дозволуваат предолго опстојување на споменатите молекули и, со тоа, можат да учествуваат во процесот на прогресија на неоплазмата, нејзината инвазија и метастазирање.

**Табела 19-6: Наследени мутирани гени кои предизвикуваат предиспозиција за развој на канцер**

гени:	типови на канцер:
<b>тумор-супресорски гени</b>	
<i>VHL</i>	фон Хипел-Линдова болест ( <i>von Hippel-Lindau</i> ): тумори на централниот нервен систем и ретината, бубрежен карцином, невроендокрини и други неоплазми
<i>RB</i>	ретинобластом
<i>APC</i>	фамилијарна аденоматозна полипоза и фамилијарен карцином на колонот
<i>NF1</i>	неврофиброматоза
<i>p53</i>	Ли-Фраумениев синдром ( <i>Li-Fraumeni</i> ): карцином на дојка, саркоми на меките ткива и коските, акутна леукемија, тумори на мозокот и на адреналниот кортекс
<i>BRCA-1</i>	фамилијарен карцином на дојка
<i>BRCA-2</i>	фамилијарен карцином на дојка
<i>WT1</i>	Вилмсов ( <i>Wilms</i> ) тумор - нефробластом
<i>MTS1</i>	херeditарен малиген меланом
<i>MSH2</i>	неполипозен колоректален карцином
<i>MLH1</i>	неполипозен колоректален карцином
<i>XPA, XPB, XPC, XPD, XPE, XPF и XPG</i>	<i>Xeroderma pigmentosum</i> : малиген меланом, планоцелуларен и базоцелуларен карцином на кожата
<b>онкоген</b>	
<i>RET</i>	мултипла ендокрина неоплазија, тип 2: феохромоцитом на адренална жлезда и карцином на тироидеата



# ОСНОВНИ МЕТОДИ ВО МОЛЕКУЛАРНАТА БИОЛОГИЈА И МОЛЕКУЛАРНАТА ГЕНЕТИКА

## Глава 20

**В**о рамките на оваа глава, ќе бидат опишани само техниките кои имаат клучно значење за методологијата на молекуларната биологија и молекуларната генетика. Иако се преплетуваат со нив, техниките на рекомбинантната DNA, односно на генетскиот инженеринг, поради низа свои специфики, се опишани во следната глава.

### 20.1 Изолација на нуклеинските киселини од биолошки материјал

#### Изолација на DNA

Во молекуларната биологија се применуваат бројни методи за изолација на DNA од речиси сите микроорганизми, габи, растенија и анимални организми. Со современите техники, можно е изолирање на DNA и од деликатни биолошки материјали, како што се парафинизирани ткива, фиксирани архивирани експонати, а понекогаш и од сочувани фосилни остатоци од изумрени видови. Постапките за изолација варираат според тоа дали целта на изолацијата е геномска или DNA од органели (митохондриска, хлоропластна), од вектори (плазмидна или бактериофагна) и други типови на DNA. Принципите на современите техники за изолација на DNA можат да се поделат на три групи: тие кои се базираат на **разлики меѓу растворливоста** на DNA-молекулите и останатите клеточни макромолекули; **селективна апсорпција** на DNA врз специфични апсорбенти; и **рамнотежно центрифугирање** во градиент на густина (цезиум хлорид).

Стандардните методи на изолација на DNA обично започнуваат со механичка хомогенизација и/или хемиско ослободување на DNA-молекулите од клетките по што следи дигестија на ензимска протеините. Дигестијата на протеините се врши на релативно висока температура од околу 60°C при што протеиназата K е активна, додека повеќето DN-ази се инактивираат. Може да се користи и ензимот RN-аза за



отстранување на RNA-молекулите кои можат да интерферираат со процедурите во определени експерименти. По ова се врши самото издвојување (**екстракција**) на DNA од останатите клеточни конституенти. Најчесто се употребува фенол или смеса на фенол и хлороформ, кои предизвикуваат денатурација и таложење на протеините (слика 20-1).



**Слика 20-1:** Аспирирање на водената фаза при екстракцијата на DNA со органски растворувачи каква што е смесата на фенол и хлороформ.

Алтернативно, може да се примени т.н. **изсолување** при додавање на соли во висока концентрација во хомогенатот (најчесто натриум хлорид, литиум хлорид или натриум перхлорат). DNA-молекулите се растворливи при високи концентрации на соли, додека протеините се таложат и се отстрануваат со центрифугирање. DNA останува растворена во супернатантот и се користи во натамошната постапка. Завршното пречистување на DNA обично се врши со **преципитација** во етанол или изопропанол. Имено, во присуство на некои моновалентни катјони (натриумови, калиумови или амониумови) и по мешање на течноста, DNA преципитира и обично станува видлива како влакнеста маса со белузнакава, која се собира со нафаќање со стаклено стапче или со центрифугирање. На располагање се разни комерцијални сетови за изолација на DNA кои се базирани на овие принципи и кај кои оптимизираната постапка е побрза и поедноставна отколку кај стандардните методи.

По изолацијата, неопходно е да се определи концентрацијата, како и интегритетот на изолираната DNA.

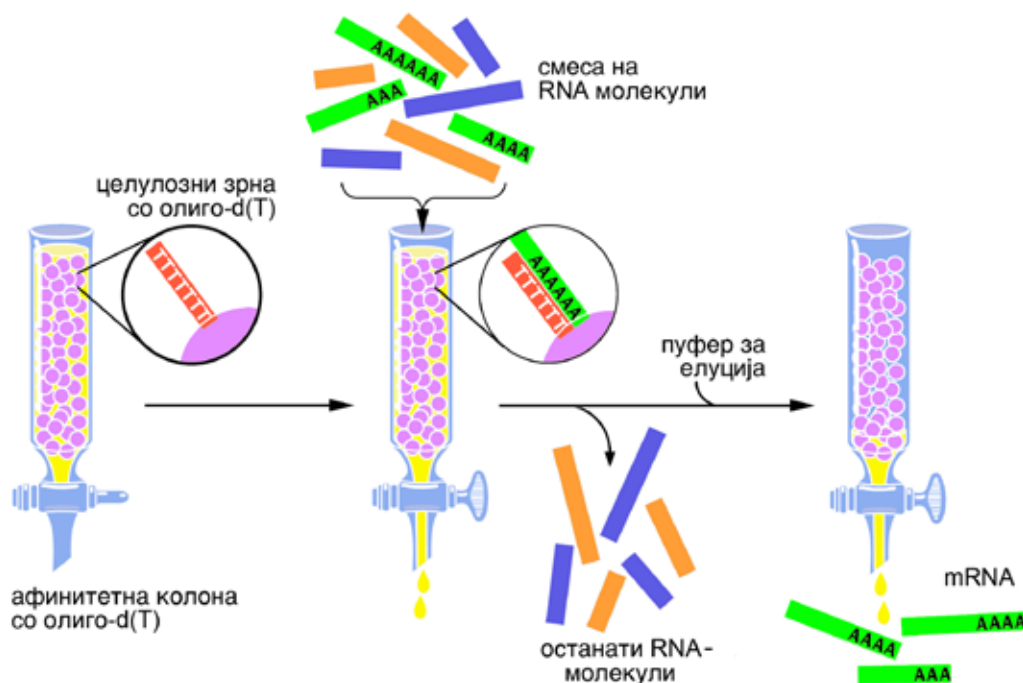
## Изолација на RNA

Поради определени разлики во физичко-хемиските особини, како и многу поголемата чувствителност на RNA-молекулите кон ензимска деградација, постапките за изолација на RNA од еукариотските клетки се разликуваат од тие кои се користат за изолација на геномската DNA. RNA-молекулите се многу подложни на ензимска деградација со RN-ази поради што е неопходно додавање на соодветни инхибитори.

Техниките на изолација базирани на рамнотежно центрифугирање во градиент на цезиум хлорид се применуваат кога е потребен поголем принос на RNA со највисок степен на чистота. RNA може да се изолира од делови на ткива, клеточни популации, поединечни клетки или од супцелуларни фракции (какви што се рибозомската и митохондриската).

Многу често се користи и методот на изолација на mRNA-фракцијата со **афинитетна хроматографија**, било од претходно изолирана вкупна целуларна RNA или со директна постапка на изолација од примерокот. Имено, поради полиаденилација-

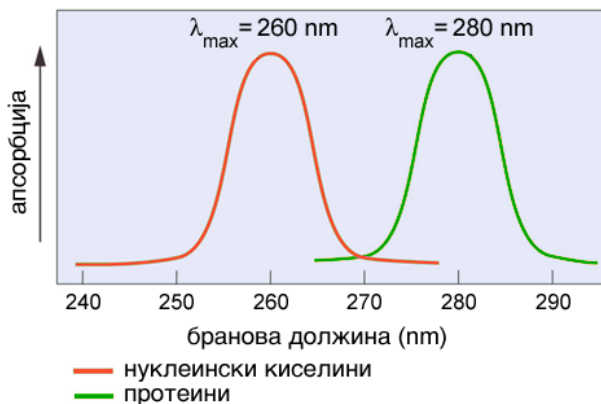
та, mRNA, може да се примени **хроматографски** матрикс на кој ковалентно се врзани полиурацилни олигонуклеотиди, т.е. куси полиурацилни вериги (поли-U). При додавањето на примерокот кој содржи разни RNA-молекули во колона со хроматографскиот матрикс, полиаденинските опашки на mRNA хибридуваат со комплементарните полиурацилни вериги на матриксот, за разлика од молекулите на rRNA и tRNA кои заедно со останатите молекули се испираат од колоната. На крајот, mRNA-молекулите се елуираат со соодветен пуфер (слика 20-2).



**Слика 20-3:** Шематски приказ на принципот на изолација на mRNA со афинитетна хроматографија.

Меѓу најефикасните и најчесто користени методи за изолација на вкупна клеточна RNA се тие кои вклучуваат употреба на гуанидин тиоцијанат. Гуанидинските соли предизвикуваат разрушување на клеточните мембрански структури и силна денатурација на протеините. Покрај ослободувањето на RNA од клетките, истовремено се инхибираат RN-азите, кои како и другите протеини денатурираат во присуство на гуанидинските соли. Кон брзата инхибиција на RN-азите допринесува и присуството на редуцирачкиот агенс 2-меркаптоетанол. Со тоа се овозможува ефикасно изолирање на интактна RNA дури и од ткива богати со ендогени RN-ази, каков што е панкреасот. Во натамошната постапка се врши раздвојување на растворената RNA од протеините и од DNA со фенол/хлороформ екстракција, при што во кисела средина, растворливоста на DNA е намалена и таа останува во органската фаза на реакциската смеша, додека RNA се партиционира во водената фаза. Екстрахираната RNA дополнително се пречистува преку преципитирање со изопропанол.

Квантитативниот принос на изолираните нуклеински киселини и степенот на несаканата контаминација со протеини најчесто и наједноставно се проценуваат спектрофотометриски според апсорпцијата на UV-светлината. Принципот на оваа метода се заснова на различниот апсорпциски максимум на нуклеинските киселини наспроти протеините (слика 20-3).



**Слика 20-3:** Апсорпциски вредности на нуклеинските киселини (двоверижна DNA) и на протеините при спектрофотометриска анализа во UV-подрачјето од спектарот.

## 20.2 Рестрикциска дигестија на DNA

Повеќето DNA-молекули се премногу големи за да бидат ефикасно анализирани или манипулирани во текот на лабораториските постапки. Циркуларните бактериски геноми, а особено хромозомските еукариотски DNA-молекули, се екстремно долги (и по неколку милиони базни парови), од што произлегува потребата за нивно пресекување до помали фрагменти кои далеку полесно можат да се манипулираат. Пресекувањето со физички методи е нерепродуцибилно, поради тоа што DNA-веригите се прекинуваат на случајни места. Едно од најзначајните откритија во молекуларната биологија и генетика се рестрикциските ендонуклеази, ензими кои препознаваат специфична секвенца во DNA-молекулот и предизвикуваат двоверижни прекини на фосфодиестерските врски.

За одбрана од бактериофазите, кај некои бактерии во тек на еволуцијата се појавиле посебни ензими означени како **рестрикциски ендонуклеази** кои го катализираат пресекувањето на туѓата двоверижна DNA создавајќи куци, неинфективни фрагменти. Од биохемиски аспект, овие ензими ги хидролизираат фосфодиестерските врски во полинуклеотидната DNA-верига. Најден е поголем број рестрикциски ензими, но, секој од нив е ограничен (оттаму и називот - рестрикциски) при пресекувањето на двоверижната DNA во строго специфична секвенца наречена **рестрикциска позиција** или **место на препознавање**.

Бактериските клетки не ја пресекуваат сопствената DNA поради метилирање на нуклеотидите во рестрикциските позиции. Имено, бактериите поседуваат модифицирачки ензими наречени **метилази**, кои при репликацијата додаваат метилни групи ( $-\text{CH}_3$ ) на определени бази во геномот на домаќинот. Метилацијата на базите

кај домаќинот го прави местото на препознавање непрепознатливо за рестрикциските ензими, наспроти неметилираната бактериофагна DNA која лесно се препознава и се пресекува. Освен бактериите, ниенден друг биолошки ентитет нема свои рестрикциски ендонуклеази, па, затоа во текот на еволуцијата кај другите организми не се селектирала некаква заштита од нивната активност.

Кој било DNA-молекул (без разлика на тоа дали е вирусен или човечки) може статистички случајно да содржи повеќе рестрикциски позиции за разни ендонуклеази. Тие позиции немаат никакво функционално значење за организмот чија DNA е во прашање.

Имињата на рестрикциските ендонуклеази се дадени според бактерискиот вид и сој од кој се изолирани. На пример: ензимот *Bam*HI (изолиран од *Bacillus amyloliquifaciens* сој H), *Sma*I (од *Serratia marcescens*) или *Hpa*I (од *Haemophilus parainfluenzae*). Римските бројки се однесуваат на редоследот по кој од еден ист бактериски вид и сој се изолирани повеќе различни ендонуклеази. Два различни рестрикциски ензима кои препознаваат една иста секвенца се нарекуваат **изошизомери**.

Од бактериите досега се изолирани три типа на рестрикциски ензими.

**Типот I** ги опфаќа ензимите кои препознаваат своето специфично рестрикциско место во DNA-молекулот, но, го пресекуваат на поголемо и варијабилно растојание од самото место (понекогаш и 1000 базни пара подалеку). Овие ендонуклеази имаат бизарна особина да се инактивираат после само едно пресекување, што е невообичаено за ензимите, воопшто, кои најчесто вршат екстремно голем број реакции една по друга. Поради тие причини, како и поради непостојаноста на должината на фрагментите кои се добиваат со дигестијата, ензимите од овој тип немаат експериментална примена во молекуларната биологија.

Ензимите од **типот II** ја препознаваат рестрикциската позиција и на истото место го пресекуваат DNA-молекулот и токму овој тип ендонуклеази се користи во генетскиот инженеринг.

Ендонуклеазите од **типот III** ја препознаваат рестрикциската позиција и го пресекуваат DNA-молекулот во непосредна близина (најчесто околу 25 базни пара од рестрикциското место) и не се користат во лабораториски цели.

Повеќето рестрикциски ендонуклеази пресекуваат специфични двоверижни DNA-секвенци со должина од 4 до 8 базни пара означени како **палиндроми**. Тоа се позиции во DNA-молекулот кои имаат иста секвенца на двете комплементарни вериги доколку се прочитаат од 5'- кон 3'-насока и обратно.

На пример, ензимот *Eco*RI (именуван според потеклото: од бактеријата *E. coli*, сој R, прв изолат) го пресекува DNA-молекулот само кај следнава секвенца во двојниот DNA-хеликс:



Ензимот *Eco*RI има две идентични активни места на неговите две субединици со коишто симултано ги сече двете вериги меѓу G и A од секоја верига.

При дигестија на геномска DNA, оваа ендонуклеаза ја препознава специфи-

чната рестрикциска позиција независно од преостанатата нуклеотидна секвенца и предизвикува прекин на двоверижниот молекул:



Во овој пример, асиметричното пресекување на DNA-молекулот кај рестрикциската позиција, создава фрагменти со едноверижни краевии кои стрчат. Тие се нарекуваат и **кохезивни** или **лепливи краевии** и се подобни за спонтано анилирање и лигирање со комплементарни фрагменти. Постојат ензими со чија дигестија не се создаваат краевии кои стрчат на местата на пресекување на DNA-молекулите, односно остануваат тапи (рамни) краевии. Според испакнатоста (протрузијата) на краевите од двоверижните дигестирани фрагменти, рестрикциските ензими можат да се поделат на 3 класи:

- Рестрикциски ендонуклеази кои создаваат **5'-краевии кои стрчат**:



- Рестрикциски ендонуклеази кои создаваат **3'-краевии кои стрчат**:



- Рестрикциски ендонуклеази кои создаваат **тапи краевии**:



Неколку примери на почесто користените рестрикциски ендонуклеази се прикажани во **табелата 20-1**.

Бројот на нуклеотидни паровии кои ги препознаваат ендонуклеазите во рестрикциската позиција, варира, и најчесто е од 4 до 6, па, и 8 и повеќе базни пара. При рестрикциската дигестија на куси DNA-молекули или на вирусните геноми, кои имаат десетици илјади базни пара, можат да се добијат само неколку фрагменти. Наспроти тоа, пресекувањето на типичен еукариотски хромозом, кој има десетици милиони базни пара, резултира со далеку поголем број на фрагменти.

Постојат и ендонуклеази кои се изолирани од различни бактериски организми, но, препознаваат иста рестрикциска секвенца. Овие ензими се нарекуваат **изошизомери**. На пример, секвенцата 5'-CGTACG-3' ја препознаваат и ендонуклеазата *SphI* и *BbuI* и ја пресекуваат на ист начин: CGTAC↓G. За разлика од нив, ензимите кои препознаваат исти рестрикциски секвенци, но, ги пресекуваат меѓу различни нуклеотиди, се означуваат како **неошизомери**. На пример, секвенцата 5'-GGCGCC-3' ја препознаваат четири комерцијално достапни ензими, но, ја пресекуваат на различни места: *NarI* (GG↓CGCC), *BbeI* (GGCGC↓C), *EheI* (GGC↓GCC) и *KasI* (G↓GGCC).

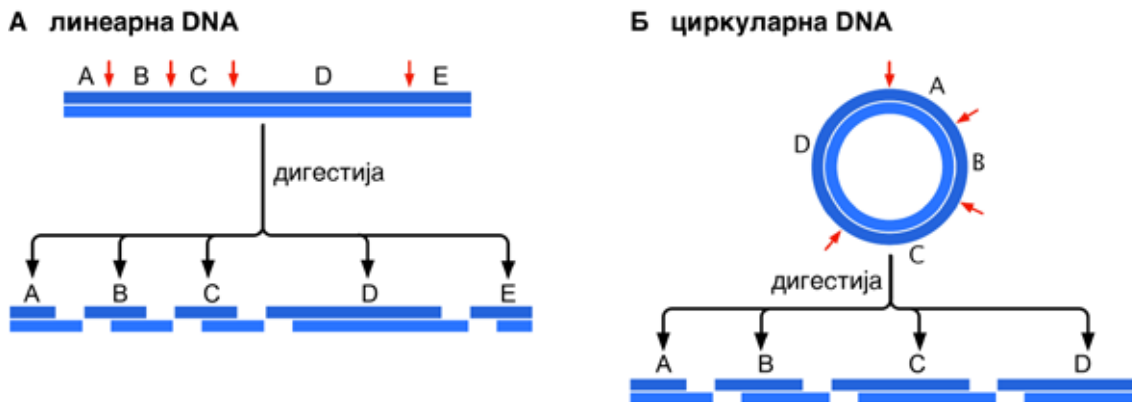
Табела 20-1: Примери на рестрикциски ендонуклеази		
ензим:	бактерија од која е излоиран	рестрикциска секвенца
<b>Bam</b> HI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	G↓GATC C C CTAG↑G
<b>Bgl</b> II	<i>Bacillus globigii</i>	GCCN NNN↓NGGC CGGN↑NNN NCCG
<b>Dra</b> II	<i>Deinococcus radiophilus</i>	RG↓GNC CY YC CNG↑GR
<b>Eco</b> RI	<i>Escherichia coli</i> сој RY13	G↓AATTC CTTAA↑G
<b>Eco</b> RII	<i>Escherichia coli</i> сој RY13	↓CCWGG GGWCC↑
<b>Eco</b> RV	<i>Escherichia coli</i> сој J62/pGL74	GAT↓ATC CTA↑TAG
<b>Hpa</b> II	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	C↓CG G G GC↑C
<b>Mbo</b> I	<i>Moraxella bovis</i>	↓GATC CTAG↑
<b>Nde</b> II	<i>Neisseria denitrificans</i>	↓GATC CTAG↑
<b>Not</b> I	<i>Nocardia otitidis-caviarum</i>	GC↓GGCC GC CG CCGG↑CG
<b>Sau</b> I	<i>Staphylococcus aureus</i>	CC↓TNA GG GG ANT↑CC

**Легенда за симболите:** N = која било од четирите бази: A или G или C или T); W = A или T; R = која било од пуринските бази A или G); Y = која било од пиримидинските бази C или T).

Во молекуларната биологија, рестрикциската дигестија се применува за добивање DNA фрагменти со дефинирани 5'- и 3'-краеви и со определена должина. Поради специфичноста за точно определена нуклеотидна секвенца, пресекувањето на DNA-молекулите со овие ензими е репродуцибилно, па, тие се користат исклучително често како еден вид на молекуларни ножички (**слика 20-4**).

При пресекувањето на линеарниот DNA-молекул се добиваат фрагменти чиј број е за еден поголем од бројот на рестрикциските места за соодветната ендонуклеаза. Кај циркуларната DNA, бројот на фрагменти е еднаков со бројот на рестрикциски места за пресекување.

Во технологијата на рекомбинантна DNA, рестрикциските ензими имаат улога на молекуларни „ножици“ за специфично пресекување на двоверижната DNA, а лигазите се користат како молекуларно „лепило“ за повторно формирање на полинуклеотидната верига кај анилираните фрагменти.



**Слика 20-4:** Ензимска дигестија на двоверижна линеарна (А) и на циркуларна (Б) DNA-молекул пресечен со ендонуклеаза која создава 5'-краеви кои стрчат. Бројот на DNA-фрагменти, како и должината на секој од нив зависи од местоположбата на рестрикциските места (обележани со црвени стрелки).

## DNA лигаза

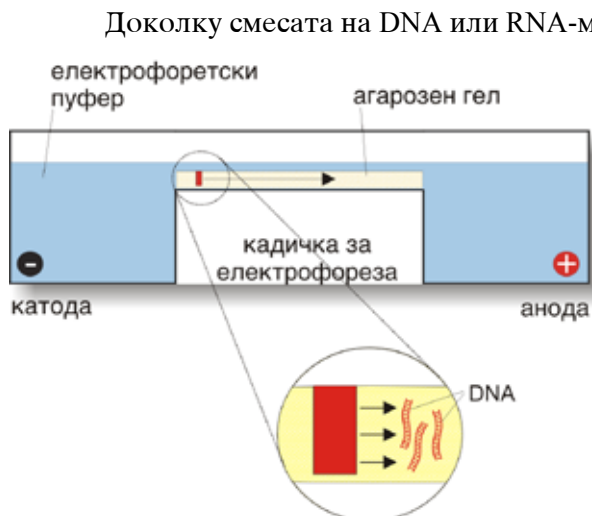
Како што е веќе опишано во поглавјето за DNA-репликација, воспоставувањето ковалентни фосфодиестерски врски меѓу 3'-хидроксилната група од една полинуклеотидна DNA-верига и 5'-фосфатната група од друга верига се нарекува лигација, а ензимите кои го извршуваат овој процес се **DNA-лигазите**. За разлика од рестрикциската дигестија, во текот на лигацијата се троши енергија обезбедена со хидролиза на АТФ. Овој ензим се користи многу често во генетскиот инженеринг.

## 20.3 Електрофореза на нуклеинските киселини

Електрофоретските техники се користат за раздвојување и идентификација на нуклеинските киселини според должината. Во определена фаза на речиси сите анализи на DNA во молекуларната биологија се применува некоја електрофоретска техника. Електрофорезата на DNA е составен дел од посложените методи, меѓу кои Сатерн блотинг анализата, DNA-секвенционирањето и други.

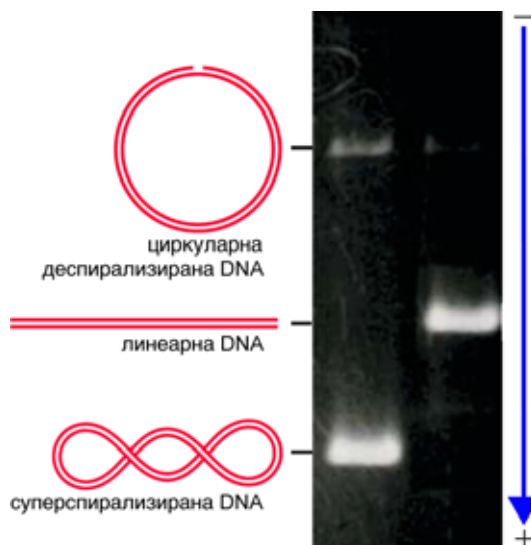
Принципот на оваа електрофореза е релативно едноставен. Имено, поради својот негативен електростатски полнеж во неутрален или благо алкален раствор, нуклеинските киселини патуваат во електрично поле во насока од електронегативната електрода (катада) кон позитивната електрода (анода). Доколку електричното поле се спроведува низ порозен гел (обично агарозен или полиакриламиден), порите на гелот дејствуваат како молекуларно сито низ кое се провлекуваат молекулите на нуклеинските киселини, носени од електрофоретската сила. Поради тоа, подолгите молекули се задржуваат низ порите и патуваат побавно во однос на покусите, кои патуваат побрзо (слика 20-5).





**Слика 20-5:** Принцип на гел-електрофорезата на DNA-молекулите.

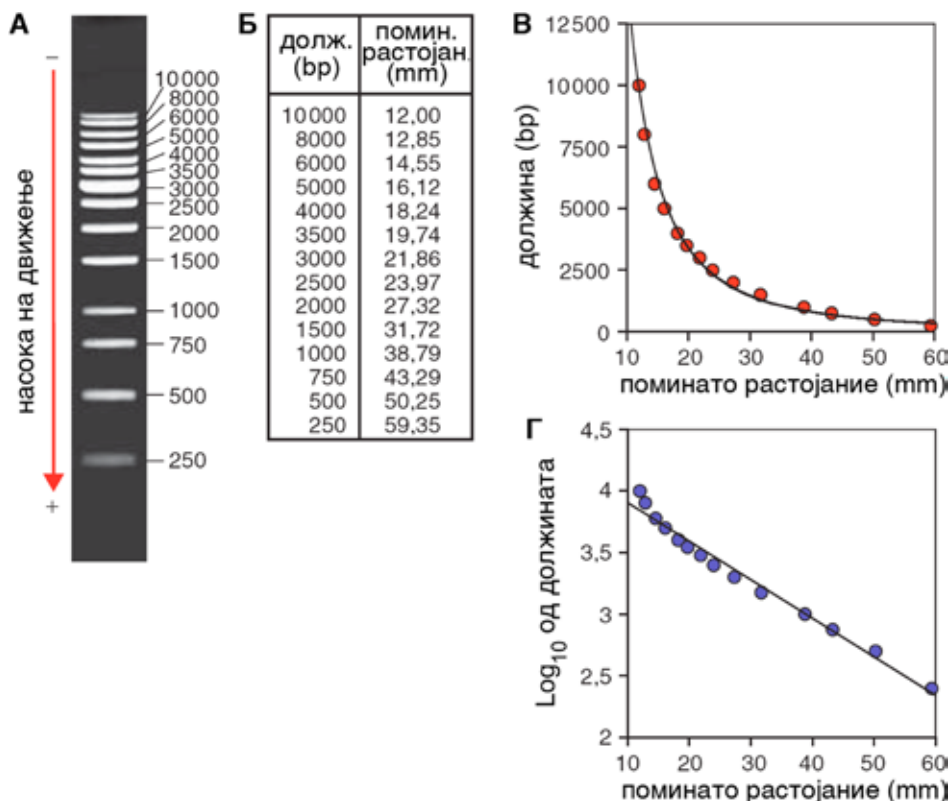
Сепак, нуклеинските киселини се невидливи во гелот, па, за нивно визуализирање се користат разни техники на „боење“. При рутинската DNA-електрофореза најчесто се применува флуоресцентното визуализирање со етидиум бромид. Како што е претходно споменато, тоа е планарен органски молекул кој интеркалира со хеликалните полинуклеотиди. При осветлување со соодветна бранова должина, молекулите на етидиум бромид кои се слободни во растворот флуоресцираат мошне слабо, но, интеркалирани со DNA емитуваат околу 25 пати поинтензивна флуоресценција. Афинитетот на етидиум бромидот е највисок за двоверижна DNA, додека многу послабо се врзува за едноверижни, денатурирани DNA и за RNA-молекулите. Поради тоа, бојењето на електрофоретскиот гел е најефикасно за двоверижна DNA. При осветлување на електрофоретскиот гел обоен со етидиум бромид со UV-светлина со бранова должина од околу 254 nm, електромагнетната енергија го апсорбира DNA-молекулот, а од неа се пренесува на етидиум бромидот кој флуоресцира портокалово-црвена светлина ( $\lambda_{\max}=590$  nm). При осветлување со UV-светлина при 302 до 360 nm енергијата ја апсорбира самиот етидиум бромид, и доколку е врзан со DNA, емитува флуоресцентна портокалова светлина. Иако визуализирањето на DNA-лентите е најефикасно при експонирање на гелот со бранова должина од 254 nm, DNA-молекулите претрпуваат сериозни оштетувања, па, овие гелови не можат да се користат за изолирање на DNA за натамошни анализи или клонирање, па, затоа најчесто се применува светлина со бранова должина од 300 до 315 nm.



**Слика 20-6:** Разлики во електрофоретската подвижност меѓу три различни DNA-топоизомери со идентична должина на бази парови.

Покрај молекулската маса, т.е. должината изразена во базни парови, врз електрофоретската подвижност на DNA-молекулите влијае и нивната форма и тополошки својства. Циркуларните двоверижни DNA-молекули, доколку се во релаксирана, (несуперспирализирана форма) или имаат едноверижан прекин, патуваат побавно од линеарните двоверижни DNA-молекули, со иста молекулска маса. Поради поголемата компактност и помалиот ефективен волумен, суперспиралните двоверижни DNA-молекули (какви што се плазмидите, на пример) се електрофоретски побрзи отколку помалку спирализираните или целосно релаксирани DNA-молекули со идентична молекулска маса (т.н. DNA-топоизомери) (слика 20-6).

При гел-електрофорезата, покрај DNA-примероците за анализа, речиси по правило се аплицира **DNA маркер**, односно смеса на DNA-молекули со позната должина, а се користат за изработка на калибрациска крива. Кривата се користи за пресметување на непознатата должина на испитуваните DNA-молекули. За таа цел, често се употребува смеса од DNA-фрагменти добиени со дигестија на DNA од плаزمиди или бактериофаги, кои на гелот се гледаат како меѓусебно оддалечени



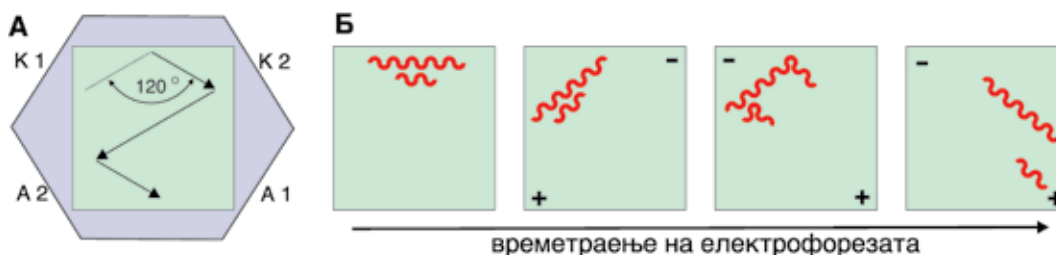
**Слика 20-7:** Определување на должината на DNA-фрагментите со гел-електрофореза. **А:** приказ на една вертикална линија од електрофоретскиот гел каде е нанесен DNA-маркерот. **Б:** табела со вредности на должината на секој поединечен DNA-фрагмент од DNA-маркерот (во базни парови) и поминатото растојание (изразена во милиметри) до кое допатувала секоја поединечна електрофоретска лента. **В:** сооднос на должината на DNA-фрагментите од маркерот и поминатото растојание прикажан во форма на крива во линеарен координатен систем. **Г:** со нанесување на декадниот логаритам од должината на DNA-фрагментите се добива линеарна зависност (во определен опсег).

ленти што личат на пречки од скалила (англ. *ladder*) (слика 20-7, А). Достапни се и голем број комерцијално подготвени DNA-маркери кои можат да се избираат според потребниот опсег на должини на DNA-фрагментите што треба да се раздвојат со електрофорезата.

За изработка на калибрациската крива потребно е да се измери електрофоретска подвижност на секој DNA-фрагмент од маркерот и тоа од отворот за апликација до соодветната лента која одговара на тој фрагмент (слика 20-7, Б). Вредностите за поминатото растојание (изразени во милиметри) наспроти должината на секој DNA-фрагмент, се внесуваат на милиметарска хартија или во соодветна компјутерска програма за графикони, со што се конструира карактеристична нелинеарна форма на калибрациска крива (слика 20-7, В).

Доколку се користи семилогаритамски графикон или ако се нанесуваат пресметаните декадни логаритамски вредности од поминатото растојание, тогаш зависноста меѓу изминатото растојание и должината на DNA фрагментите, во определен опсег, е речиси линеарна (слика 20-7, Г).

Електрофоретското раздвојување на многу големи DNA-фрагменти (па дури и на цели хромозоми) со должина од 1 до 10 Mb (мегабазни пара,  $10^6$  bp) е невозможно со стандардните техники, па, во тие случаи се применува посебен метод на гел-електрофореза во пулсно поле, означен како **PFGE** (*Pulse-Field Gel Electrophoresis*) кај кој насоката на електричното поле се менува периодично. Едно од техничките решенија за PFGE е прикажано на слика 20-8. Во хексагоналната плоча на апаратот се поставени низа електроди групирани во четири позиции (две катодни K1 и K2, и две анодни A1 и A2). Во текот на електрофорезата во агарозен гел, во куси временски интервали се менува активноста на паровите на електродите K1 и A1, со парот K2 и A2. Тоа предизвикува промена на аголот на насоката на електричното поле од 120 аголни степени и наизменично релаксирање и издолжување на двојниот хеликс на DNA-молекулот и змијовидно движење низ порите на гелот. Брзината на ова движење е обратно пропорционална со должината на веригите.



**Слика 20-8:** Принцип на електрофореза во пулсно поле. **А:** Промена на аголот на насоката на електричното поле при оваа техника. **Б:** Шематски приказ на раздвојувањето на долгите DNA-молекули во текот на пулсната електрофореза.

Гел-електрофорезата се применува и како препаративна техника за пречистување на определена хомогена популација на DNA-молекули (со речиси идентична должина) од смеса на молекули. Кај современите електрофоретски техники, раздвојувањето на DNA-молекули, речиси, исклучиво се врши во агарозен или во

полиакриламиден гел, а во последните неколку години постои зголемена тенденција на користење капиларна електрофореза.

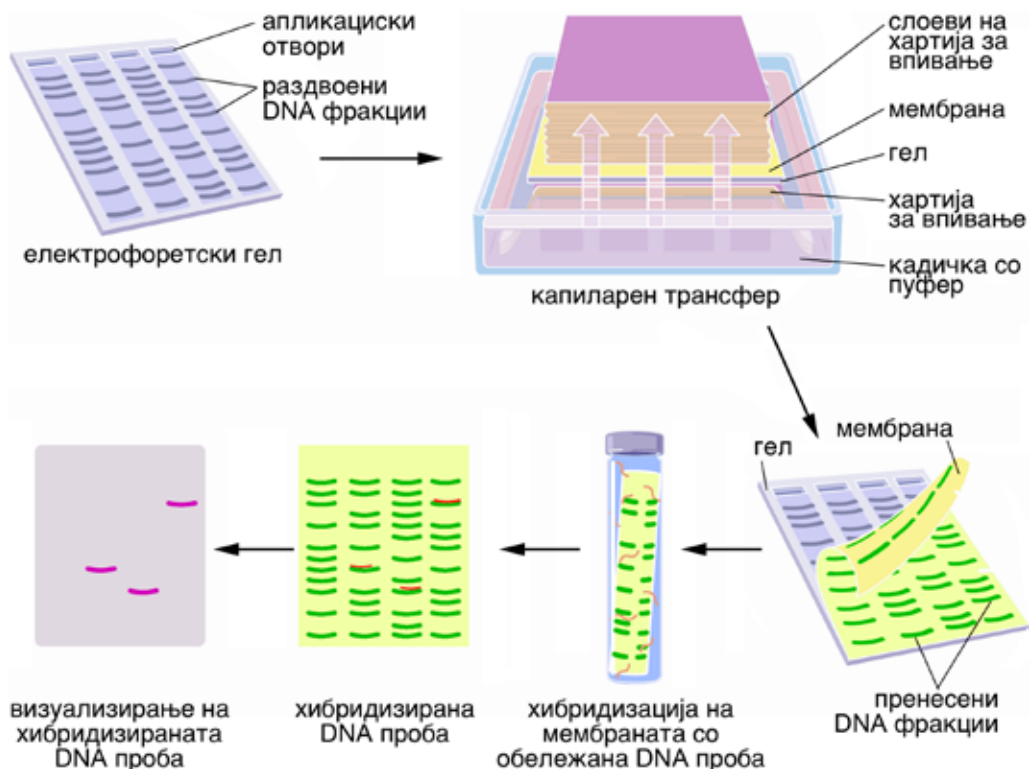
Електрофорезата се користи за раздвојување и на RNA-молекулите. Но, и покрај сличните физичко-хемиски принципи и техничка изведба, сепак RNA-електрофорезата има и свои специфики по кои се разликува од електрофоретското раздвојување на DNA-молекулите. Како што е претходно објаснето, линеарните двоверижни DNA-молекули имаат униформна секундарна структура, па, нивната електрофоретска подвижност е пропорционална на молекулската маса. Наспроти тоа, речиси сите RNA-молекули се едноверижни и поседуваат екстензивни секундарни, па, и терциерни секундарни структури, кои значително влијаат врз нивната електрофоретска подвижност. Поради тие причини, пред електрофорезата се врши денатурација на RNA-примероците со силни хаотропни (денатуирачки) соединенија какви што се формалдехидот или глиоксалот. Тие ги нарушуваат интрамолекуларните водородни врски меѓу комплементарните бази по должината на RNA-веригата, а со тоа и секундарните структури, а го спречуваат и нивното повторно создавање.

## 20.4 Хибридизација на нуклеински киселини и Сатерн блотинг-анализа

Детекцијата на присуството на точно дефинирани секвенци во DNA-молекулите со помош на хибридизација е една од техниките со најдолга употреба во молекуларната биологија. Хибридизациските методи одиграле важна улога во повеќе важни експериментални откритија во молекуларната биологија и генетскиот инженеринг. Методот при кој електрофоретски раздвоените DNA-фрагменти се пренесуваат од гелот врз мембраната и се откриваат преку хибридизација со специфична сонда се означува како **Сатерн блотинг** (транскрипт од англ. *Southern blotting*). Името е кованица од презимето на инвенторот на методот Едвин Сатерн (Edwin Southern, 1975), и зборот впивање (англ. *blotting*) што го означува процесот на капиларно впивање на DNA-фрагментите од гелот врз мембраната (**слика 20-9**).

Електрофоретски раздвоените DNA-фракциите се пренесуваат врз површината на најлонска или нитроцелулозна мембрана со помош на капиларно впивање. Пренесените DNA-молекули се фиксираат врз површината на мембраната (најчесто со загревање). За да се овозможи хибридизација, двоверижните DNA-молекули се денатуираат со инкубирање на мембраната во алкален раствор. Хибридизацијата се изведува со инкубирање на мембраната во раствор кој содржи обележана DNA-сонда која хибридизира со комплементарните DNA-молекули кои се претходно впиени на мембраната. Во зависност од типот на обележување, хибридизираната DNA-сонда се визуализира на мембраната со што специфично се идентифицираат електрофоретски раздвоените DNA-фракции кои ја содржеле тражената нуклеотидна секвенца.

При оптимални услови (температура, pH-вредност, јонска јачина на растворот во кој се врши хибридизацијата), обележаната DNA-сонда хибридизира со комплементарните DNA-молекули кои се претходно електрофоретски раздвоени. DNA-сондите се едноверижни и обично се долги стотици до илјадници нуклеотиди, а доволно е да се хибридизирани барем со поголем бој од целните DNA-секвенци.



**Слика 20-9:** Принцип на техниката Сатерн блотинг. Во основа, оваа техника се одвива преку раздвојување на DNA-фрагментите со електрофореза во агарозен гел, трансфер на DNA-фрагментите од гелот врз најлонска или нитроцелулозна мембрана и хипридизација со специфична DNA сонда.

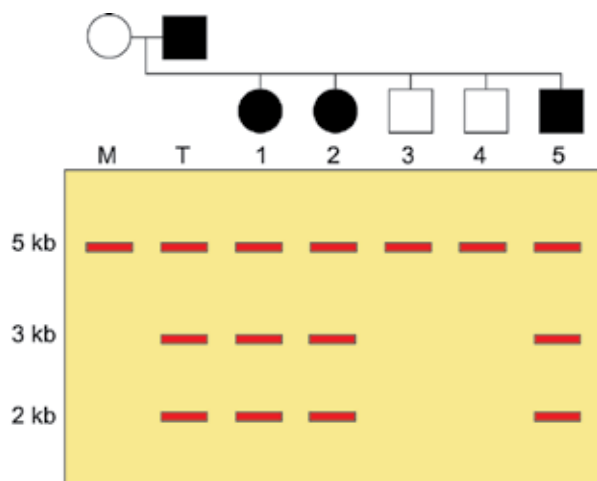
Со децении, обележувањето на DNA-сондите се вршело преку директно инкорпорирање на нуклеотиди кои содржат радиоизотопни атоми каков што е  $^{32}\text{P}$  и други, а детекцијата се изведувала со автордиографија. Поради енвайронменталните проблеми и ризикот при работа, како и со заострувањето на прописите за користење на радиоактивни материи, овој тип на детекција станува сè помалку користен. Директното обележување на сондите со флуоресцентни молекули се применува во последниве години при некои специјални техники базирани на хипридизација (микрочипови, DNA-матрици и слични), но, не се користи рутински при класичната Сатерн или дот-блот хипридизација. Кај индиректното нерадиоактивно обележување на DNA-сондите се применуваат модифицирани нуклеотиди со кои хемиски се врзани определени молекули, какви што се дигоксигенинот или биотинот.

За определување на транскрипциската активност на некој ген, односно неговата експресија, се врши анализа на електрофоретски раздвоени mRNA-молекули преку хипридизација со комплементарна DNA-сонда. За таа цел, од испитуваното ткиво или култивирани клетки се врши екстракција на вкупната популација на mRNA-молекули и тие се раздвојуваат електрофоретски според должината, како и кај техниката Сатерн блотинг. По пренесувањето на фракциите врз површината на мембраната, хипридизацијата се врши со обележана комплементарна DNA или олигонуклеотидна сонда. Сигналот кој ќе се визуализира, не само што ќе одговара на

очекуваната должина на RNA-транскриптот од тој ген, туку и интензитетот на оваа електрофоретска лента (англ. *band*) ќе биде пропорционална на бројот на mRNA-молекули. Оваа техника, наречена **RNA-блотинг** или популарно **нортерн блотинг** овозможува, во прецизно контролирани услови, квантитативно определување на нивото на генската експресија. Интересно е што називот на оваа техника е даден со своевидна шега во номенклатурата. Имено, со оглед на тоа што зборот Сатерн во истоимената DNA-хибридизациска техника во англискиот јазик означува јужен, новата техника хибридизација на RNA е наречена на англиски: **northern blotting** (во буквален превод од англиски: северно впивање). Подоцна откриената техника при која електрофоретски се раздвојуваат протеини, а потоа се пренесуваат врз мембрана и се откриваат со врзување на специфични антители (аналогно на хибридизацијата) е наречена **western blotting** (на англ. западно впивање). Оваа техника е подетално објаснета во натамошниот текст од оваа глава, посветен на протеинските методи.

### Пример за испитување на поврзаност на вродено заболување со определен ген

Во следниов хипотетичен пример се испитува постоење на некое автозомно доминантно заболување во семејство во кое специфичните симптоми се јавуваат кај таткото, двете ќерки и едниот син, додека мајката и другите два сина се без знаци на болеста. Со нивна согласност, од секој член на семејството е земен примерок на венска крв од кој е изолирана геномска DNA. По дигестијата со рестрикциската ендонуклеаза *EcoRI* и електрофорезата во агарозен гел, фрагментите се пренесени врз најлонска мембрана и се откриени со обележана DNA-сонда добиена од геномска библиотека на клонирана хумана DNA. Резултатите од испитувањето во однос на секоја индивидуа од семејството се прикажани на **сликата 20-10**.



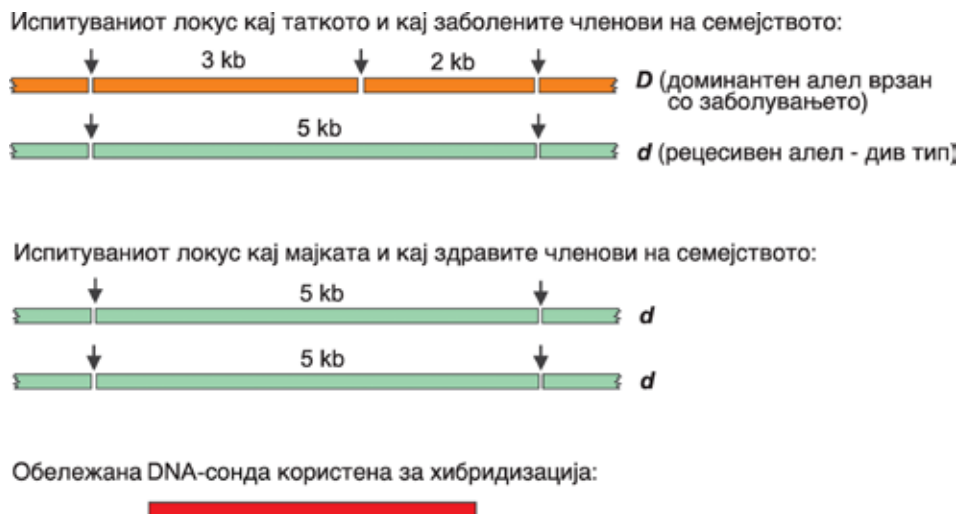
**Слика 20-10:** Пример за Сатерн блотинг анализа на семејство во кое со специфична DNA-сонда се анализира присуството на дигестиските продукти на алелот кој е поврзан со хипотетичното заболување. Во родословното стебло, со кружчиња се означени женските, а со квадратчиња, машките индивидуи; со M - мајката, а со T - таткото на семејството. Заболениите (афектирани) индивидуи се обележани со црни кружчиња или квадратчиња.

Од Сатерн блотот, може да се заклучи дека обележаната DNA-сонда хибридира со три електрофоретски ленти со големина од 5, 3 и 2 kb. Кај сите членови



на семејството се јавува лентата (*band*) со должина од 5 kb, додека истовремената појава на 3 и 2 kb *band*ови има само кај заболените индивидуи (таткото, ќерките 1 и 2 и кај синот 5). Тие не се јавуваат кај незаболените членови на семејството (мајката и синовите 3 и 4).

Според тоа, може да се заклучи дека појавата на двата фрагменти (со должина од 3 и 2 kb) се „врзани“ во *cis*-положба со доминантниот алел **D**, која се претпоставува дека го предизвикува заболувањето (дури и кога е присутен во хетерозиготна состојба). Со оглед на тоа што збирот на 2 и 3 (должините на DNA-фрагментите изразена во илјадници базни парови) е 5, алелот **D** содржи позиција за пресекување со рестрикциската ендонуклеаза *EcoRI*. Рецесивниот алел **d** која се јавува во хомозиготна состојба кај незаболените индивидуи, не ја содржи позицијата за пресекување со ендонуклеазата *EcoRI*. Најверојатниот аранжман на алелите во овој локус кај членовите од испитуваното семејство е како што е прикажан шематски на **сликата 20-11**.

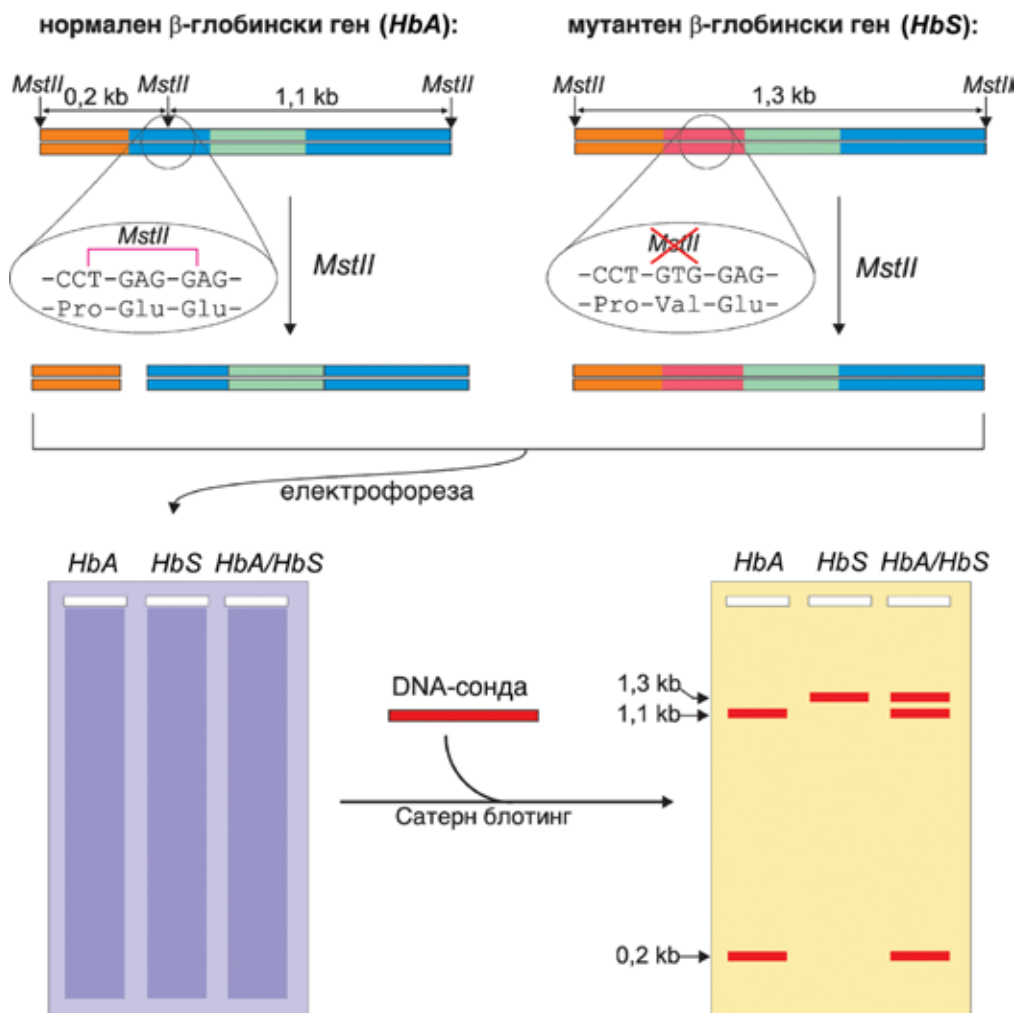


**Слика 20-11:** Шематски приказ на рестрикциското пресекување на нормалниот и на мутираниот алел, како и на специфичната DNA-сонда која се користи за хибридизација при Сатерн блотинг анализата од претходната слика. Обележаната DNA-сонда е прикажана во сразмер со должината и во сооднос со положбата за хибридизација со DNA-фрагментите.

## Пример за детекција на мутација во $\beta$ -глобинскиот ген

Српестата анемија е херeditарно заболување кај кое постои точкеста мутација во генот за  $\beta$ -глобин. Оваа мутација предизвикува замена на аминокиселината глутамин кај нормалниот (див тип) на хемоглобин **A**, со валин во мутираниот хемоглобин **S**. На ниво на DNA-секвенцата, промената на еден нуклеотид резултира со губење на рестрикциската позиција за ендонуклеазата *MstII*, па, DNA-фрагментот на  $\beta$ -глобинскиот ген не се пресекува на таа позиција во мутираниот алел (**слика 20-12**).



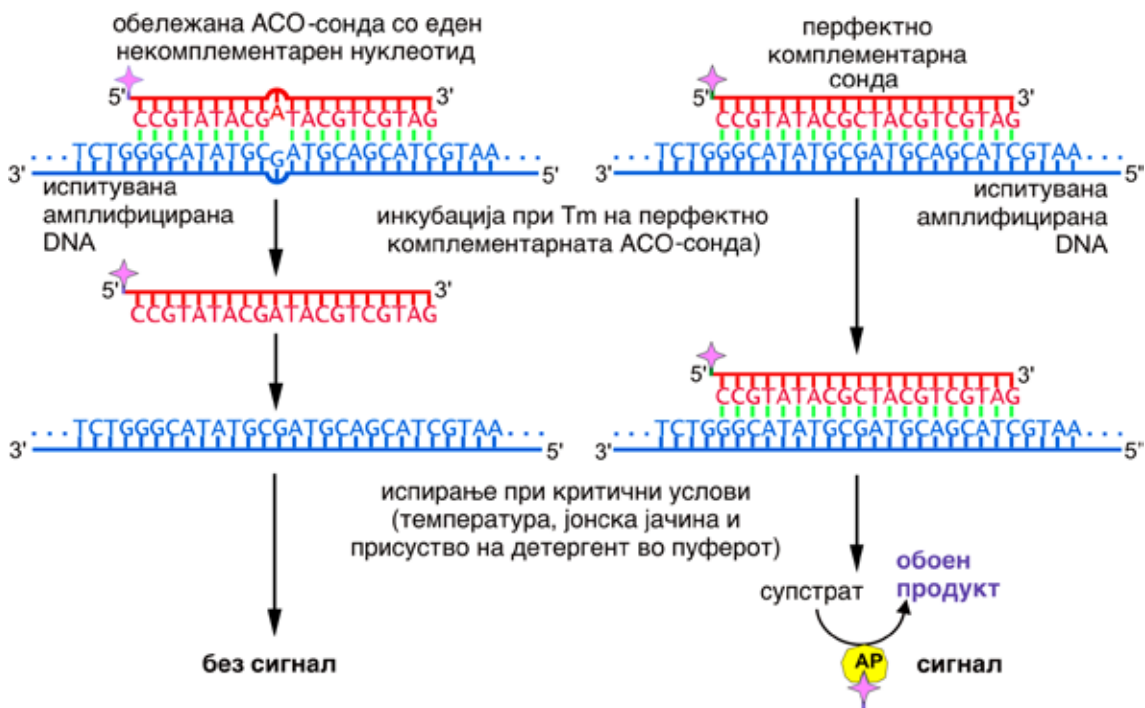


**Слика 20-12:** Пример за Сатерн блотинг анализа. **А:** Рестрикциската ендонуклеаза *MstII* го пресекува немутираниот алел (*HbA*), но, супституцијата на само еден нуклеотид кај мутираниот алел (*HbS*) предизвикува губење на рестрикциското место, што предизвикува разлики во бројот и во должината на DNA фрагментите. **Б:** При електрофорезата се раздвојуваат илјадници DNA-фрагменти кои настанале со дигестија на геномската DNA на голем број места, што оневозможува идентификација на  $\beta$ -глобинскиот алел. При Сатерн блотинг анализата се врши хибридизација со обележана DNA-сонда која е комплементарна со регион од  $\beta$ -глобинскиот алел, па, на блотот се визуализираат само овие алели. На првата позиција се двата рестрикциски фрагменти од алелот *HbA*, на втората позиција е непресечениот фрагмент од мутираниот алел *HbS*, додека на третата позиција е примерок од хетерозиготна индивидуа, при што се застапени и пресечените и непресечените DNA-фрагменти.

DNA-молекулот од нормалниот алел се дигестира на два фрагмента, по што се врши електрофореза и трансфер на DNA-лентите од гелот врз мембрана, која се хибридизира со DNA-сонда комплементарна со дел од секвенцата на  $\beta$ -глобинскиот ген. Дигестијата на нормалниот (*HbA*) и на мутантиот алел (*HbS*) од  $\beta$ -глобинскиот ген како и анализата Сатерн блотинг е прикажана на приложената слика.

## Алелно-специфична олигонуклеотидна хибридизација и дот-блотинг

За разлика од долгите DNA сонди кои се користат при Сатерн блотинг анализата, кусите олигонуклеотидни сонди, при прецизни услови можат да хибридизираат само со перфектно комплементарните вериги на испитуваните DNA-молекули. Во такви услови, обележаната олигонуклеотидна сонда хибридизира само со алелот чија DNA-секвенца е целосно комплементарна, па, оттаму и изразот **алелно-специфична олигонуклеотидна (АСО)-хибридизација**. При несовпаѓање на само еден нуклеотид со тие од испитуваната DNA, сондата не се врзува (слика 20-13).

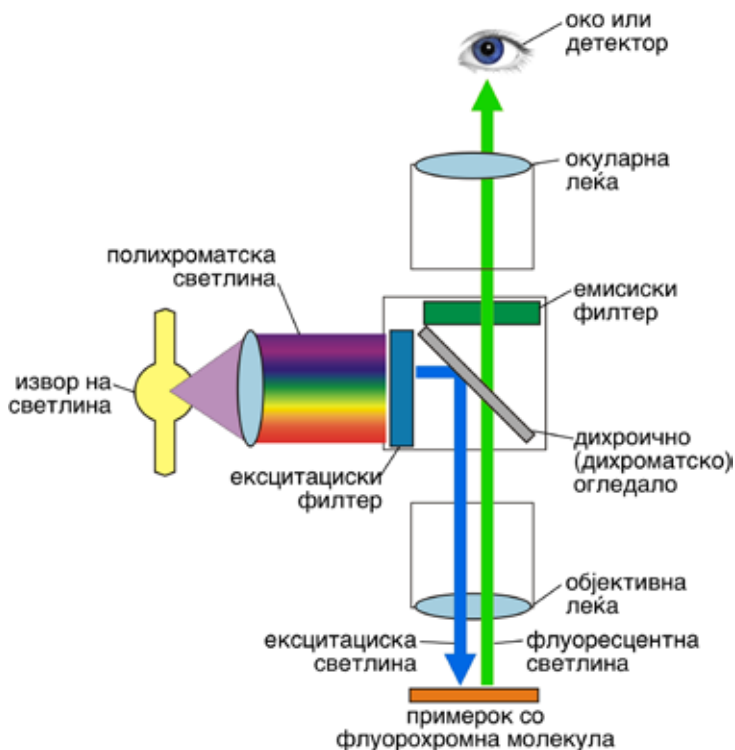


**Слика 20-13:** Поедноставен шематски приказ на принципот на АСО-хибридизацијата. Испитуваните DNA-молекули хибридизираат со обележана куса (олигонуклеотидна) сонда при прецизни услови. Со оптимизација, се постигнува појава на сигналот само при перфектно совпаѓање на секвенците меѓу сондата и испитуваниот DNA-молекул. Сондата може да е обележана со ензим, каков што е алкалната фосфатаза, на пример, па, визуализирањето се врши со соодветна ензимска реакција при која се создава обоен и видлив продукт.

Кај овој метод, често прво се врши амплификација на регионот од DNA-секвенцата која е од интерес, по што амплификациските продукти се нанесуваат врз најлонска или нитроцелулозна мембрана, без претходна електрофореза. Со оглед на тоа што и со двата начина примероците се нанесуваат на мембраната како крупни точки, методот е наречен дот блотинг (од англ. *dot* - точка).

## Флуоресцентна *in situ* хибридизација

Присуството на определена специфична DNA- (или поретко, RNA) секвенца може да се најде и во самите клетки од некој хистолошки препарат или во поединечни клетки. Поради тоа што често се идентифицираат само по една или две секвенци во секоја клетка, сигналот кој треба да се анализира е екстремно слаб, па, е потребна многу почувствителна детекција отколку кај Сатерн или дот-блот анализите. Од тие

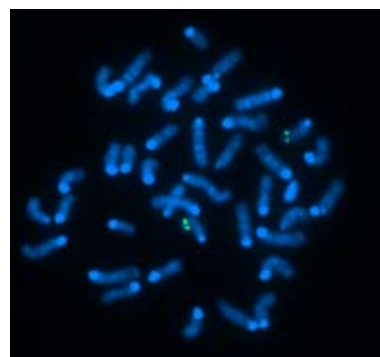


**Слика 20-14:** Шематски приказ на епифлуоресцентна микроскопија. За разлика од стандардното осветлување кај обичниот светлосен микроскоп, кај епифлуоресцентниот микроскоп се применува осветлување низ објективот (епи- е префикс за одозгора на старогрчки). Имено, полихроматската светлина од изворот (најчесто живина лампа под висок притисок) е составена од светлина со повеќе бранови должини, па, се филтрира низ ексцилтацискиот филтер кој ја пропушта само светлината со соодветна бранова должина (450-490 нм, односно сина, во овој пример). Светлосниот сноп се прекршува низ специјално огледало кое се нарекува дихроично (понекаде во литературата и дихроматско) кое е така избрано што селективно и речиси целосно ја рефлектира светлината до определена бранова должина (кај овој пример: под 510 нм), а речиси во целост ја пропушта светлината со поголема бранова должина. Синиот светлосен сноп поминува низ објективот и под прав агол го осветлува објектот на анализата (специјално подготвен ткивен пресек или слој на клетки на предметно стакленце). При присуство на флуорохромни молекули во примерокот се индуцира флуоресценција (520-560 нм, зелена светлина, во примеров). Емитираната светлина поминува низ објективот на микроскопот и низ дихроичното огледало, а потоа се филтрира низ емисискиот филтер кој ја попречува евентуално рефлектираната ексцилтациска светлина која, колку и да е слаба, може да ја намали чувствителноста и квалитетот на анализата. Понатаму, филтрираната флуоресцентна светлина се фокусира преку окуларната леќа во окото на набљудувачот или врз светлосниот детектор (дигиталната камера или, порано, фотографскиот филм).

причини, олигонуклеотидната или DNA-сондата се обележува со соодветен флуоресцентен молекул (флуорохром), па, техниката се нарекува **флуоресцентна *in situ* хибридизација (FISH)**, од англ. *fluorescent in situ hybridization*). На располагање се голем број флуорохроми, а меѓу најчесто користените е **флуоресцинот** кој се ексцитира со сина светлина (бранова должина од 494 nm), а емитира зелена флуоресцентна светлина со бранова должина од 518 nm. За практична примена на FISH-техниката, во денешно време, најчесто се користи епифлуоресцентен модел на микроскоп (**слика 20-14**).

Поради интензивниот флуоресцентен сигнал, FISH-техниката е екстремно сензитивна и, теоретски, може да се визуализира и само една целна DNA-секвенца во испитуваната клетка или во ткивниот пресек. Принципите на хибридизирање на долгите DNA-сонди или на кусите олигонуклеотидни сонди, се исти како и при Сатерн блотинг, односно дот-блот анализата, со тоа што ткивниот микротомски пресек или клетките на предметното стакленце мораат да бидат посебно третирани за да станат пропустливи за сондите, како и да се изврши денатурација на двоверижните DNA-молекули во самите клетки. Покрај тоа, потребни се и оптимизирани услови при кои флуоресцентно обележаните сонди хибридизираат само со перфектно комплементарните вериги на испитуваните DNA-молекули од ткивото или клетките.

Голема предност на FISH-техниката е морфолошката компонента на анализата, односно можноста за ткивната или клеточната локализација на бараната секвенца во примерокот. Оваа техника се користи за детекција на испитуваните алели во јадрената или митохондриската DNA, за идентификација на вируси во клетките и ткивата, а особено често се користи за цитогенетски анализи, односно за идентификација на поединечните хромозоми, нивните аберации (особено структурните), како и за хромозомска локализација на специфичните секвенци и мутации. Се применува и во медицинските испитувања, особено во патологијата, а можат да се користат и архивирани парафинизирани ткивни примероци. Пример за детекција на поединечни DNA-секвенци во диплоидна клетка е прикажан на **сликата 20-15**, а пример за цитогенетска примена на FISH-техниката е даден претходно во текстот.



**Слика 20-15:** Пример за користење на FISH техниката во молекуларните истражувања на кариотипот на лабораторискиот глушец. На сликата снимена со дигитална камера на епифлуоресцентен микроскоп се гледаат метафазни хромозоми обоени со флуоресцентната боја DAPI која неспецифично се врзува со хромозомската DNA, па, ја овозможува нивната визуализација на темна позадина. DNA сондата која е специфична за секвенца на дисталниот крај од хромозомот 11 е обележана со флуоресцин изотиоцијанат (FITC) и се забележува како две точки со зелена боја на двете хроматиди и на двата пара од овој хромозом.

## 20.5 Полимеразна верижна реакција (PCR)

Откривањето на полимеразната верижна реакција од страна на Мулис (Kary Mullis) во 1985 година, предизвика вистинска револуција во молекуларната биологија, за што на нејзиниот инвентор му е доделена Нобеловата награда за хемија во 1993 година. Засега нема друга техника со толкаво влијание врз молекуларно-биолошката методологија, каква што е PCR. Таа е незаменлива молекуларна алатка во истражувањата и дијагностиката на голем број херидитарни заболувања, неоплазми, инфективни болести и други медицински гранки, во базичната биологија, еколошките и во енвайронменталните истражувања, во фармацијата, ветерината, земјоделието, како и други дисциплини.

PCR-техниката се користи за умножување (амплификација) на DNA-секвенци од многу мало почетно количество на испитуван биолошки материјал. Теоретски, од само еден DNA-молекул, со PCR можат да се добијат милијарди идентични DNA-копии означени како **ампликони**.

Според крајниот ефект, со PCR техниката се постигнува *in vitro* амплификација, односно еден вид молекуларно клонирање без клетки. Амплифицираната DNA понатаму може да се користи за разни молекуларно-генетски анализи, каква што е детекцијата на генски мутации и полиморфизми или идентификацијата на микробиолошки агенси. PCR-амплификацијата е исклучително сензитивна техника со која може да се амплифицираат доволен број на DNA-молекули за да бидат видливи при стандардна агарозна електрофореза, дури и кога почетниот материјал е само една или неколку клетки, влакно, или слично екстремно мало количество на биолошки материјал кој содржи неколку молекули матична DNA. Кај PCR-реакцијата се врши репетитивна, двонасочна ензимска синтеза на ограничени сегменти од DNA-молекулите. Синтезата ја катализира термостабилната DNA-полимераза, каков што е ензимот **Taq**, изолиран од термофилната бактерија *Thermus aquaticus*.

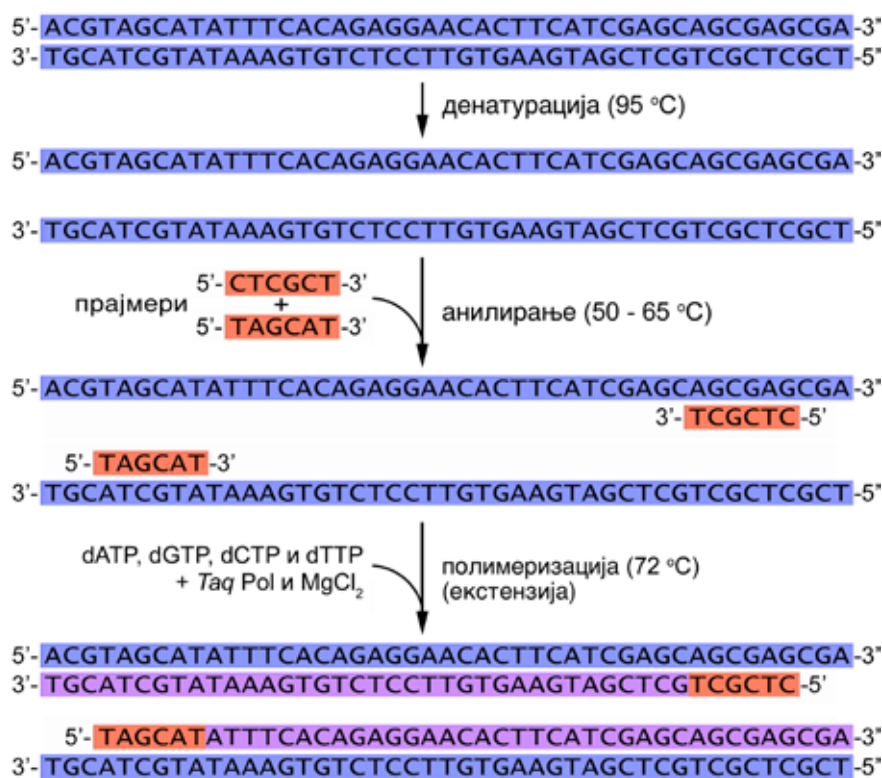
За започнување на DNA-полимеризацијата неопходни се куси иницирачки олигонуклеотиди - **прајмери**, а секој од нив мора да биде комплементарен со 5'-краевите од двете вериги на DNA-регионот кој се амплифицира. Оттаму произлегува дека PCR-амплификацијата е возможна само доколку однапред е позната секвенцата на бочните краеве од регионот на DNA кој е од интерес. Тоа подразбира дека регионот е клониран и секвенциониран, или нуклеотидната секвенца е достапна од литературата или од базите на генски податоци на интернет (на пример The Genome Database: <http://gdbwww.gdb.org/>). DNA-регионот кој се амплифицира е означен како **ампликон** и е ограничен со бочните секвенци на кои анилираат прајмерите.

Со рутинската PCR-техника можат лесно да се амплифицираат сегменти со должина од неколку стотици, па, сè до неколку илјади базни пара. Постојат и посебни комерцијални сетови со рекомбинантни полимерази со кои е можна амплификација и на повеќе од 10 kb DNA-региони.

## Принципи на PCR-амплификација

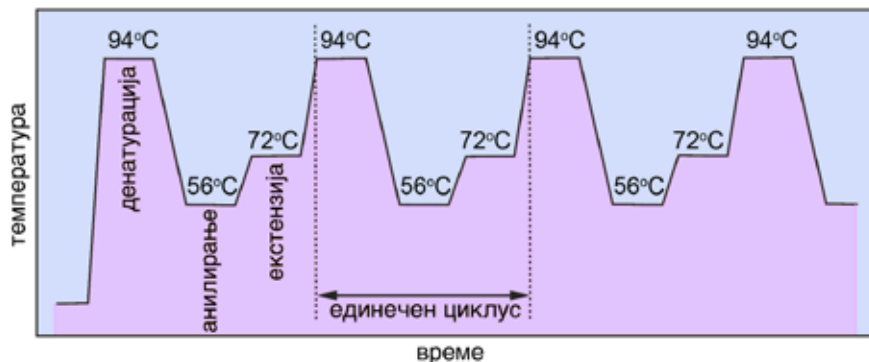
Во текот на PCR реакцијата се вршат циклични промени на температурата во реакциските епрувети и тоа во точно определени временски интервали, со што се предизвикува верижно одвивање на три реакциски чекори (слика 20-16):

1. **денатурација** на двовержните DNA-молекули (раскинување на водородните врски меѓу комплементарните вериги) при зголемување на температурата на околу 95°C;
2. **анилирање** (хибридизација) на олигонуклеотидните прајмери со комплементарните секвенци на двете раздвоени матични DNA вериги при оптимална температура, и
3. **полимеризација** (синтеза, екстензија) на 3'-крајот на секој од анилираните олигонуклеотидни прајмери со термостабилна DNA-полимераза (*Taq*) при 70 до 72°C. Овој чекор се означува и како елонгација на прајмерот.



**Слика 20-16:** Принцип на ензимска амплификација на DNA-сегмент со пар олигонуклеотидни прајмери и термостабилна DNA-полимераза (*Taq Pol*). Важно е да се обрне внимание на антипаралелната ориентација на секој од прајмерите при анилирањето со соодветната матична DNA-верига.

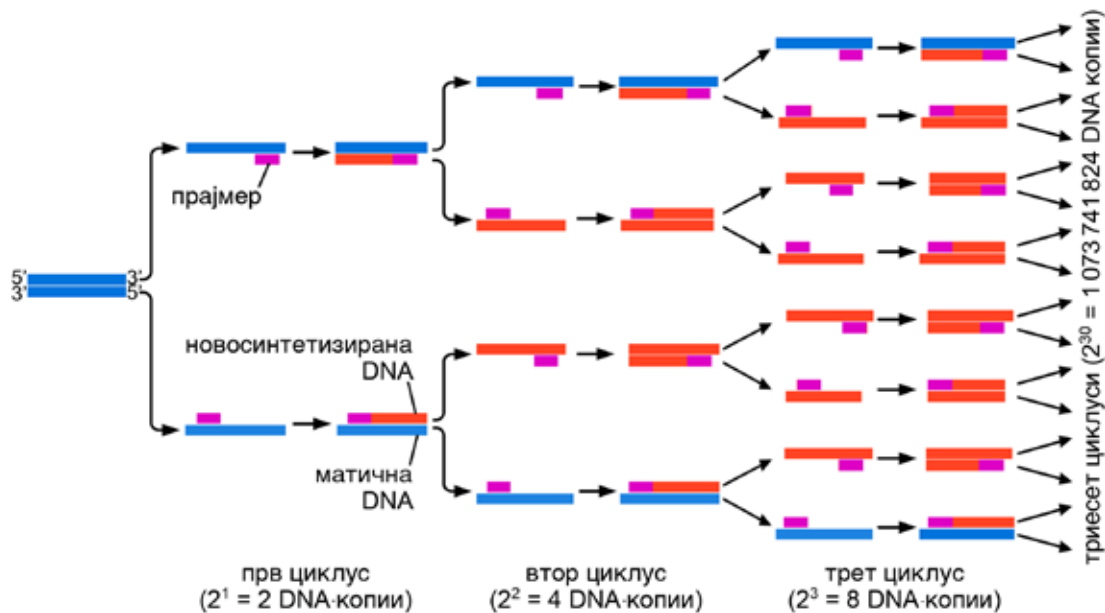
Денатурацијата, анилирањето и полимеризацијата (екстензијата) циклично се повторуваат преку менување на температурата во реакциската епрувета (**слика 20-17**).



**Слика 20-17:** Промена на температурата во текот на полимеразната верижна реакција. Температурните вредности се дадени само како пример.

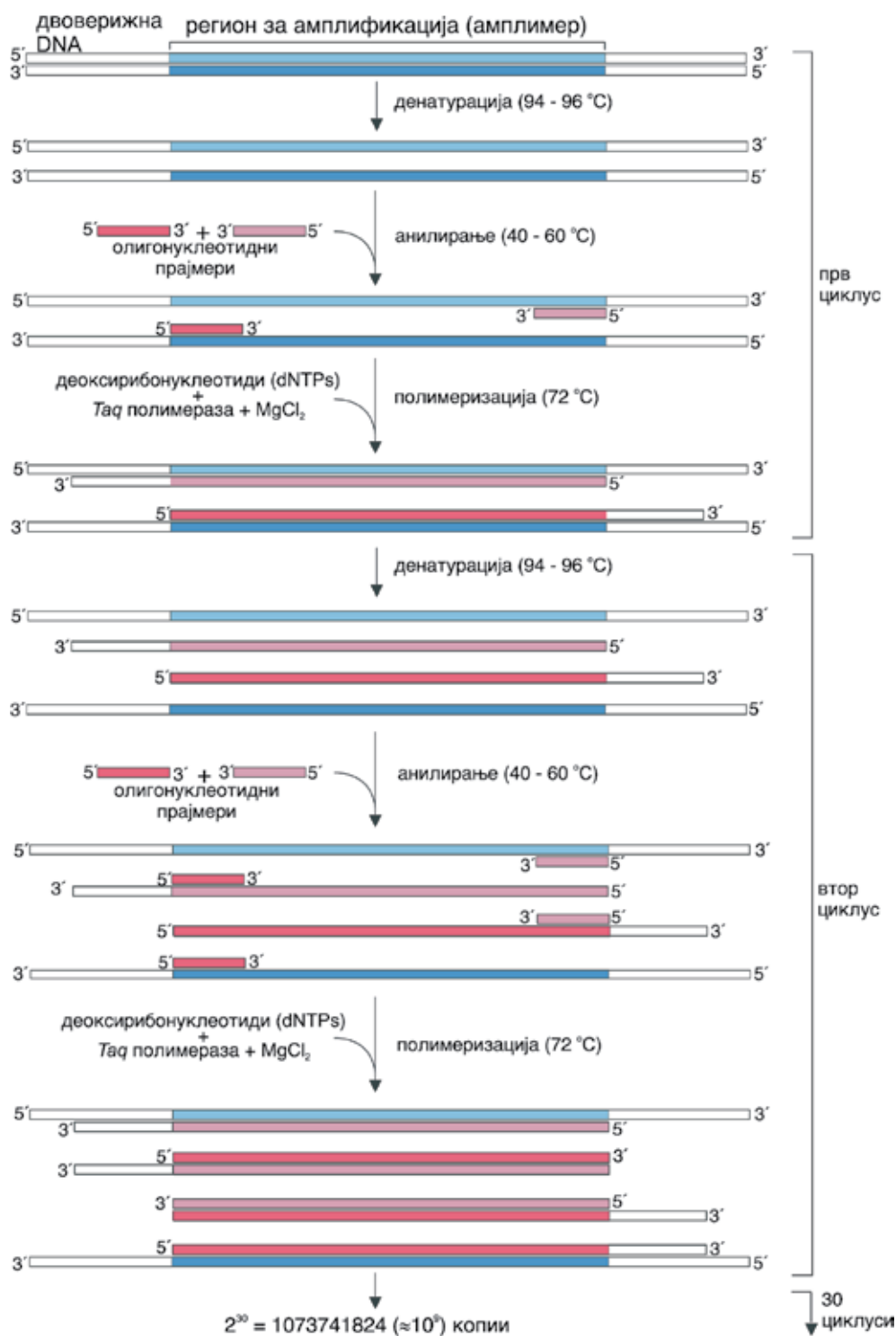
Со секој циклус од по три чекора (денатурација, анилирање и полимеризација), се амплифицира регионот од матичните двоверижни DNA-молекули ограничен со двата прајмера. Со верижно повторување на овие три чекора се врши постепено умножување на првичниот DNA-молекул.

Како што се гледа на **сликата 20-18**, на крајот од првиот циклус има 2 идентични DNA-молекули. По вториот циклус има вкупно 4, по третиот 8 копии, по четвртиот 16 итн.



**Слика 20-18:** Принцип на полимеразната верижна реакција.





**Слика 20-19:** Подетален приказ на процесот на амплификација.

Експоненцијалното акумулирање на амплификациските продукти по триесет циклуси на PCR резултира со теоретски принос од околу  $2^{30}$  ( $10^9$ ) ампликона, односно идентични копии на амплифицираниот регион (**слика 20-19**). Поради повеќе фактори, реалниот принос на PCR-реакцијата е секогаш значително понизок, но, сепак повеќе од доволен за релативно едноставна електрофоретска или хибридациска детекција. Самата PCR-реакција се изведува во специјални апарати означени како PCR-машини (термосајклери). Во основа, тие претставуваат прецизни суви инкубатори со можност за програмирана промена на инкубациската температура во текот на релативно кус временски период. PCR-машините се програмираат со соодветен профил на динамика и температурни вредности на загревање и ладење на термалниот блок. Двоверижните амплификациски продукти (уште наречени **ампликони** или **PCR-продукти**) со еднаква должина на двете комплементарни вериги, дефинирана со парот прајмери, се појавуваат во текот на третиот циклус и се акумулираат експоненцијално во текот на амплификацијата. Бројот на првично синтетизирани продукти кои имаат недефинирани краеве и кои се непосакуван нуспродукт е нормно се надминува со DNA-копиите кои имаат дефинирани краеве (**табела 20-2**).

**Табела 20-2: Умножување на целната DNA-секвенца во текот на PCR амплификацијата**

број на PCR циклуси	вкупен број на DNA копии од целната секвенца	број на целни DNA копии со дефинирани краеве
0	1	0
1	2	0
2	4	0
3	8	2
4	16	8
5	32	22
6	64	52
7	128	114
8	256	240
9	512	494
10	1 024	1004
11	1 024	1004
12	2 048	2 026
13	4 096	4 072
14	16 356	16 384
15	32 768	32 738
16	65 536	65 504
17	131 072	131 038
18	262 144	262 108
19	524 288	524 250
20	1 048 576	1 048 536
21	2 097 152	2 097 110
22	4 194 304	4 194 260
23	8 388 608	8 388 562
24	16 777 216	16 777 168
25	33 554 432	33 554 382
26	67 108 864	67 108 812
27	134 217 728	134 217 674
28	268 435 456	268 435 400
29	536 870 912	536 870 854
30	1 073 741 824	1 073 741 764

Анилирањето е најделикатна фаза за оптимизирање на PCR реакцијата, како во однос на температурата, така и на нејзиното времетраење. Приближната оптимална температура за анилирање ( $T_a$ ) може да се пресмета од едноставната формула за точката на денатурација на прајмерот, намалена за 5 °C:

$$T_a = [4(G + C) + 2(A + T)] - 5$$

каде со G, C, A и T е означен бројот на гуанински, цитозински, аденински и тимински нуклеотиди во олигонуклеотидниот прајмер, соодветно, а пресметаната вредност е изразена во степени Целзиусови.

Многу поточни вредности можат да се предвидат со внесување на секвенците на олигонуклеотидните прајмери во специјализирани програми кои се достапни на интернет за бесплатно користење.

## Натамошни анализи на PCR-амплифицираната DNA

По амплификацијата, натамошното процесирање на PCR-продуктите зависи од типот на испитувањето:

- При детекција на присуство на DNA од определен биолошки ентитет, каква што е идентификација на инфективните агенси во некој биолошки материјал, анализата може да се сведе само на PCR-амплификацијата со специфичен прајмерски пар, по што PCR-продуктите се раздвојуваат со гел електрофореза. Присуството на електрофоретска лента со соодветна големина на гелот (со користење на негативна и позитивна контрола) индицира дека во испитуваниот примерок се наоѓа геномската DNA од очекуваниот организам.
- При детекција на точкести мутации и полиморфизми, PCR-продуктите можат да се анализираат преку дигестија со соодветни рестрикциски ендонуклеази (т.н. PCR-рестрикциска анализа или PCR-RFLP). Притоа, присуството или отсуството на определена секвенца во PCR-продуктот е проследено со подложност или отпорност кон рестрикциската дигестија со определен ензим, па, резултира со појава на дигестирани фрагменти со различна големина при електрофоретската анализа.
- Специфичноста и сензитивноста на амплифицираните PCR-продукти може да се зголеми со техниката Сатерн блотинг и хибридизација со специфична сонда, но, се применува поретко.
- За определени анализи, кога е потребно да се разграничи присуството на мутации или полиморфизми на одделните вериги од амплифицираната DNA, PCR-продуктите можат да се клонираат во соодветни вектори.
- PCR-продуктите можат да се секвенционираат директно, или преку претходно клонирање во соодветен вектор. Со тоа можат точно да се идентифицираат мутациите или полиморфизмите во генските региони од интерес.

## Посебни PCR-техники

**Вгнездена PCR (Nested PCR)** - Оваа техника често се користи за зголемување на специфичноста и сензитивноста на амплификацијата. Се состои од две фази: во првата се врши стандардна амплификација со еден пар на прајмери, а потоа дел од PCR-продуктите се користи во втората фаза, каде што амплификацијата се врши со друг, различен пар прајмери кои опфаќаат помал регион (амплимер) на матичната DNA. PCR-продуктите синтетизирани во втората се покуси отколку оние во првата фаза, но, се амплифицирани со многу повисок принос и при повисока специфичност отколку при обичната PCR-техника.

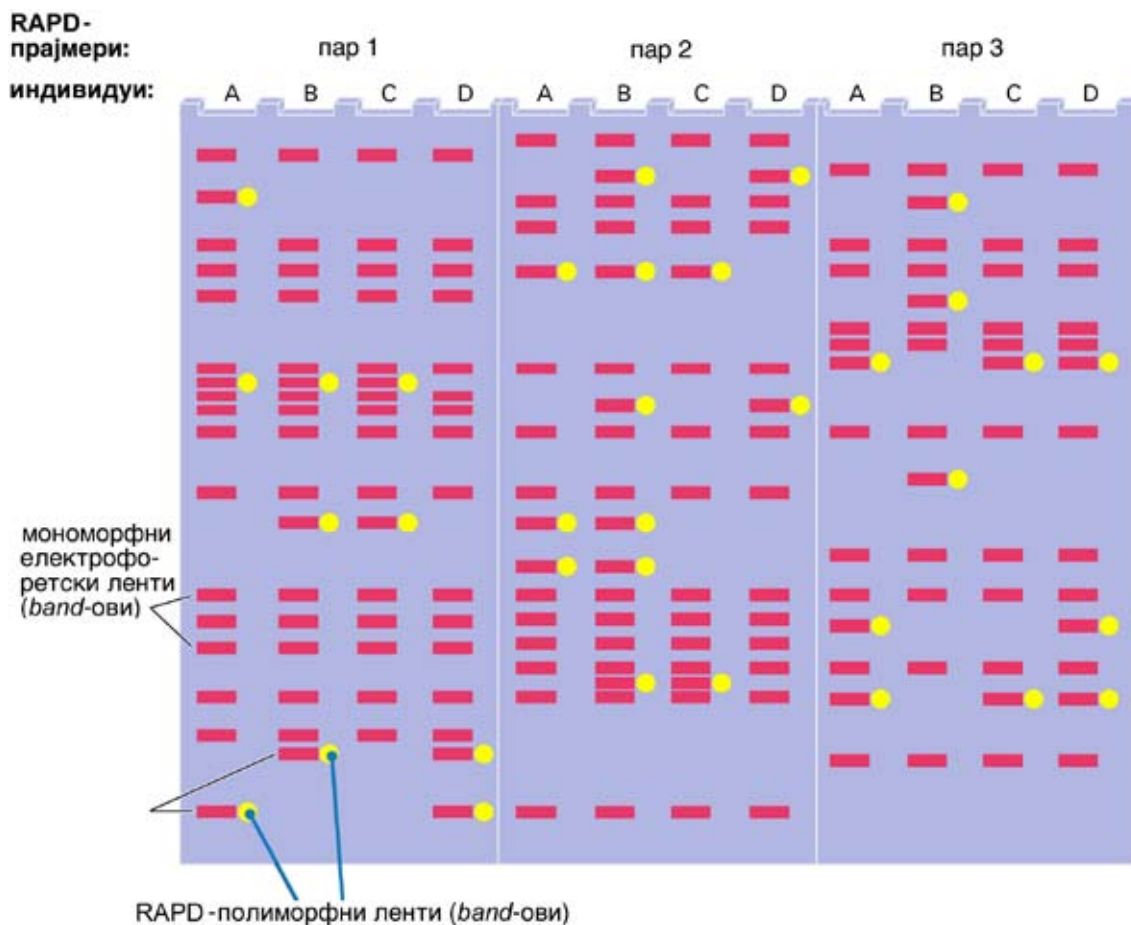
**Алелно-специфична PCR** - Нуклеотидната комплементарност меѓу прајмерот и матичната DNA е неопходна за анилирање на прајмерот и за започнување на синтезата со термостабилната DNA-полимераза. Полимеразата обично ги толерира малите разлики (еден до неколку нуклеотиди) меѓу нуклеотидите на средниот дел или 5'-крајот на прајмерот со тие на матичната DNA, па, амплификацијата е успешна и во тие случаи. Меѓутоа, комплементарноста меѓу 3'-крајот на прајмерот и матичната DNA е критично важна за започнување на DNA-полимеризацијата, а со тоа и за успешноста на амплификацијата. Овој феномен се користи при алелно-специфичната PCR, каде што се дизајнира прајмер чиј 3'-крај е комплементарен со специфична секвенца во матичната DNA. Во такви услови, амплификацијата се одвива само доколку е присутен токму таа секвенца, односно алел. При детекцијата на генски мутации со пар на прајмери специфични за нормалниот алел, присуството на мутација ја оневозможува амплификацијата, па, тогаш оваа техника се означува и како **ARMS (Amplification Refractory Mutation System)**.

**Мултиплекс PCR** - Амплификацијата со повеќе од еден прајмерски пар одеднаш резултира со неколку PCR-продукти и се означува како мултиплекс PCR. Нивната дистинкција при електрофоретската анализа е возможна само доколку се разликуваат по својата должина. Може да се користи за определување на хаплотиповите од локусот HLA (кратенка од англ. *human leucocyte antigen*), за идентификација на индивидуи во судската медицина преку генотипизација на алели од определени полиморфни локуси, за истовремено определување на присуство на повеќе генотипови на микроорганизми во примерок од пациент, како и во многу други цели.

**In situ PCR** - Слично како и *in situ* хибридизацијата, оваа PCR-техника се заснова на DNA-базирана детекција на специфични секвенци во хистолошки пресеци или цитолошки размаски. Амплификацијата се врши со аплицирање на PCR смесата врз самиот пресек и загревање/ладење на препаратот во посебен термосајклер. Тоа резултира со посилен сигнал отколку кај *in situ* хибридизацијата, со што и *in situ* PCR-техниката е многу посензитивна. Главниот проблем кај овој пристап е компромисот меѓу зачувувањето на морфолошките карактеристики од една страна, и пермеабилитетот (овозможувањето на слободен тек на реагенсите) на клетките и ткивниот пресек од друга.

**In vitro мутагенеза со PCR** - Амплификацијата со пар на прајмери во кои намерно е изменет еден или повеќе нуклеотиди на 5' краевите се врши со цел да се добијат огромен број копии кои на тие позиции ќе се разликуваат од оригиналниот матичен DNA-молекул. Со тоа се врши **мутагенеза во *in vitro* услови**. Меѓу целите на оваа техника може да биде испитување на влијанието на промената (мутацијата)

во DNA-секвенцата врз транскрипцијата на некој ген или особините на експримира- ниот протеински продукт. Во биотехнологијата, мутагенезата се користи за да се по- добрат карактеристиките на некој протеин (обично ензим) важен за производство. **PCR со случајно амплифицирана полиморфна DNA (RAPD) или со арбитарни прај- мери (AP-PCR)** - Со користење на куси прајмери (околу 10 нуклеотиди) кои случајно анилираат на поголем број места во геномската DNA, можат истовремено да се ам- плифицираат поголем број региони од геномот на некој организам. Притоа се добива серија на амплифицирани DNA фрагменти (поточно: ампликони) кои имаат различна должина. Бројот и должината на електрофоретските ленти, кои ги рефлектираат полиморфизмите на DNA-секвенцата, претставуваат своевиден „отпечаток“ (англ. *fingerprint*) на испитуваната индивидуа, на сојот или популацијата (**слика 20-20**).



**Слика 20-20:** Принцип на интерпретирање на анализата RAPD-PCR при која е вршена амплификација со три пара прајмери на DNA-примероци од четири различни индивидуи (означени со A, B, C и D).

Покрај т.н. мономорфни електрофоретски ленти кои се наоѓаат на исти позиции (имаат еднаква должина) кај сите испитувани индивидуи, на гелот се видливи и полиморфните ленти RAPD чиј електрофоретски профил (распоред и ком-

бинации на гелот) се карактеристични за секој од испитуваните примероци. Од тие причини оваа техника се користи при генското мапирање, во популационата генетика и слично. Недостаток е што, поради мали технички варијации, резултатите се често нерепродуцибилни меѓу различни лаборатории.

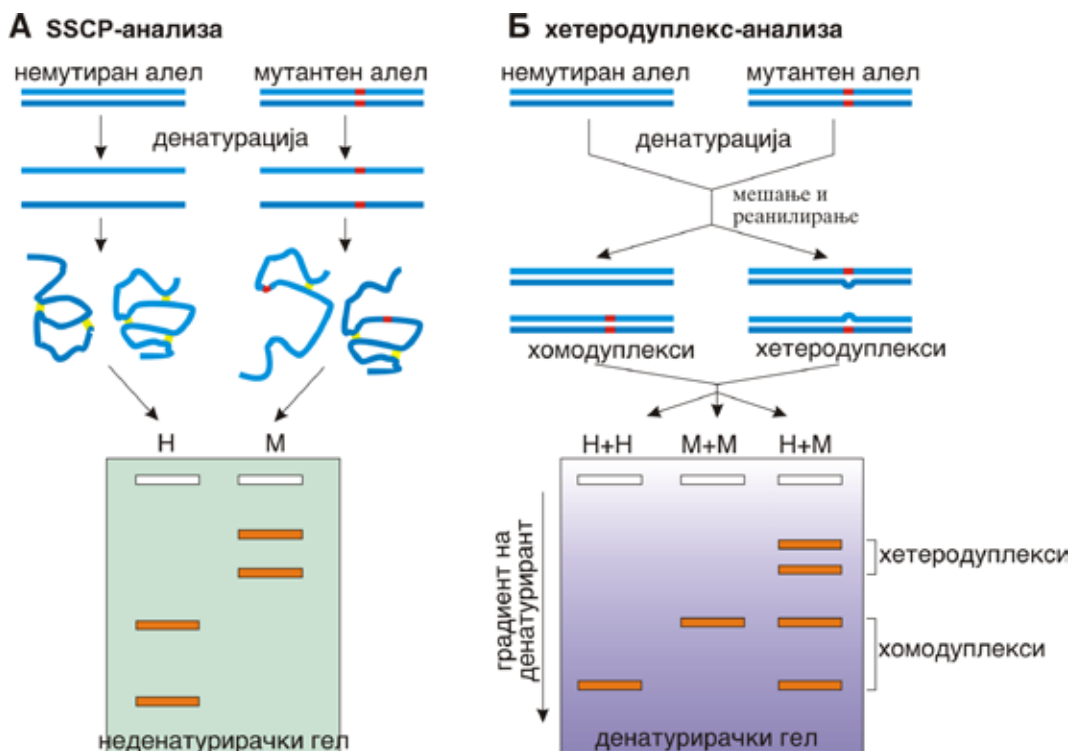
**Полиморфизам на должината на амплифицираните фрагменти (AFLP)** - Оваа техника има определена сличност со претходната, поради тоа што се добиваат случајно амплифицирани различно долги ампликони. Разликата е во тоа што кај техниката AFLP, најпрво се врши рестрикциска дигестија на геномската DNA со две ендонуклеази при што се добиваат голем број на DNA-фрагменти со по два различни краја. Должината на фрагментите варира според полиморфизмите во DNA-молекулите. На двата краја од секој DNA-фрагмент ензимски се лигираат соодветни **адаптери**. Тоа се куси двоверижни асиметрични DNA-молекули со едновержни краеве кои стрчат и кои се компатибилни со едниот крај од DNA-фрагментот добиен со дигестија на геномската DNA. При PCR се користат прајмери што анилираат со секвенцата на адаптерите, па, должината на амплификациските продукти зависи од DNA-полиморфизмот. Оваа техника се користи со слични цели како и AP-PCR (RAPD), но, дава нешто подобри резултати.

**Инверзна PCR** - Со оваа техника се амплифицираат регионите кои се бочно (кон 5'- и кон 3'-краевите) од некоја локација во DNA со позната секвенца. Геномската DNA се дигестира со определена рестрикциска ендонуклеаза за да се добијат фрагменти со релативно униформна должина (обично од 3 до 5 kb). Фрагментите се циркуларизираат со DNA-лигаза и се амплифицира регионот чија секвенца е позната со користење на соодветен пар на прајмери, но, во обратна насока. Имено, наместо синтезата да тече со екстензија на прајмерите еден кон друг, се одвива кон спротивните страни амплифицирајќи ги бочните региони со непозната секвенца. По амплификацијата, PCR-продуктите се дигестираат со истата првично користена ендонуклеаза за да се демаркира границата меѓу двата бочни краја со непозната секвенца. Инверзната PCR-сликовито се споредува со ползење по хромозомите со прајмери (англ. *primer walking* или *primer crawling*).

**PCR амплификација во реално време (Real Time PCR), квантитативна PCR (qPCR) или кинетичка PCR** - Кај оваа техника, акумулирањето на PCR продуктите, а со тоа и текот на амплификацијата на матичната DNA се следи во реално време. Еден од начините за тоа е во реакциската смеса да се додаде флуоресцентната боја Sybr<sup>®</sup> I зелено, која флуоресцира само кога е интеркалирана со двовержните DNA-молекули, па, флуоресценцијата е право пропорционална со бројот на PCR-продуктите кои се создаваат во текот на амплификацијата. PCR-машината мора да има посебен дел кој овозможува реакциските епрувети од горниот дел да се осветлуваат со светлина со определена бранова должина, а исто така и серија на мошне чувствителни фотодетектори за флуоресценција. Многу поспецифичен, но, и поскап начин е користењето на двојно обележан, кус олигонуклеотид кој е комплементарен со дел од амплимерот, означен како **TaqMan<sup>®</sup> сонда**. На 5'-крајот од оваа сонда е врзана флуоресцентен молекул (флуорохром), додека на спротивниот, 3'-крај е врзан т.н. молекул-„избледувач“ која има способност да ја потиснува флуоресценцијата кога е во непосредна близина на флуорохромот. Од тие причини не флуоресцира самата сонда, било слободна во растворот или анилирана со комплементарниот DNA-регион. Амплификацијата се врши со специфична *Taq* полимераза која поседува 5'→3'

егзонуклеазна активност. При ензимската екстензија на прајмерот во текот на амплификацијата, оваа полимераза ја одвојува и деградира *TaqMan*<sup>®</sup> сондата, со што се флуорохромот се раздвојува од молекулот-„избледувач“ со што флуоресценцијата се зголемува пропорционално со акумулираните специфични PCR продукти. Поради брзината и прецизноста, оваа техника е извонредно корисна во молекуларната дијагностика, каде што се потребни брзи и confidentни резултати и покрај релативно високата цена на *TaqMan*<sup>®</sup> сондите.

**Конформациски полиморфизам на единечните вериги (Single-Strand Conformation Polymorphism - SSCP)** - оваа техника се базира на фактот што по температурна денатурација, едноверижната DNA може да создава разни секундарни и терциерни структури поради воспоставување на интрамолекуларни водородни врски меѓу комплементарните бази во самиот молекул. Различните конформациски структури имаат различна подвижност при нативна гел електрофореза, во зависност од нуклеотидната секвенца на секој едноверижан DNA молекул, па, при мутација или полиморфизам во само еден нуклеотид, се формираат различни конформациски варијанти. При SSCP анализата, PCR продуктите се денатурираат и аплицираат на неденатуирачки (нативен) полиакрамиден гел. Разликите во електрофоретската подвижност (мобилност) меѓу ампликонот кој е дел од нормалната и од мутантната алела се должат на разлики во секвенцата (слика 20-21, А). Предност на оваа техника е нејзината ед-



**Слика 20-21:** Шематски приказ на принципите на детекцијата на мутации во амплифицирани PCR-продукти со електрофоретски техники. **А:** конформациски полиморфизам на единечните вериги (*Single-Strand Conformation Polymorphism - SSCP*). **Б:** хетеродуплексна анализа или гел електрофорезата со денатуирачки градиент.



ноставност и економичност, како и можноста за скрининг на поголем број примероци истовремено, како и релативно добрата сензитивност во детекцијата на мутации (околу 70 до 90%). Недостаток е што можат да се анализираат само PCR продукти со големина до околу 300 bp, како и слабата репродуцибилност на анализата, која зависи од температурата на електрофорезата и повеќе други фактори.

**Хетеродуплексна анализа или гел електрофорезата со денатурирачки градиент** (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis - DGGE*). При електрофореза во гел во со градиент (растечка концентрација) на хемиски денатурант (уреа или формаид), двоверижната DNA постепено денатурира во зависност од бројот на водородни врски и дожината на DNA молекулот. Врз динамиката на денатурирација влијае бројот на GC парови, како и нивниот распоред (непосредна близина). Кај DDGE техниката, амплифицираните PCR продукти се денатурираат со загревање и се оставаат спонтано да ренатурираат. При постоење на ампликони (нормална и мутантна алела) кои се разликуваат по само една позиција, со анилирањето се формираат три популации на молекули: целосно комплементарни, т.н. хомодуплекси од две немутирани комплементарни DNA вериги, хомодуплекси на две мутантни вериги, и т.н. хетеродуплекси, составени од по една немутирана и мутантна DNA верига. Електрофорезата се врши при повисока температура во полиакриламиден гел со линеарен градиент на хемиски денатурант (кон анодата). Секоја од наведените три популации на двоверижни DNA молекули има различна точка на денатурација ( $T_m$ ), па, со тоа денатурира на различна положба во гелот. Сензитивноста во однос на детекцијата на мутации и полиморфизми е повисока кај DGGE (над 90%) во однос на SSCP анализата, но, ограничување се многу поголемите технички проблеми (**слика 20-21, Б**).

## 20.6 Секвенционирање на DNA

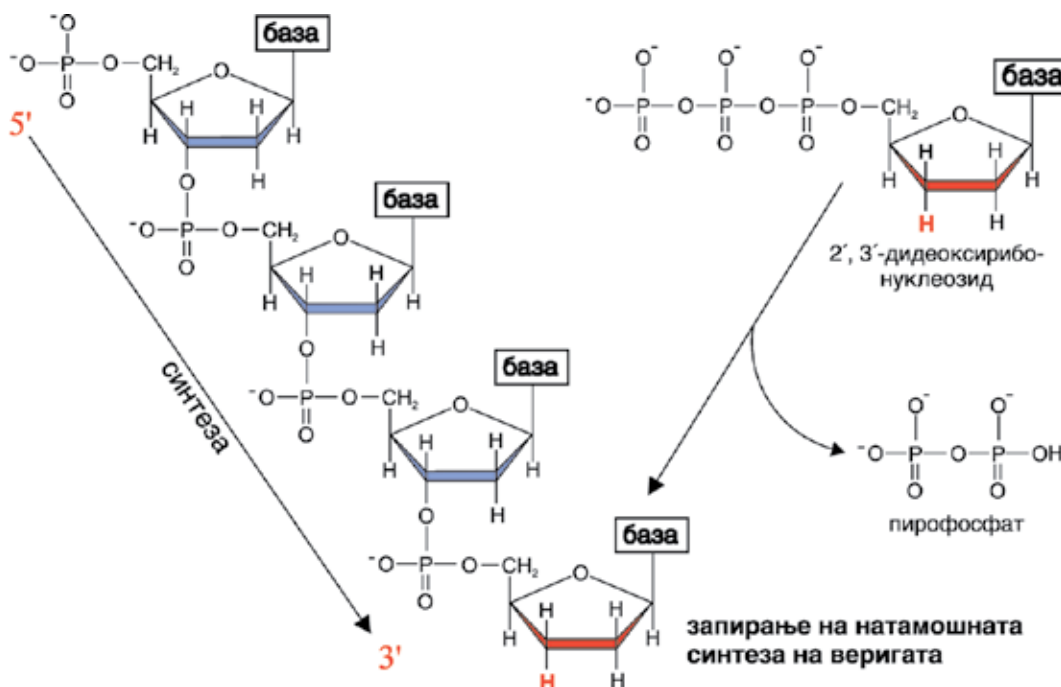
Определувањето на редоследот на базите (нуклеотидната секвенца) по должина на линеарниот или на циркуларниот DNA-молекул може да се смета за крајно карактеризирање на генската структура и неопходен чекор во проучувањето на структурата и функцијата на гените во биолошките ентитети. Секвенционирањето на релативно куси генски региони често се користи за детекција на мутации и полиморфизми, односно промени во редоследот на нуклеотидите во DNA-молекулите. Во такви цели, нуклеотидната секвенца која се добива како резултат на испитувањето, се споредува со секвенцата од нормалниот, немутиран алел од истиот вид. Покрај детекцијата на мутациите и полиморфизмите, DNA-секвенционирањето може да помогне во откривањето на нови видови и подвидови организми, како и нови соеви на микроорганизми во таксономијата.

DNA-секвенционирањето е воведено во средината на седумдесеттите години од минатиот век кога независно се објавени две различни методи. Методот според авторите Максам и Гилберт (Allan Maxam и Walter Gilbert) се заснова врз специфична хемиска деградација на DNA-молекулите кај определени бази. Од повеќе причини, а особено поради токсичноста на реагенсите кои се применуваат кај Максам-Гилбертовиот метод, во последниве десетина години најчесто се применува Сангеровиот метод за определување на редоследот на базите во DNA-молекулите. Неопходен предуслов и кај двете методи е формирање на популација на идентични DNA-молекули

кои се секвенционираат, за што најчесто се применуваат методите на молекуларно-конирање и на PCR амплификацијата.

### Метод на терминирање на синтезата на веригата според Сангер

Сангеровиот метод за секвенционирање се базира врз *in vitro* синтеза на единична DNA-верига и нејзино терминирање со дидеоксирибонуклеотидни аналози на нормалните деоксирибонуклеотиди. Овој метод првпат го опишал Сангер (Frederick Sanger) во 1976 година, а оттогаш има претрпено извесни подобрувања, пред сè во однос на должината на секвенцата која може да се прочита од поединечен гел. Особено важни се нерадиоактивните техники за детекција на електрофоретските ленти при DNA-секвенционирањето.



**Слика 20-22:** Прекин на натамошната DNA-синтеза при инкорпорирање на дидеоксиформа на нуклеотид.

Како што е шематски прикажано на **слика 20-22**, трифосфатните форми на дидеоксирибозните аналози (се означуваат со **ddNTPs**) се разликуваат од нормалните деоксирибозни нуклеотиди (dNTPs) по отсуство на 3'-хидроксилна група.

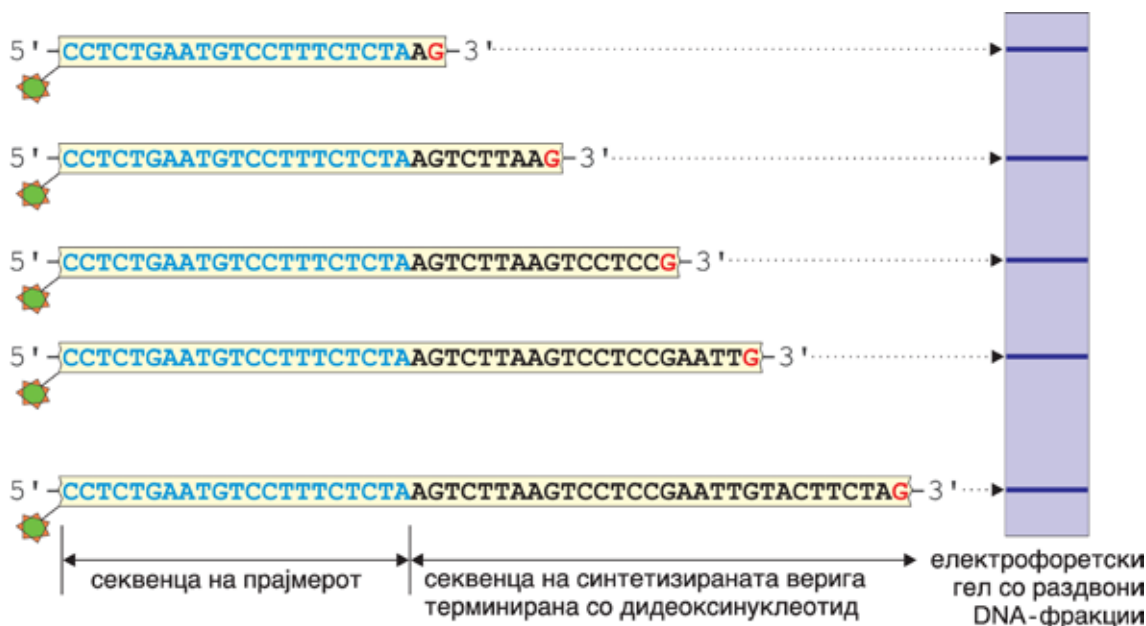
При инкорпорирањето на дидеоксирибонуклеотидот настанува прекин (терминирање) на натамошната синтеза на полинуклеотидната верига поради неможност од воспоставување фосфодиестерска врска со следниот нуклеотид трифосфат.

Секвенционирањето се врши истовремено во четири реакциски епрувети. Во **секоја од нив** се додаваат:

- испитуваната DNA (амплифицирана или клонирана DNA);
- смеса на четирите деоксирибонуклеотиди (dATP, dTTP, dCTP и dGTP);
- DNA-полимераза;

- **единечен олигонуклеотиден прајмер** (за разлика од PCR), кој може да е обележан со флуоресцентен или со друг маркер или со радиоизотоп;
- **по еден дидеоксирибонуклеотид** и тоа во првата од четирите епрувети се додава **ddGTP**, во втората **ddATP**, во третата **ddTTP** и во четвртата епрувета **ddCTP**. Моларните концентрации на дидеоксирибонуклеотидите кои се додаваат се околу 100 пати пониски во однос на присутните деоксирибонуклеотиди, за да се осигури можност за целосно комплетирање на синтеза на веригата.

При инкубација на епруветите на соодветна температура, во секоја од четирите епрувети се одвива ензимска синтеза со DNA-полимеразата при која се врши екстензија на олигонуклеотидниот прајмер во 5'→3' насока. При случајно инкорпорирање на дидеоксирибонуклеотиден аналог во веригата чија синтеза е во тек, запира натамошното додавање на нови нуклеотиди во таа верига. Со оглед на тоа што дидеоксирибонуклеотидите се присутни во многу пониска моларна концентрација, DNA-полимеразата може да синтетизира и целосни вериги. Во секоја од епруветите се акумулира серија на едновржни DNA-фрагменти со запрена синтеза на различни места, но, само при инкорпорирање на соодветниот дидеоксирибонуклеотид присутен во таа епрувета.

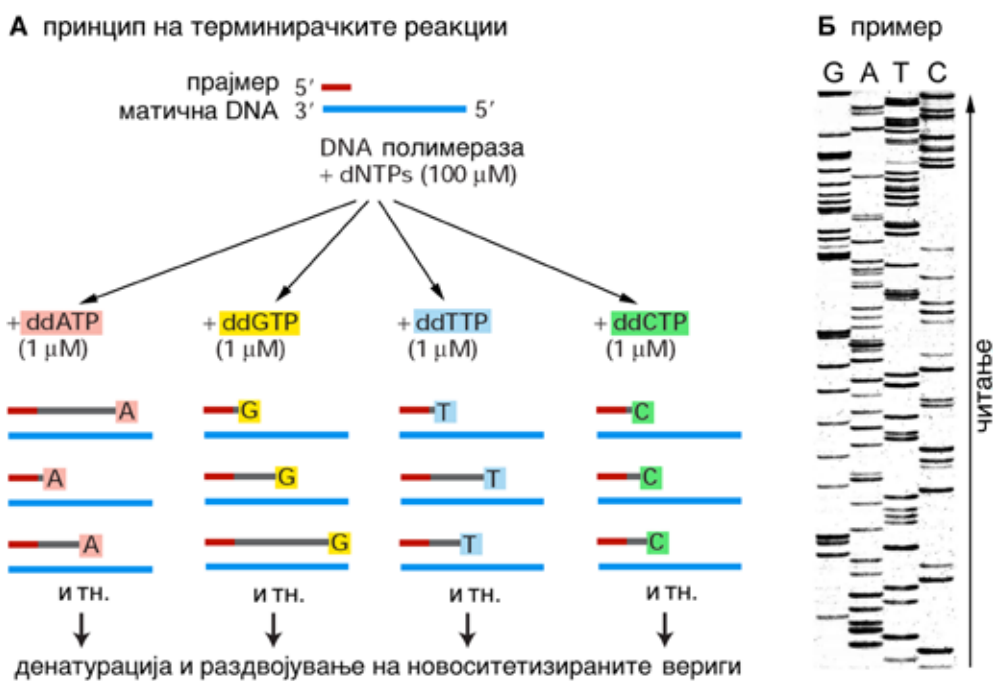


**Слика 20-23:** Електрофоретско раздвојување на терминирани едновржни DNA-фрагменти според нивната должина. Заради прегледност, прикажани се само фрагментите терминирани со ddGTP.

На **сликата 20-23** шематски е претставен процесот на секвенционирање со обележан прајмер и терминирање на синтезата со додаден ddGTP, кој се инкорпорира во веригата која се синтетизира. Поради присуството и на нормалната деоксирибонуклеотидна форма на dGTP, вградувањето на ddGTP е случајно, но, со доволно висока статистичка веројатност, за да се осигури прекин на синтезата. Сличен таков

процес се одвива и во другите три реакциски епрувети при терминирање на синтеза со ddATP, ddTTP и ddCTP, соодветно.

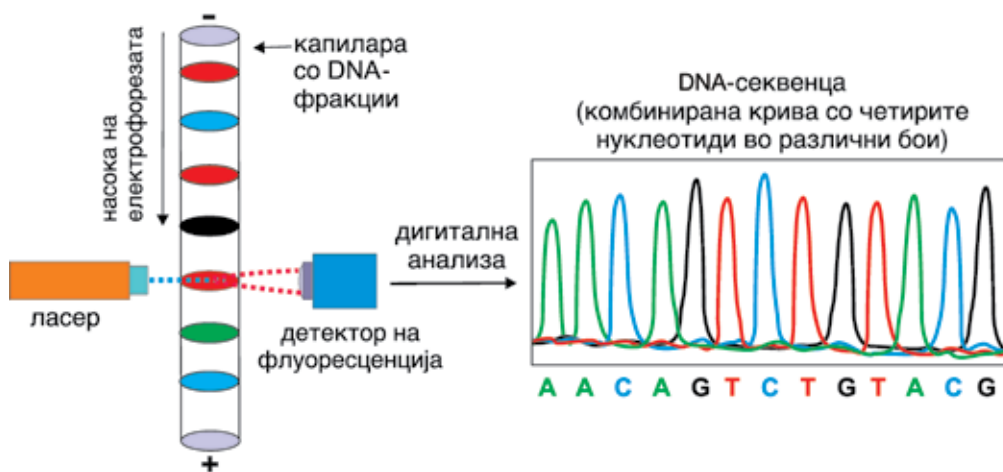
Секоја од веригите чија синтеза е прекината поради инкорпорирање на соодветниот дидеоксирибонуклеотид се разликува меѓусебно по должината. Таа разлика може да изнесува само еден нуклеотид па сè до 700 или повеќе нуклеотиди. Од тие причини, за ефикасно раздвојување на продуктите на DNA-синтезата терминирани со дидеоксирибонуклеотиди, неопходно е користење на електрофореза со висока резолуција каква што е полиакриламидната електрофореза во високоденатурирачки услови. Со оваа техника можат да се раздвојат поединечни едноверижни DNA-молекули кои се разликуваат во должина од по еден нуклеотид. Разликите во должините на едноверижните дидеокситерминирани DNA-молекули и нивната мобилност во електрофоретскиот гел шематски е претставена во **слика 20-24**.



**Слика 20-24:** Принцип на Сангеровата техника на DNA-секвенционирање. **А:** паралелно изведување на четирите дидеокси-терминирачки реакции во четири посебни епрувето со ddATP, ddGTP, ddTTP и ddCTP. **Б:** пример на електроферетограм на кој нуклеотидите се читаат според електрофоретските ленти од долниот кон горниот крај на гелот, односно авторадиограмот (во овој пример: 5'-CTCATAAGATAT.....-3').

Дидеокси-терминираниите DNA-вериги мора да се визуализираат во гелот со екстремно сензитивна техника. За таа цел, долго време се користела техниката на обележување на DNA-фрагментите со радиоизотопи по што електрофоретските ленти се прикажувале преку **авторадиографија**, односно со експонирање и со развивање на рендгенски филм. Воведени се повеќе **нерадиоактивни техники** кои се базираат врз обележување со разни молекули какви што се биотин или дигоксигенин.

Во последните 15 години се користат автоматизирани системи за секвенционирање базирани на капиларна електрофореза и флуоресцентна детекција на обележаните терминирани DNA-продукти. За секој од четирите дидеоксирибонуклеотиди се користи различен флуоресцентен молекул, а продуктите на секвенционирачката реакција се раздвојуваат со капиларна електрофореза. При излезот од капиларата, ласерски сноп ги ексцитира флуоресцентно обележаните DNA-фрагменти, а детекторот на флуоресценција и електрониката ја регистрираат емитираната флуоресцентна светлина. Важно е што одеднаш можат да се следат флуоресцентните сигнали од четирите различно обележани дидеоксирибонуклеотиди (слика 20-25).



**Слика 20-25:** Принцип на автоматизирано DNA-секвенционирање со капиларна електрофореза и флуоресцентна детекција.

По софтверската обработка, редоследот на нуклеотидите се прикажува во вид на флуорограмска крива. Со автоматските флуоресцентни секвенционатори е овозможено читање на поголем број нуклеотиди (околу 500 до 1000 во една реакција), а се зголемува и брзината на процесот, што е особено важно во медицинската дијагностика и за геномските проекти. Геномското секвенционирање може да се врши и со роботизирана опрема со цел да се осигури доволна брзина и ефикасност, неопходни за масовно секвенционирање на енормен број на клонирани фрагменти од геномот на организмот. Огромната маса податоци кои притоа се добиваат, се асемблираат, аотираат и анализираат софтверски со моќни компјутерски системи, за што е неопходно претходно постоење на генетски мапи на геномот што се проучува. На крајот се идентифицираат генските, регулаторните региони, репетитивната DNA и други нејзини класи.

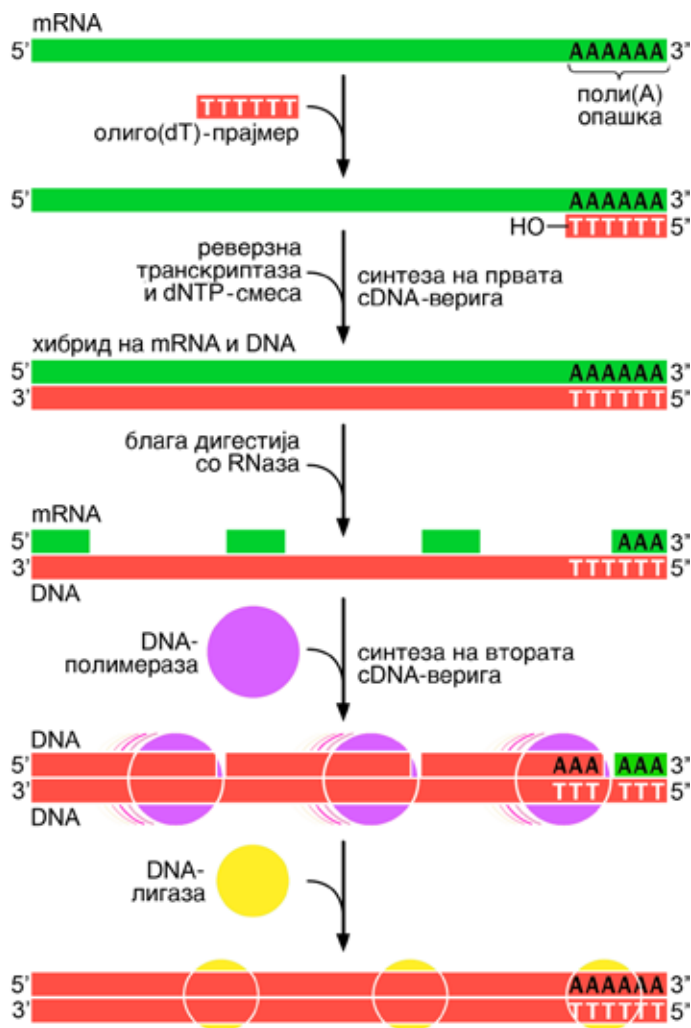
Најновите техники за масовно секвенционирање од следната генерација овозможуваат паралелни анализи со кои можат да се секвенционираат цели геноми на вишите организми во период од неколку дена, па и покусо. Ваквите напредни техники се применуваат во геномските истражувачки центри.

## 20.7 Реверзна транскрипција - синтеза на DNA според mRNA-урнек

Обратна (реверзна) транскрипција на mRNA во комплементарна DNA може да се изврши со посебни ензими кои поседуваат RNA-зависна DNA-полимеразна активност. Овој тип на ензими се означуваат како **реверзни транскриптази** и за првпат се изолирани од ретровирусите, по што и го добиле името. Реверзната транскриптаза ја прекршува Вотсон-Криковата догма за текот на генетските информации (од DNA преку RNA до протеините).

Како и кај сите DNA-полимерази, за започнување на синтезата на првата верига од **комплементарната DNA (cDNA)** со реверзна транскриптаза, неопходно е анилирање на кус комплементарен иницирачки олигонуклеотид (прајмер) со матичната mRNA (слика 20-26).

За RT-PCR можат да се користат различни типови реверзна транскриптаза, изолирани од ретровируси какви што



**Слика 20-26:** Принцип на синтеза на комплементарна DNA од mRNA-урнек.

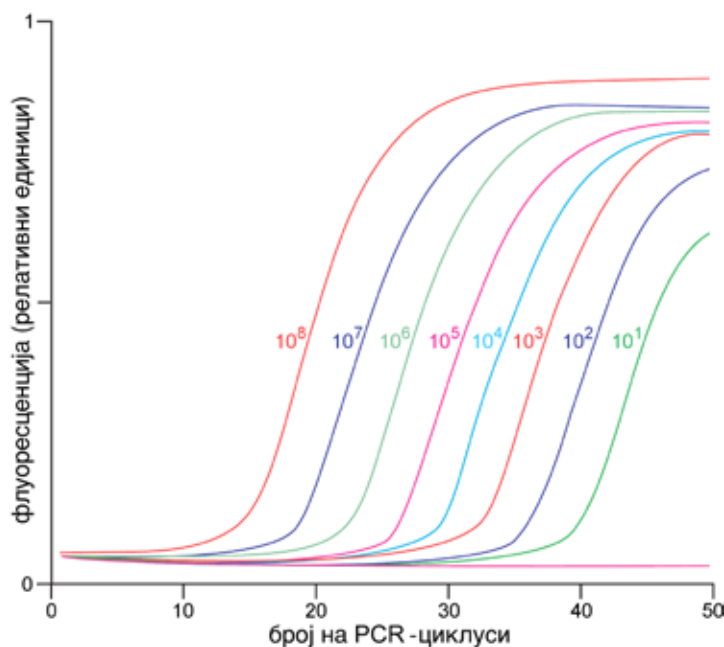
се вирусот на птичја миелобластоza - AMV (*Avian Myeloblastosis Virus*) или Moloney-вирусот на глувчечка леукемија - MMLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*), како и од други организми. Речиси сите комерцијално достапни реверзни транскриптази се произведуваат со техниките на генетски инженеринг. Втората верига се синтетизира по урнек на првосинтетизираната cDNA-верига. Во прикажаниот пример се користи олиготимидински прајмер кој анилира со поли-аденозинскиот „опаш“ на mRNA-молекулот. По синтезата на првата cDNA-верига, матичната mRNA се разградува ензимски со RN-аза H. За синтеза на комплементарната (втора cDNA верига) се користи прајмер (специфичен за секвенцата) кој анилира на 3' крајот од првата cDNA-верига. Синтезата се врши со T4 DNA-полимераза со што се создава двоверижен cDNA-молекул.



## Реверзно-транскриптазна PCR (RT-PCR)

Евалуацијата на генската експресија може да се врши преку квалитативна и квантитативна анализа на соодветната гласничка RNA (mRNA). За таа цел се користат *Northern* блотинг, тестот со RN-азна заштита, а во поново време и со микро-матриците (микрочипови). Најчувствителен и најчесто користен метод е реверзно-транскриптазната полимеразна верижна реакција (RT-PCR). Во оваа метода се одвиваат две последователни фази со две различни ензимски реакции: во првата фаза се врши обратна транскрипција на mRNA во комплементарна DNA (cDNA). Во втората фаза се врши PCR-амплификација на добиената cDNA. Покрај квантификарањето на генската експресија, RT-PCR се користи и за дијагностичка детекција на RNA-вируси во биолошки материјали, каква што е идентификацијата на HIV во плазма на инфицирани или на заболени индивидуи. Методот RT-PCR може да се употребува и за клонирање на cDNA без претходно конструирање и скринирање на cDNA-библиотека.

Посебна изведба на реверзно-транскриптазната PCR која особено често се применува во последниве години е користење на флуоресцентна детекција на ампликоните и регистрација во реално време. Оваа техника се нарекува **реверзно-транскриптазна PCR во реално време**, и за неа исто така се користи кратенката: **RT-PCR** (од англ. *real-time PCR*), што може да доведе до забуна. Во секој случај, при оптимални услови добиени по низа прелиминарни експерименти, оваа техника обезбедува висока прецизност, но, најважна предност е можноста за пресметување на квантитативните вредности, па, техниката често се нарекува **квантитативна**, или, поретко, **кинетичка RT-PCR (qRT-PCR или kRT-PCR)**. Акумулирањето на ампликоните е проследено со истовремено интензивирање на флуоресцентниот сигнал. Постои корелација меѓу почетниот број на RNA-молекули и брзината на достигнување на експоненцијалната фаза од амплификацијата



фаза од амплификацијата (број на PCR-циклуси), што софтверот за анализа на податоците во реално време го користи за пресметување на бројот на целни молекули во примерокот (слика 20-27).

**Слика 20-27:** Принцип на квантитативната реверзно-транскриптазна PCR во реално време (qRT-PCR). Брзината на постигнување на експоненцијалната фаза од амплификација (регистрирана преку флуоресцентниот сигнал) зависи од бројот на почетни RNA-молекули во примерокот (прикажан е степенуван број на молекули).

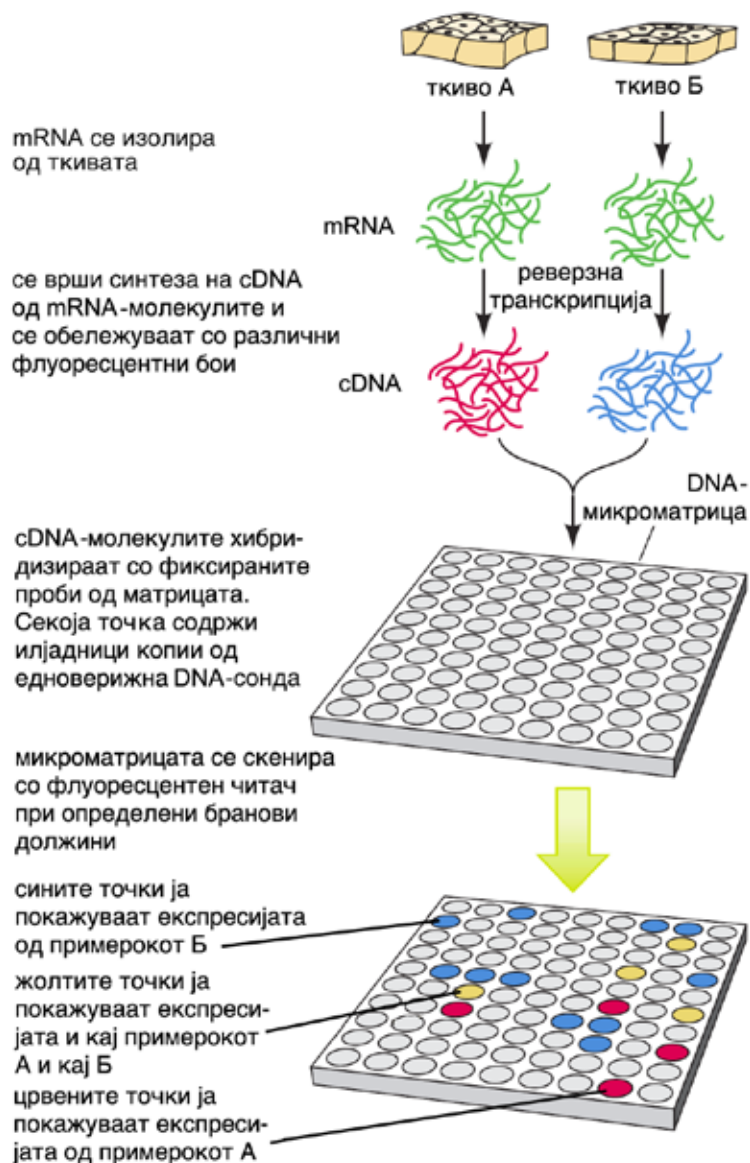


## 20.8 DNA-матрици и микрочипови

Технологијата на **DNA-матрици** донекаде е слична на хибридациската дот-блот техника, но, со поголема минијатуризација и автоматизираност при анализирањето. На најлонска мембрана се нанесени DNA-сонди во вид на голем број ситни точки (над 300  $\mu\text{m}$ ) со различни сонди распоредени во редови и колони. Со тоа, аранжманот на нанесените точки е во вид на матрица со точно определена позиција. Нанесувањето се врши роботизирано, а достапни се и комерцијални мембрани со DNA-микроматрици. По правило се користи реверзна хибридација, односно на мембраната се врзани DNA-сондите, а испитуваниот примерок се обележува со флуоресцентни молекули. Мерењето се врши со флуоресцентни скенери за гелови и мембрани.

**DNA-микрочиповите** се произведуваат со покомплицирана фотолитографска технологија на силикатно стакло (пионерски искористена за таа цел од фирмата Affimetrix). DNA-сондите се во вид на микроскопски точки (помали од 200  $\mu\text{m}$ ), а интензитетите на флуоресценција се определуваат во посебни апарати со екстремно чувствителни детектори и податоците се обработуваат компјутерски.

Клеточната mRNA се инкубира со реверзна транскриптаза (RT) за да се добие комплементарна DNA (cDNA), која потоа се амплифицира со PCR.



**Слика 20-28:** DNA-микроматрица (или DNA чип). Илјадници DNA-сонди за познати секвенци можат да се синтетизираат и да се фиксираат врз стаклена површина. Таквата матрица служи за реверзна хибридација и анализа на експресијата на гените.

Оваа техника е наречена RT-PCR и обезбедува голем број идентични копии доволни да се добие сигнал. Амплифицираната cDNA се врзува за флуоресцентна боја и се аплицира на матрицата за хибридизација. Различни DNA-примероци можат да се обележат и со разни флуоресцентни молекули кои емитураат светлина со различна боја, со што се олеснува нивната споредба. DNA-микрочиповите најчесто се користат за определување на нивото на генска експресија од различни ткива или клетки (т.н. експресиски профил). Компјутерската анализа генерира карактеристична слика на која се гледа распоредот на врзаните сонди и интензитетите на флуоресценција што зависи од бројот на mRNA молекули во примерокот (**слика 20-28**).

Со овој метод може да се споредува генската експресија меѓу различни примероци од пациенти или од различни ткива или популации на клетки. Бидејќи бројот на гените кои можат да се постават на материцата се доближува до оној кај најголемите геноми, се очекува дека техниките со DNA-матрици набргу ќе предизвикаат информатичка експлозија на податоци за транскрипцијата во клетките при различни физиолошки и патолошки состојби.

Друга употреба на DNA-матриците е во откривањето на генските мутации: на пример, за да се определи дали определен ген долг повеќе илјади базни парови содржи мутација кај определен индивид. Потешкиот и поскапиот начин за тоа е да се секвенционира целиот ген. Со DNA-матриците може да се користат различни олигонуклеотидни сонди, вклучувајќи го и целиот ген и сите (или речиси сите) негови познати точкести мутации и делеции, а потоа со хибридизација со DNA од индивидуата, може да открие присуството или отсуството на овие мутации. Оваа технологија може да биде значаен чекор во индивидуалната дијагноза и терапија на различни заболувања кои имаат генетска компонента.

## 20.9 Скринирање со два хибрида

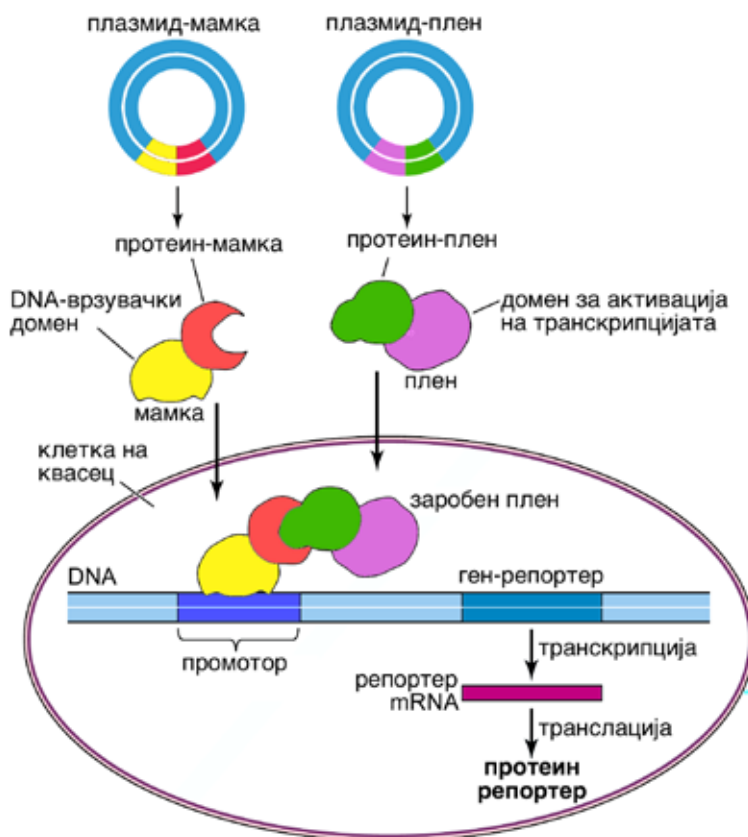
Техниката на дихибридно скринирање во литературата се сретнува и со алтернативни имиња: квасен систем на два хибрида и тест со два хибрида (англ. *yeast two-hybrid system* и *two-hybrid assay*). Во молекуларната биологија се користи за проучување на физичките интеракции меѓу две протеински молекули, како и меѓу протеински и DNA-молекул. Притоа, можат да се идентифицираат ефектите од мутациите во протеин-кодирачките гени или во регионот од DNA-молекулот со кои се менуваат овие интеракции.

Клучно значење за принципот на овој тест има фактот што еукариотските транскрипциски фактори се состојат од DNA-врзувачки домен (кој се врзува со промоторот) и од домен кој директно ја активира транскрипцијата на целиот ген. За да се испитаат ефектите од меѓусебните интеракции на две протеински молекули, на пример, нивните гени независно се клонираат во два различни плаزمиди. Генот за едниот протеин (наречен и протеин-мамка) се клонира во генетски инжинериран плазмид кој ја содржи секвенцата на DNA-врзувачкиот домен од транскрипцискиот фактор неопходен за активација на транскрипцијата на генот-репортер. Наспроти тоа, генот за другиот протеин (означен како протеин-плен) се клонира во друг плазмид кој ја содржи DNA-секвенцата за транскрипциска активација од истиот транскрипциски фактор. Покрај тоа, се користат генетски-модифицирани соеви на *S. cerevisiae*.

*siae* кои не можат да синтетизираат определена аминокиселина, витамин или друг нутритивен фактор, освен при активација на репортерниот ген. По трансфекцијата и експресијата на двата конструирани плазмиди во подобниот сој на квасецот се синтетизираат двата фузиони протеини: протеинот-мамка фузиониран со DNA-врзувачкиот домен од транскрипцискиот фактор и протеинот-плен фузиониран со доменот за транскрипциска активација од овој фактор (слика 20-29).

Нивната функционална интеракција предизвикува транскрипциска активација и последователна експресија на репортерниот ген. Експримираниот протеин-репортер служи за идентифицирање на успешната интеракција на двата испитувани протеина, па, квасците можат да растат и на подлога во која недостасува клучната нутритивна состојка за мутантниот сој.

Овој тест има повеќе е предности какви што се: едноставната изведба со комерцијални сетови без потреба од софистицирана опрема, можноста за истовремена анализа на голем број испитувани молекули, како и способноста за детекција дури и на слабите интеракции меѓу испитуваните молекули. Главниот недостаток на оваа техника е високиот процент на лажно позитивни и лажно негативни интеракции.



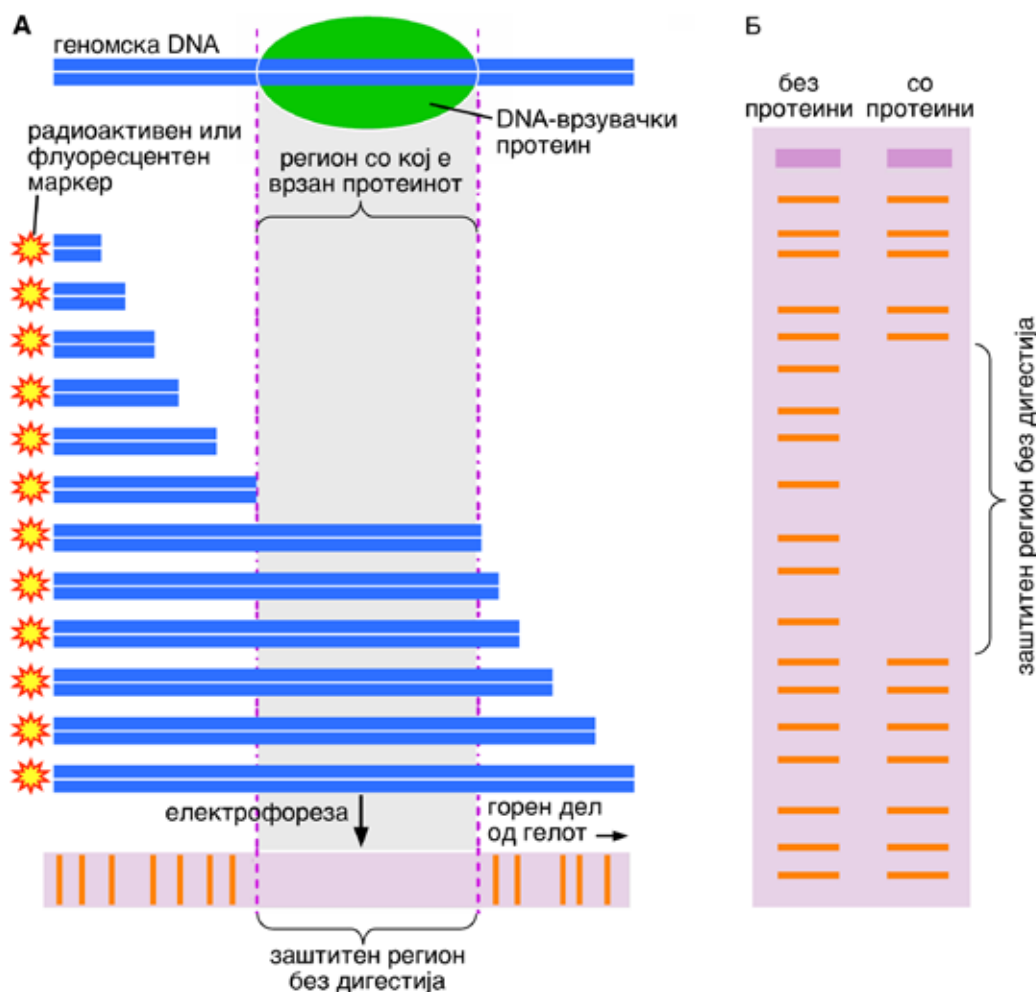
**Слика 20-29:** Шематски приказ на принципот на скринирањето со два хибрида. Експресијата на известувачкиот ген се случува само при поврзување на DNA-врзувачкиот домен од протеинот-мамка со промоторот.

## 20.10 Футпринтинг

Оваа техника се применува за проучување на интеракциите меѓу протеините и DNA-молекулите, а е наречена така (од англ. *footprinting* - отпечатоци од стапала) за да се разликува од DNA-фингерпринтингот ((од англ. *fingerprinting* - отпечатоци од прсти). Се заснова на принципот на заштита од ендонуклеазно разградување на оној регион од испитуваната DNA со кој е врзан соодветен протеин од интерес. Најпрво,

испитуваниот DNA-молекул умножен со клонирање или со PCR-амплификација се обележува со флуоресцентен или со радиоактивен маркер и се инкубира со испитуваниот протеин при оптимални услови (pH, јонска јачина, пуфер со соодветни состојки и слично). Следниот чекор е дигестија со DNAаза I или со друга нуклеаза која нема да може да го пресекува DNA-молекулот каде што е поврзан со протеинот.

По електрофорезата и анализата Сатерн болтинг, се добиваат повеќе фрагменти чиј број и должина (во базни парови) зависат од должината и од нуклеотидната секвенца на испитуваната DNA, како и од позицијата и должината на регионот кој бил заштитен од дигестијата поради врзување на протеинот (слика 20-30). Од експерименталните резултати можат да се извлечат повеќе заклучоци за интеракцијата меѓу испитуваниот DNA-молекул и протеинот, меѓу другото и за нуклеотидната секвенца која ја опфаќа протеинот при врзувањето.



**Слика 20-30:** Принцип на DNA-футпринтинг анализата. **А:** шематски приказ на регионот од испитуваниот DNA-молекул со кој е врзан протеинот и кој е заштитен од дигестија, како и фрагментите кои настануваат со ендонуклеазната активност вон тој регион. **Б:** приказ на идеализираниот изглед на Сатерн блотинг-анализата во отсуство и во присуство на испитуваниот протеин кој доведува до заштита.

## 20.11 Протеински методи

Биохемиските методи за анализа на протеинските молекули се базираат врз структурни испитувања со NMR-спектроскопија, рендгенска кристалографија, микроскопија со атомска сила (AFM), MALDI-TOF и други методи. За разлика од протеинската хемија, во молекуларната биологија протеините главно се идентифицираат квалитативно и квантитативно во контекст на нивната генска експресија. Тие се предмет на методите за *in vitro* експресија, што е од големо значење за добивање чисти протеини во доволно високи концентрации, какви што се потребни за некои анализи или во биотехнолошки цели.

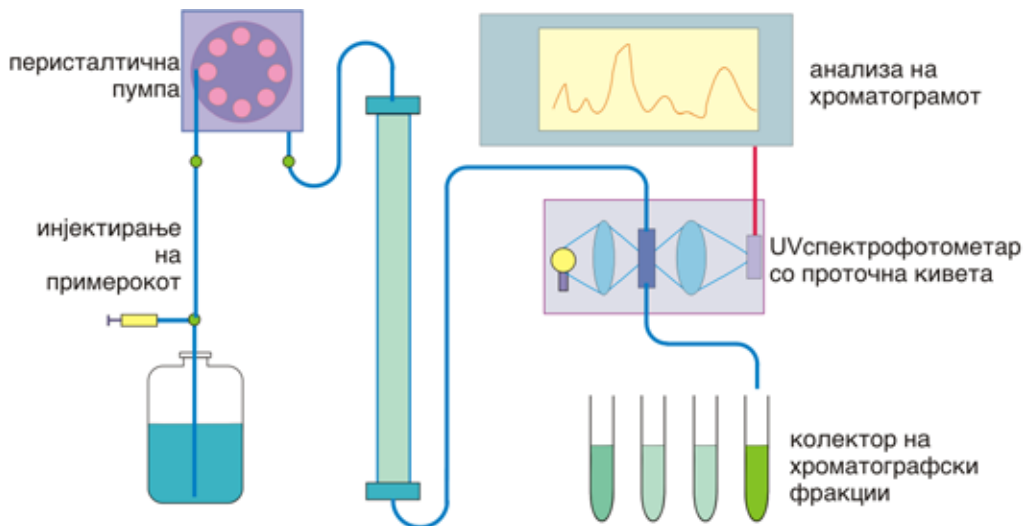
Во аналитички или препаративни цели се користат разни хроматографски методи, исклучиво во колонски формат. Од методите за идентификација на протеините најчесто се применува електрофорезата во денатурирачки услови и со прекинување на евентуално присутните интер- и интрамолекуларни дисулфидни врски. Со тоа се обезбедува електрофоретско раздвојување исклучиво според молекулската маса, елиминирајќи и го непредвидливото влијание на преостанатите фактори. Со дензитометриска анализа на обоените електрофоретски гелови може да се изврши и квантитативна анализа на застапеноста на поединечни протеински фракции во некоја сложена смеса. Во последниве години се користи и капиларна електрофореза. Но, идентификацијата на протеинските молекули не може да се изврши само врз основа на молекулската маса, па, за нивно прецизно определување се користат алатки кои еволуцијата ги создала пред милиони години, а тоа се специфичните антитела. Имунолошката идентификација на протеините кои се претходно електрофоретски раздвоени се означува како имуноблотинг или *Western* блотинг техника.

## 20.12 Принципи на хроматографско пречистување на протеини

Аналитичките и препаративните хроматографските методи наоѓаат широка примена во современата протеомика, биохемија, како и во апликативната биотехнологија. Во молекуларно-биолошките лаборатории главно се користат неколку типа на колонска хроматографија за аналитичко раздвојување и пречистување на протеините. Поради природата на овие макромолекули, високоперформансната (HPLC) и гасната хроматографија не се користат за раздвојување на интактни протеини.

Основниот принцип на колонската хроматографија се однесува на интеракцијата на протеинските молекули со хроматографскиот матрикс, што доведува до нивно задржување (ретенција) во колоната и до последователно „измивање“ (елуција) на раздвоените молекули (слика 20-31).

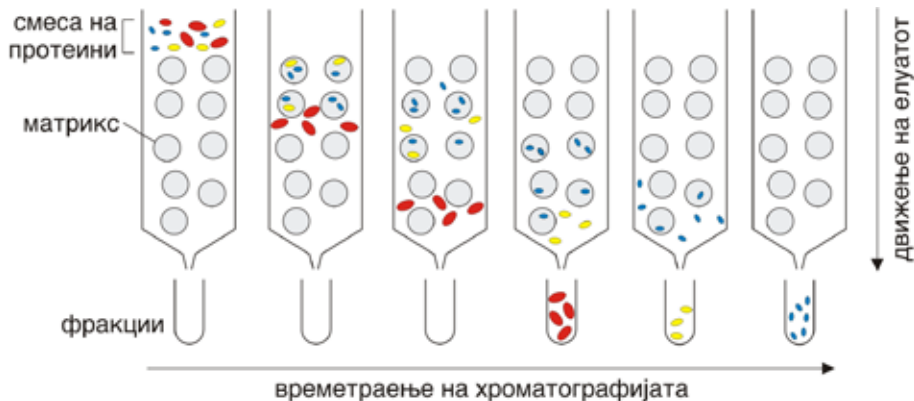
На тој начин протеините можат да се раздвојуваат врз основа на молекулската маса, електростатскиот полнеж, врз хидрофобноста или хидрофилноста, специфичниот афинитет кон определени молекули (рецептори, лиганди и сл.) и други физичко-хемиски својства.



**Слика 20-31:** Принцип на хроматографската анализа на протеините.

## Гел-филтрација

Во основа, зрната на гелот се составени од тридимензионална мрежа од преплетените молекули на полимерот **декстран**, чии пори овозможуваат во нив да навлегуваат и слободно да се движат молекулите кои имаат помал дијаметар од самите пори. Поголемите протеински молекули не можат да навлезат во порите на зрната од гелот, туку ги заобиколуваат, па, низ хроматографската колона се движат најбрзо. Во текот на хроматографијата, во првите елуирани фракции ќе се најдат молекулите со најголема маса, со најголеми димензии, а последни ќе се елуираат протеините со најмала молекуларна маса (**слика 20-32**).



**Слика 20-32:** Принцип на раздвојувањето на протеините со гел-хроматографија.

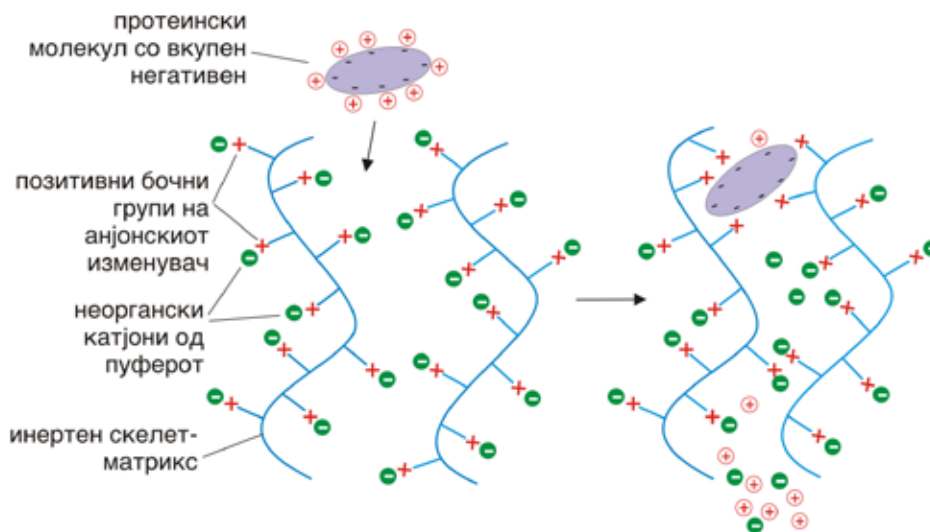


## Јоноизменувачка хроматографија

Принципот на овој метод се темели врз својството на определени супстанции, означени како **јоноизменувачки адсорбенти**, реверзибилно да врзуваат молекули со спротивен електричен полнеж. Јонските изменувачи најчесто се произведуваат во форма на микроскопски зрна и хемиски се изградени од инертен полимерен скелет (најчесто целулоза или декстран), на кој се наоѓаат бочните групи со позитивен или со негативен електростатски полнеж. Хроматографскиот матрикс со позитивно набиени групи се нарекува **анјонски изменувач**, бидејќи има способност за врзување на негативно набиени јони (анјони). Спротивно на тоа, **катјонските изменувачи** имаат бочни групи со негативен полнеж.

При катјонска хроматографија, на пример, протеинскиот анјон се асоцира со позитивните групи на изменувачот, а за сметка на тоа, во растворот се „ослободуваат“ катјоните претходно врзани за протеинот. Оттаму и терминот „јонски изменувач“ - протеинот се заменува на местото на нискомолекуларните анјони (или катјони) кои се елуираат од колоната, додека вкупниот полнеж останува непроменет. Колоната темелно се испира со истиот пуфер, со што се обезбедува отстранување на сите компоненти, освен на оние јони кои се врзале за изменувачот.

На тој начин, од колоната се испираат сите други непотребни компоненти (многу други протеини, на пример, кои не се врзале при тие услови). Со додавање на раствор кој има драстично различна рН-вредност или со различна јонска јачина, протеинот се елуира од колоната и изолираната фракција теоретски содржи хомогена популација на молекули (**слика 20-33**).



**Слика 20-33:** Принцип на јоноизменувачка хроматографија на протеините.



## Афинитетна хроматографија

При оваа хроматографска техника, на инертниот матрикс ковалентно се врзани молекули или остатоци кои имаат биоспецифичен афинитет кон молекулите од интерес во примерокот за изолација. Кај имуноафинитетната хроматографија, на хроматографскиот матрикс ковалентно се врзуваат антитела специфични за определен протеин кој треба да се изолира од комплексна смеса на ткивен хомогенат или пак, се врзува некој лиганд, со цел да се изолира соодветниот рецептор специфичен за тој лиганд. По испирањето на колоната со пуфер, со што се отстрануваат неврзаните компоненти, афинитетно врзаните молекули се елуираат со пуфер чија рН или јонска јачина ја нарушуваат нековалентната врска со која се врзани.

### 20.13 Електрофореза на протеини

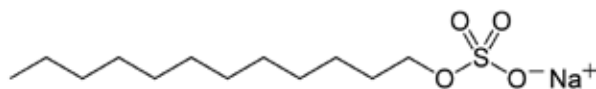
Електрофорезата на протеини во полиакриламиден гел во присуство на натриум додецилсулфат означена како **SDS-PAGE** (од англ. *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*) е најчесто употребувана техника за анализа на протеини во молекуларната биологија и е незаменлива при определувањето на молекулската маса на протеините, проучувањето на квалитативниот и квантитативниот состав во однос на полипептидните субединици кај протеинските комплекси и полидисперзните системи (вируси, рибозоми). SDS-PAGE исто така е составен дел од посложените аналитички методи како *Western* блотинг, на пример. SDS-PAGE може да се користи и како препаративен метод, за пречистување на мали количества протеини од ткивни или од клеточни хомогенати, како и од експресиски вектори при молекуларното клонирање.

Нативните протеини се амфотерни молекули и имаат мошне различен вкупен електростатски полнеж, кој зависи од полнежот на бочните групи во полипептидната верига при определена рН-вредност на средината. Покрај тоа, секундарната и терциерната структура, како и присуството на повеќе субединици во протеинскиот комплекс имаат силно влијание врз насоката и брзината со која се движат во константно електрично поле. За разлика од DNA-молекулите, нативните протеини нема да мигрираат во текот на електрофорезата само во зависност од молекулската маса, туку и според нивната форма, конформација и вкупен електричен полнеж. Така, при нативна електрофореза, протеинските молекули кај кои доминира позитивниот електричен полнеж (некои базични протеини како хистоните, на пример) патуваат кон катодата, додека оние со негативен полнеж (некои кисели протеини како лизозимот, на пример) се движат анодно. Полипептидите кои при определена рН на пуферот се електронеутрални, теоретски, не мигрираат во текот на електрофорезата, па, оставаат на местото на апликацијата.

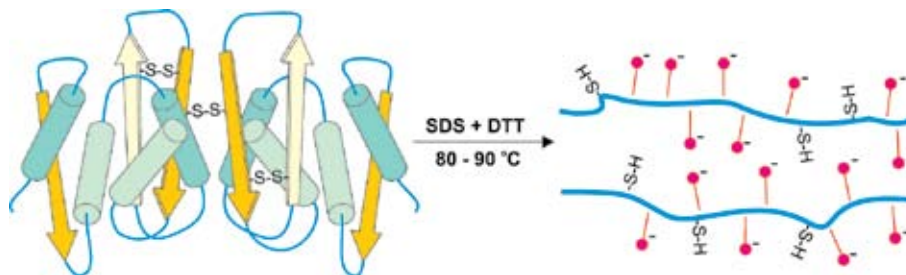
Поради енормната структурна и физичко-хемиска полиморфност на протеините, нативната електрофореза има ограничена примена како аналитички метод, особено во молекуларната биологија каде што е потребно точно карактеризирање и определување на молекулската маса на протеините. За разлика од нативната електрофореза, кај методот SDS-PAGE се применува силниот катјонски детергент натриум додецилсулфат (SDS) кој се врзува за полипептидната верига во моларен

однос од приближно еден молекул на SDS на секои две аминокиселински остатоци, со што се денатурираат, т.е. „линеаризираат“ протеинските молекули (**слика 20-34**).

**Слика 20-34:** Хемиска структура на молекулот на натриум додецил сулфат (SDS).



За раздвојување на поединечните полипептиди од мултимерните протеини се применува дитиотреитол (DTT) кој со редукција ги прекинува интер- и интрамолекуларните дисулфидни врски (-S-S-). Со комбинираниот третман на мултимерните протеини, се нарушуваат кватернарната, терциерната и секундарната структура на протеините, а поединечните полипептиди добиваат негативен електричен полнеж (**слика 20-35**). Во такви услови, електрофоретската подвижност (мобилност) на полипептидите станува обратно пропорционално зависна само од нивната молекулската маса, слично како при електрофорезата на нуклеинските киселини.



**Слика 20-35:** Денатурација и линеаризирање на протеинските молекули со комбиниран третман со натриум додецил сулфат (SDS) и дитиотреитол (DTT).

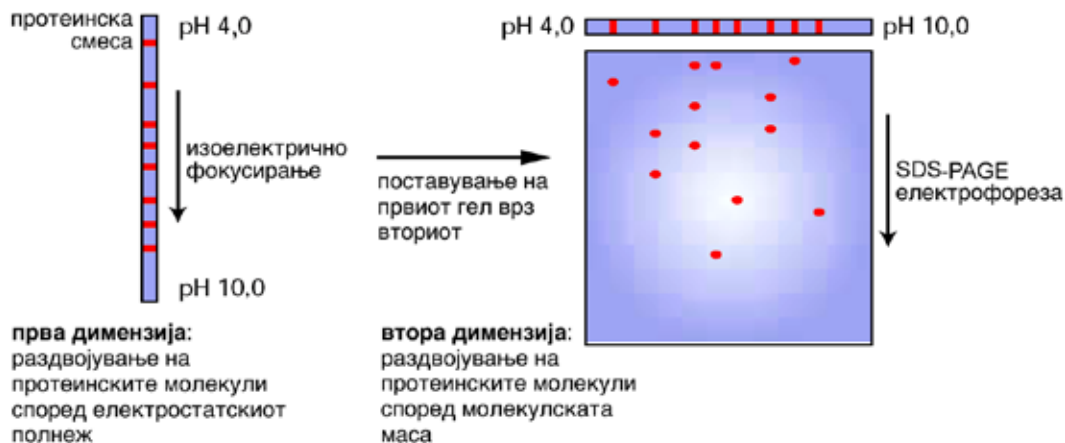
## Двеминзионална електрофореза на протеини

Електрофоретското раздвојување на протеинските молекули во две димензии (2D-електрофореза) е можна и често користена техника за анализирање на комплексни смеси на протеини, какви што се хомогенатите од анималните и растителните органи и ткива, клеточните култури, ткивните течности и други биолошки примероци.

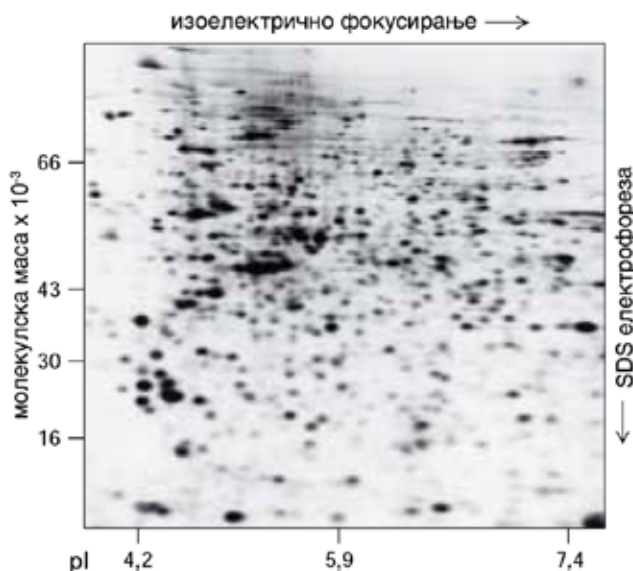
Со оваа техника, популациите на протеинските молекули се раздвојуваат според две својства: нивната изоелектрична точка и молекулската маса. 2D-електрофорезата на протеини се врши во два чекора (две димензии): најпрво се користи изоелектрично фокусирање (IEF), а потоа стандардна полиакриламидна електрофореза (SDS-PAGE). Со првата техника, се врши електрофоретско раздвојување на протеините во цевка исполнета со полиакриламиден гел кој содржи **амфолити** кои создаваат градиент на pH-вредности. Втората димензија се добива кога изоелектричниот гел се поставува врз полиакриламидниот, па, се врши раздвојување според молекулската маса (**слика 20-36**).

Со ваквото комбинирање, множат да се идентифицираат илјадници протеински молекули, кои се разликуваат меѓусебно според поставеноста во дведимензионалниот гел. Идентификацијата на поединечните протеински петна (еквиваленти на лентите од еднодимензионалната електрофореза) се врши рачно или со посебни софтвери. Во последно време, особено во протеомските анализи, се користи идентификација и квантификација на протеините со масена спектрометрија, наместо неспецифичното бојење.

### А принцип на 2-D електрофореза



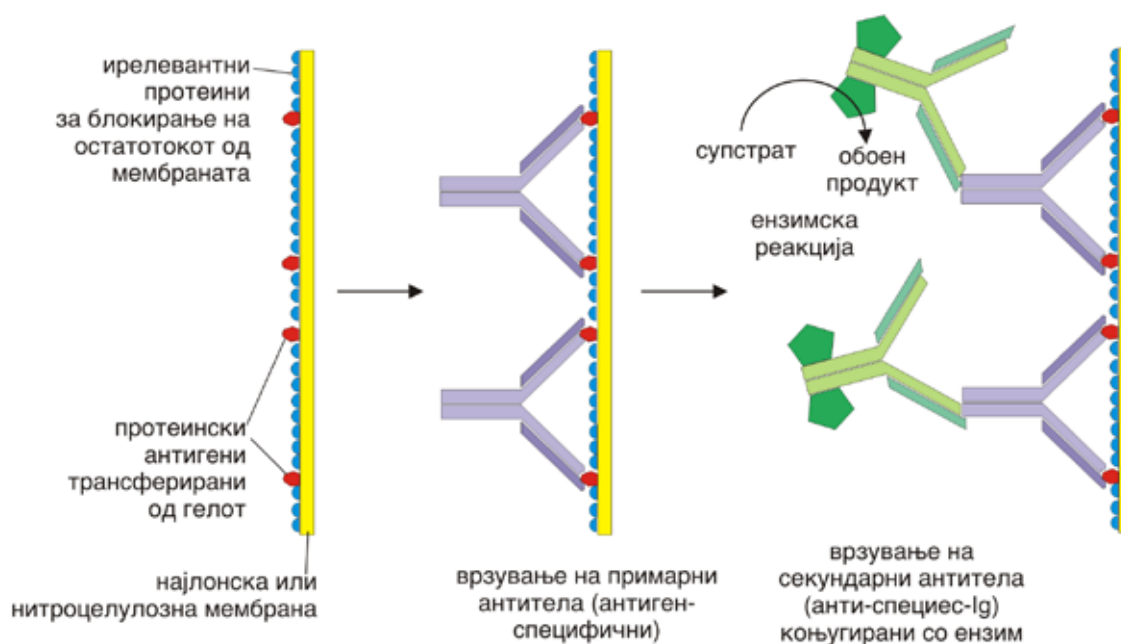
### Б пример на 2-D електрофоретограм



**Слика 20-36:** 2D-електрофореза на протеини. **А:** принцип-раздвојување на протеините во првата димензија (изоелектрично фокусирање) и во втората димензија (полиакриламидна електрофореза). **Б:** пример на 2D-електрофоретски гел на раздвоена смеса на протеински молекули во вид на поединечни петна. Позицијата на петната во гелот ги определуваат идентитетите на протеинските молекули.

## 20.14 Имуноблотинг (*Western*-блотинг) анализа

Имуноблотинг методот се користи во молекуларната биологија за поспецифична карактеризација на протеините преку употребата на антитела. Овој метод е базиран на реакцијата на специфични антитела кон протеинските антигени и нивна имунохемиска детекција. Имуноблотинг анализата може да се применува и со обратниот принцип, односно за детекција на присуството на антитела во испитуваниот серум кон определени антигени во смеса на протеини. Имуноблотинг анализата на електрофоретски раздвоени протеински фракции обично се означува како вестерн блотинг (*Western blotting*). Кај оваа техника, протеинските антигени молекули најчесто прво се раздвојуваат со гел-електрофореза, а потоа се трансферираат врз најлонска или нитроцелулозна мембрана, слично како кај Сатерн-блотингот. Наместо со протеински бои, нивното визуализирање на мембраните се врши со специфични антитела обележани со ензим (слика 20-37).



**Слика 20-37:** Шематски приказ на принципот на специфична идентификација на електрофоретски раздвоените протеини со вестерн-блотинг.

Во молекуларната биологија, вестерн блотингот се користи за квалитативно и квантитативно карактеризирање на протеините и определување на нивната молекулска маса. Тоа е можно дури и кога се анализира хетерогена смеса која содржи десетици, па, и стотици разни типови протеини и други макромолекули, како што се ткивните екстракти и телесните течности. Вестерн-блотингот се применува и за детекција, како и за квантитативно определување на концентрацијата на клонирани протеини кои се експримираат *in vivo* или се добиваат со *in vitro*-транслација во соодветни системи.



# ГЕНЕТСКИ ИНЖЕНЕРИНГ

## Глава 21

**Т**ехниките на генетскиот инженеринг кои се развиени во последниве неколку децении, имаат извонредно влијание врз базичните и апликативните истражувања во повеќе области. Практичната примена на технологијата на рекомбинантната DNA се протега од производството на важни медикаменти кои се применуваат во медицината, генската терапија, па, сè до зголемување на приносот на земјоделските растенијата и подобрување на нивните карактеристики.

Иако методите на манипулација со DNA-молекулите се технолошки речиси револуционерни, повеќето од нив произлегуваат од сознанијата за репликацијата, транскрипцијата и транслацијата кои еволуцијата ги „измислила“ пред многу еони. Денес, оваа технологија е толку поедноставена што е можно да се изолира определен DNA-регион од кој било достапен организам, истиот да се вметне во друга DNA (со што се создава хибриден DNA-молекул кој до тогаш не постоел во целата историја на животот) и потоа оваа единствена рекомбинантна DNA може да се употреби за различни цели. Во определени случаи единствена цел на внесувањето на некој ген во друга клетка или организам е да се открие неговата функција. Понекогаш целта е да се обезбеди биотехнолошко производство на протеинскиот продукт во големи количества и со висока чистота.

Рекомбинантната DNA-технологија е ново софистицирано орудие кое, поради очигледната, а уште повеќе поради сè уште неосознаената, моќ дејствува заканувачки за дел од јавноста.

Иронично е што долго време се избегнувала директната анализа на DNA-молекулите. Наместо тоа, проблемите во молекуларната генетика се решавале индиректно, со анализа на протеините, се вршело мошне комплицирано и долготрајно хемиско секвенционирање на RNA, а во голем дел од истражувањата се применувале класичните фенотипски генетски анализи. Денешниот методолошки пристап во молекуларната биологија е сосем спротивен: DNA-молекулите се анализираат најлесно во споредба со RNA-молекулите и протеините.

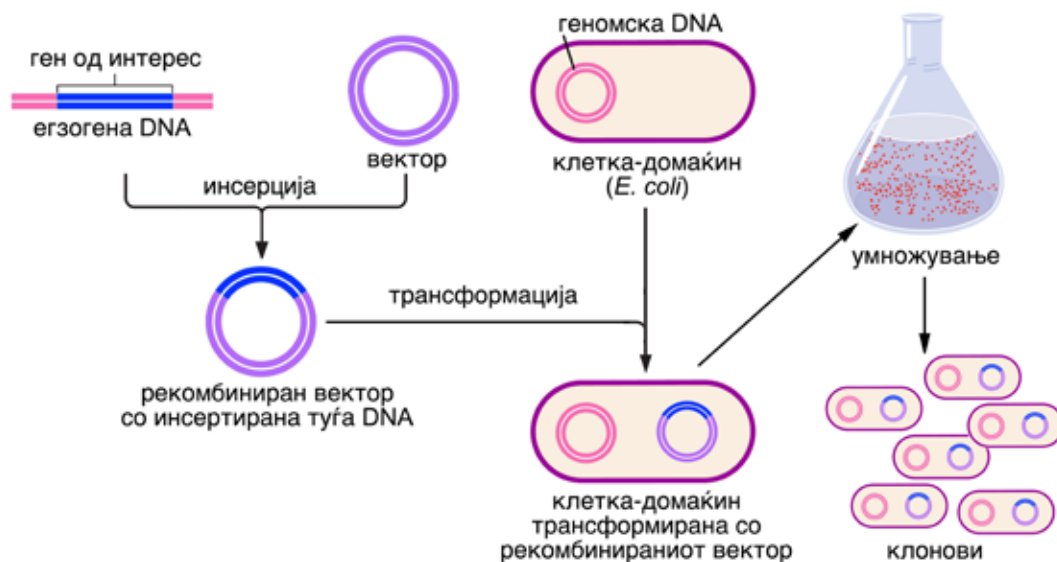
## Основен концепт и терминологија

Една од главните цели на рекомбинантната DNA-технологија е создавање на голем број идентични копии (клонови) од определен ген или DNA-секвенца (наречена **туѓа** или **егзогена DNA**), заради анализа или за експресија на генот во соодветен **организам-домаќин**.

Конструкцијата на рекомбинантната DNA се врши во *in vitro* услови, при што се користат рестрикциските ендонуклеази за пресекување на двоверижните DNA-молекули од векторот или од туѓата DNA која треба да се клонира, како и DNA-лигазата за ковалентното лепење на нивните краеви.

**Векторите** сликовито можат да се опишат како молекуларни „возила“ со кои туѓата (егзогена) DNA се внесува во клетките-домаќини заради клонирање. **Рекомбинантниот молекул** е конструирана со вметнување на секвенцата на егзогената DNA во векторот. Таквиот рекомбиниран вектор може да се внесе во соодветна клетка-домаќин и да се формираат огромен број **идентични копии - клонови** (слика 21-1).

Егзогената DNA може да се издвои од клонираните клетки и на тој начин можат да се добијат енормен број на идентични копии од инсертираната DNA. Токму затоа овој процес сликовито се споредува со фотокопирањето и, понекогаш, се означува како амплификација *in vivo*.



**Слика 21-1:** Шематски приказ на принципот на клонирање на гени. Прво, туѓата DNA со генот од интерес се инсертира во соодветен вектор. Понатаму, рекомбинираниот вектор се внесува во подобна клетка-домаќин која се умножува во голем број генетски идентични клонови. Во секоја од нив се наоѓа и копија од генот од интерес.



## 21.1 Избор на вектор за клонирање

Постојат големи разлики и во однос на едноставноста и на економичноста на методите за пропагирање на клетките-домаќини во култура *in vitro*, при што бактериите и габите се многу полесни и поевтини за манипулација во лабораториски услови, отколку вишите еукариотски клетки. Од тие причини, изборот на комбинацијата на вектор и на домаќин најчесто е компромис меѓу нивните карактеристики и ограничувања. Векторот за клонирање обично содржи:

- **извор (*origin*) на репликација** кој овозможува да се реплицира независно од хромозомската DNA на клетката-домаќин;
- **маркер за селекција** која овозможува релативно лесна идентификација на клетките-домаќини во кои е внесен векторот со туѓата DNA;
- **клонирачки регион со места за рестрикциски ендонуклеази** што овозможува пресекување на однапред предвидени позиции со избрани рестрикциски ензими и внесување на туѓата DNA.

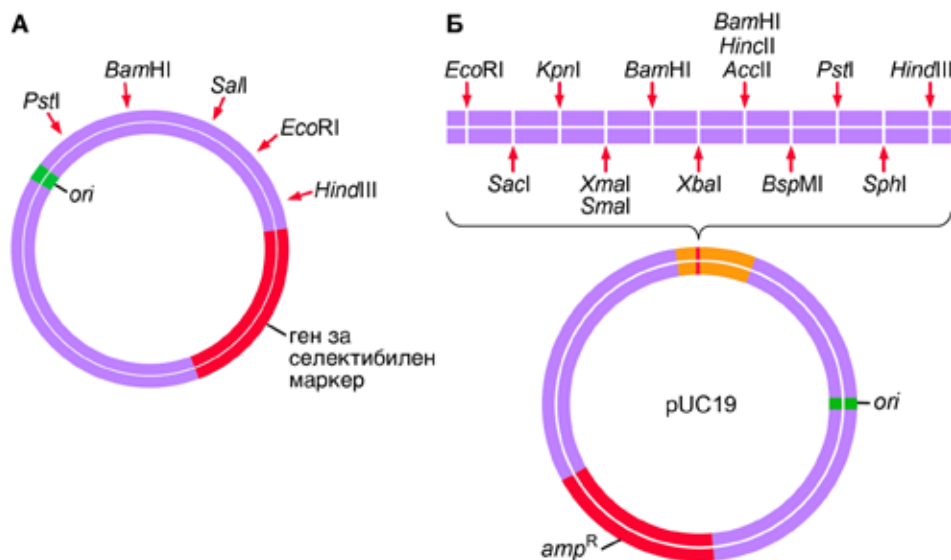
Во натамошниот текст следи краток опис на почесто користените вектори.

### Плазмиди

Плазмидите кои се користат во генетскиот инженеринг се првично изолирани од природно присутните циркуларни DNA-молекули кои се наоѓаат кај многу бактериски видови и кај едноклеточни еукариотски клетки. Како што е претходно објаснето, плазмидите се релативно мали, циркуларни DNA-молекули кои егзистираат екстрахромозомски, од 10, па, сè до 700 копии во бактериските клетки и се реплицираат под „релаксирана“ контрола, т.е. релативно независно од репликацијата на бактерискиот геном. За таа цел, плазмидната DNA содржи сопствен регион за почеток на репликацијата означен како *ori* (*origin of replication*) кој овозможува автономна репликација на плазмидот.

Плазмидите наменети за молекуларното клонирање содржат еден или повеќе **гени за селекција**, каков што е за резистенцијата кон антибиотици или за синтезата на некој ензим што дава обоен продукт, со што можат да се идентифицираат бактериските популации трансформирани со рекомбинираниот плазмид. Плазмидите кои комерцијално се произведени за генетски инженеринг се модифицирани пред сè за да содржат **клонирачки регион (MCS, од англ. *multiple cloning site*)** со повеќе позиции за различни рестрикциските ензими, со што се овозможува поголема флексибилност во изборот на еден или повеќе ензими за пресекување на туѓата DNA (инсертот) и на интактниот плазмид (**слика 21-2**). За клонирање најчесто се користат комерцијално конструирани плазмиди, какви што се: **pBR322, pUC19, pGEM** и многу други.

По внесувањето на рекомбинираниот плазмид, трансформираниите бактерии се размножуваат со стандардна инкубација во лабораториски услови. Притоа се умножуваат и рекомбинираниите плазмиди, а со нив и инсертираната DNA се мултиплицира во милијарди идентични копии - клонови.



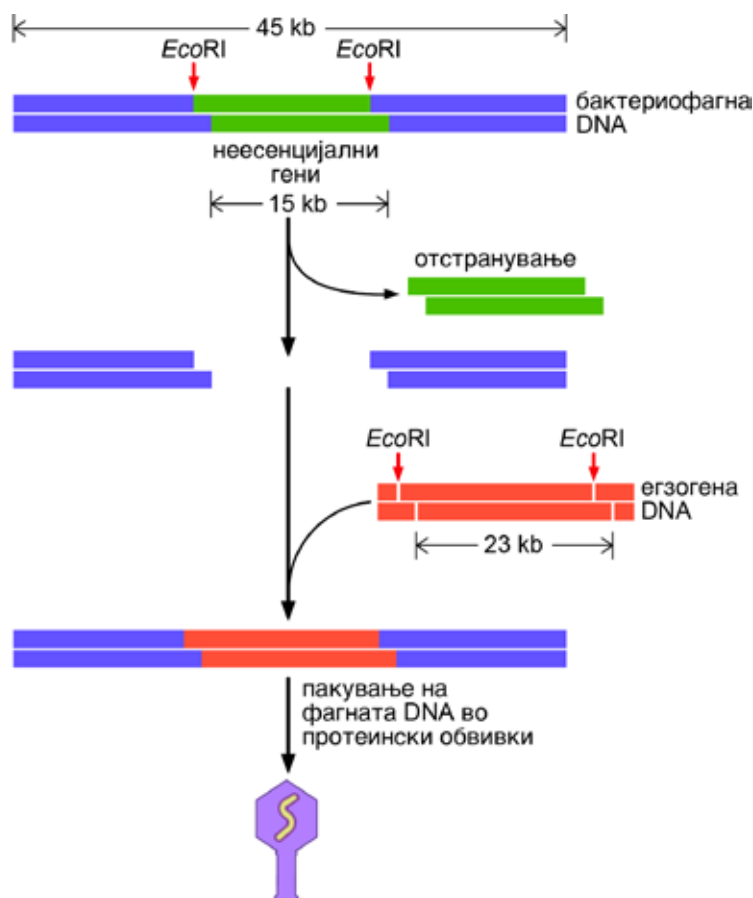
**Слика 21-2:** Структура на плазмидните вектори. **А:** Плазмидот за клонирање содржи најмалку три елемнти: извор на репликација (*ori*), едно или повеќе места за препознавање со рестрикциски ендонуклеази и ген за селекција. **Б:** структура на еден од почесто користените плазмиди. Во горниот дел од сликата е прикажан полилинкерот во кој се наоѓаат повеќе рестрикциски позиции.

## Вирусни вектори

Вирусите имаат определени предности како вектори за клонирање на DNA. Тие ефективно ги инфицираат приемчивите клетки и поради тоа можат да ја вметнуваат туѓата DNA со многу поголема успешност отколку плазмидите. **Бакуловирсот**, на пример, инфицира клетки од инсекти, па, често се користи за клонирање и експресија на еукариотски гени во култура на инсектни клетки. Со методите на генетскиот инженеринг, во последниве неколку години се конструирани бакуловирсни вектори способни да инфицираат и други еукариотски клетки, како мамалиски, а не само инсектни. **Ретровирусите** се користат за стабилна интеграција во геномот на клетки од цицачи и континуирана експресија на клонираниот ген. **Аденовирусите и аденоасоцираните вируси (AAV)** се користат за конструкција на терапевтски вируси кои внесуваат рекомбинантни DNA-молекули во заболените клетки или организми кај т.н. **генска терапија**. Тие се користат за корекција на мутиран или за внесување соодветен ген при некои заболувања. **Ламбда-фагот ( $\lambda$ -фаг)** е бактериски вирус кој е многу ефикасен при трансферот на туѓа DNA во *E. coli*, па, исклучително често се користи за генско клонирање. Дел од геномот на ламбда фагот не е неопходен за репликација и пакување на фагот во „домаќинската“ бактеријска клетка - *E. coli*, па, овој регион може да се исече со рестрикциски ендонуклеази и да се отстрани. Во ламбда фагот можат да се вметнуваат DNA фрагменти со големина до 50 kb и таа особина може да се користи како селекција на рекомбинираниите, наспроти бактериофазите, во кои не се вметнала DNA. Геномот на некои бактериофази, каков што е **фагот M13**, содржи едноверижна DNA. По инфекцијата на бактериите, едноверижната DNA од фагот се

конвертира во двоверижна репликациска форма на DNA, која може да се изолира и да се користи за клонирање. бактериофазите со едноверижна DNA, особено M13, биле често користени при Сангеровиот метод за DNA-секвенционирање, но, PCR-амплификацијата забележително ја потисна нивната употреба во тие цели.

**Космидите** се хибриди на ламбда фагот и на плазмидите и содржат региони означени како **кохезивни краев** - *cos* (*cohesive ends*) кои потекнуваат од ламбда фагот. Тие можат да се реплицираат автономно како и плазмидите, а можат да се пакуваат постабилно и компактно, како и ламбда фагот. При клонирањето, космидот и еукариотската DNA се дигестираат со ист рестрикциски ензим и се лигираат, при што можат да се формираат т.н. **конкатамери** (едноподруго поврзани DNA-фрагменти). Потоа, космидите се вметнуваат во вирусните честички од ламбда фагот, кој има улога на „инјекциски шприц“ за вбригување на релативно големите рекомбинантни DNA-фрагменти во бактерииските клетки (слика 21-3).



**Слика 21-3:** Принцип на клонирање со космидни вектори.

Генот за селекција помага да се избераат само хибридните (рекомбинирани) космиди во кои се наоѓа и космидната и еукариотската DNA. Плазмидните компоненти кај космидот ги обезбедуваат секвенците кои се неопходни за репликација на космидите, а отсуството на есенцијалните фагни гени предизвикува овие хибридни вектори, откако ќе навлезат во бактеријата, да создаваат циркуларни молекули и

да се размножуваат **екстрахромозомски** (надвор од бактерискиот хромозом), слично како и плазмидите. Космидите можат да пренесуваат околу три пати поголеми DNA-инсерти отколку ламбда фагот, односно околу 30 до 45 kb.

**Фагемидите** се композитни вектори добиени со спојување на едноверижни бактериофази (најчесто f1 и M13) со некои плаزمиди. Во зависност од условите за раст, фагемидите се реплицираат како едноверижни или двоверижни DNA-молекули, што е важно при определени методи за клонирање.

**Вештачките хромозоми** се синтетски конструирани вектори кои содржат DNA-секвенци неопходни за формирање на структура на хромозом: теломер, центромер, регион за почеток на репликацијата (*ori*) и други организациски елементи. Во геномиката се користат за инсерција на енормно големи секвенци на DNA (над 100 Mb). Кон нив се однесуваат бактерискиот вештачки хромозом - **ВАС** (*bacterial artificial chromosome*), габичниот вештачки хромозом - **ФАС** (*fungus artificial chromosome*), квасниот вештачки хромозом - **ЈАС** (*yeast artificial chromosome*) и други вектори.

Заради споредба, основните карактеристики на почесто користените вектори за клонирање се прикажани во (**табелата 21-1**).

<b>Табела 21-1: Споредба на карактеристиките на некои вектори за клонирање</b>			
<b>вектор</b>	<b>должина на DNA која може да биде внесена</b>	<b>метод на пропагирање пред трансформацијата</b>	<b>метод на внесување во бактерии</b>
<b>плазмид</b>	≤ 15 kb	плазмидна репликација	трансформација
<b>ламбда-фаг</b>	≤ 23 kb	бактериофагна репродукција	бактериофагна инфекција
<b>козмид</b>	≤ 44 kb	плазмидна репродукција	бактериофагна инфекција
<b>ВАС</b>	≤ 300 kb	плазмидна репродукција	електропорација

## 21.2 Избор на клетка-домаќин за клонирање

Рекомбинираните вектори се користат за внесување на инсертираната DNA во различни типови на **клетки-домаќини**.

**Прокариотите, односно бактериите**, се први и најчесто користени домаќини за трансформација со рекомбинирани вектори. Големи предности на користењето на бактерии за тие цели се релативно едноставното и евтино култивирање (во однос на опремата и хранливите подлоги), како и способноста за израснат во значителна биомаса, а со тоа и ефективно умножување на инсертираниот ген или генски сегмент. Освен тоа, механизмите на регулација на генската експресија се доста добро проучени и релативно лесно се контролираат. Од друга страна, бактериите често пати не се добар избор како домаќини кај експериментите при кои се предвидува експресија на клонираниот еукариотски ген. Сепак, прокариотите не се способни за посттранскрипциски модификации какво што е RNA-преспојувањето (сплајсингот), па, присуството на интрони го оневозможува правилното процесирање во зрели mRNA-молекули. Кај поединечни експерименти, опишана е успешна експресија

на клонирана комплементарна DNA (од која се отстранети интроните) добиена со реверзна транскрипција од mRNA. Прокариотските клетки не вршат посттранслационски модификации, па, се целосно непогодни за експресија на еукариотски гликозилиран протеини, на пример.

**Еукариотите**, исто така, се користат во техниките на рекомбинантната DNA. Нижите еукариоти, какви што се квасните габи, значително се разликуваат по своите карактеристики од вишите еукариотски клетки, па, затоа имаат и различни индикации за примена како домаќини за трансформација со рекомбинирани вектори при молекуларното клонирање. Квасните габи (каква што е *Sacharomyces cerevisiae*) се култивираат мошне слично како и бактериите т.е. релативно економично, едноставно и ефективно. Механизмите за регулација на генската експресија се солидно познати и доста лесно се контролираат *in vitro*. Габите имаат механизми за отстранување на интроните од RNA-транскриптите, но, не се секогаш компатибилни со организацијата на посложените гени од вишите еукариоти.

Ограничување е и тоа што во квасните клетки не врши посттранслационска модификација, каква што е гликозилирањето, на еднаков начин како што тоа го вршат мамалиските клетки. За експресија на гликозилирани или покомплексни гени од вишите организми, посоодветно е користењето на еукариотски клетки-домаќини, чии посттранслационски и посттранскрипциски механизми се слични и главно компатибилни. Но, еукариотските, особено мамалиските клетки, се многу покомплицирани и поскапи за култивирање, а и бавно растат во голем број. Поради сè уште недоволно проучената регулација на генската експресија, комплицирана е манипулацијата со нивото на експресија на клонираниот ген.

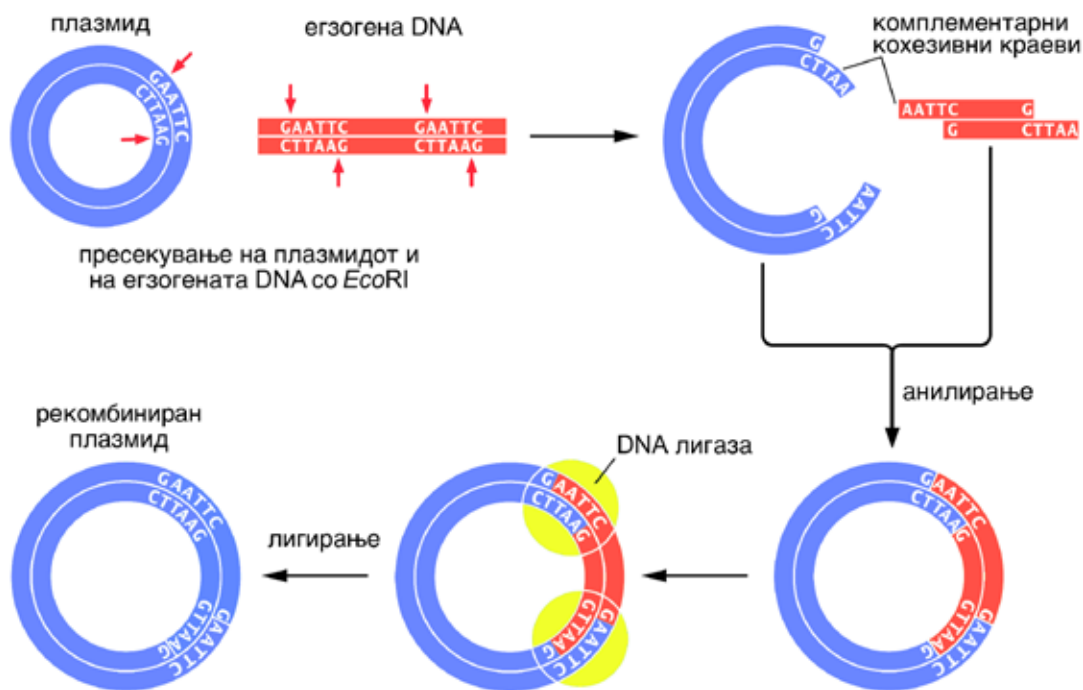
### 21.3 Инсерција на егзогена DNA во векторот

Конструкцијата на рекомбинируваниот вектор преку вметнување на егзогената DNA може да се изврши на неколку начини. Во натамошниот текст ќе бидат прикажани најчесто користените стратегии кои се користат за клонирањето во плазмидни вектори.

**Инсерција со рестрикциска дигестија (со кохезивни краеви)** - Процесот на клонирање започнува со пресекување (линеаризација) на циркуларниот плазмид со избрана рестрикциска ендонуклеаза при што двоверижниот плазмиден DNA-молекул се линеаризира. Геномската или друга туѓа (егзогена) DNA наменета за клонирање се подложува на дигестија со истата ендонуклеаза. Поради тоа што краевите на плазмидната и на егзогената DNA се пресечени со истиот рестрикциски ензим, нивните лепливи (кохезивни) краеви ќе бидат компатибилни (**слика 21-4**). По создавањето на фосфодиестерски врски меѓу анилираните кохезивни краеви на плазмидната и инсертираната DNA со ензимот лигаза се добиваат рекомбинирувани вектори.

Иако клонирањето со кохезивни краеви е веројатно најчесто користената техника која е робустна, високо ефективна и претставува своевиден стандард за клонирање, сепак има и свои недостатоци. Имено, неопходно е рестрикциската ендонуклеаза која има место за пресекување во клонирачкиот регион на векторот, случајно да има место за пресекување и на двата спротивни краја од DNA-молекулот кој се сака да се инсертира. Понекогаш, не може да се селектира рестрикциска ендонуклеаза која ги исполнува тие услови во конкретниот експеримент, што наметнува потреба од поком-

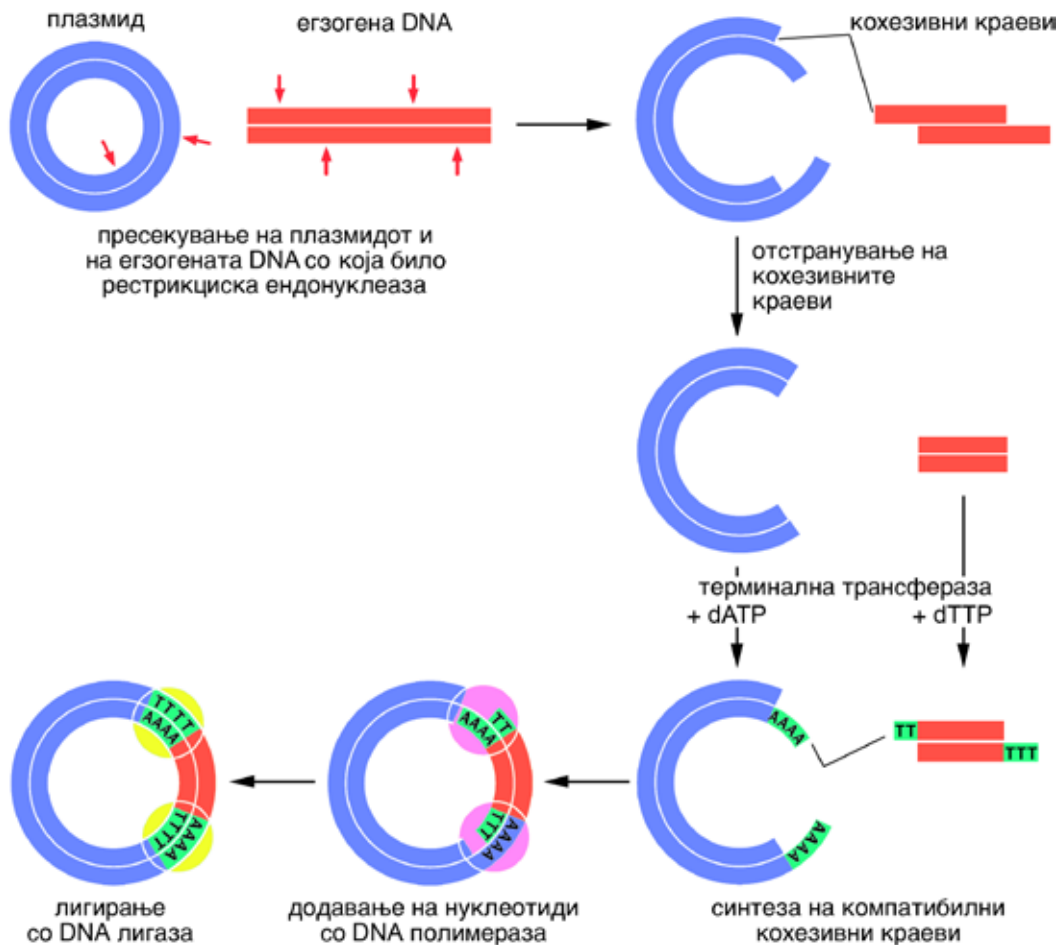
плицирани стратегии. Покрај тоа, кај оваа техника на инсерција често се случува циркуларизирање на плазмидот без инсерт. Понатаму, кохезивните краеве често доведуваат до конкатенирани.



**Слика 21-4:** Принцип на клонирање на рекомбинантна DNA со методот на кохезивни краеве добиени со рестрикциско пресекување и на векторот и на туѓата DNA со иста ендонуклеаза и лепење на краевите со DNA-лигаза.

**Инсерција со додавање хомополимерни краеве** - При дигестија на плазмидната и на егзогената DNA со различни рестрикциски ендонуклеази се добиваат некомпатибилни краеве, па, едновржните протрузии можат да се отстранат ензимски со што се добиваат тапи краеве. Истиот ефект може да се постигне и со дигестија со ендонуклеази кои произведуваат тапи краеве. За да се обезбеди правилна ориентација на DNA-инсертот, може да се користи посебна техника со која се додаваат компатибилни едновржни протрузии (слика 21-5).

Со оваа техника, не е неопходно постоење на исти рестрикциски места во векторот и во DNA-молекулот кој треба да се инсертира. Имено, на плазмидот се додава едновржен опаш од хомополимерен нуклеотид (на пример, полиаденилатен) со ензимот терминална трансфераза и присуство на определен деоксирибунуклеотид трифосфат (во овој пример: dATP). Паралелно, во друга реакција, DNA-инсертот се инкубира со истиот ензим, но, со комплементарен нуклеотид трифосфат (на пример, со dTTP), со што се создава политимидилатен опаш. По ова, двете молекули имаат кохезивни краеве кои се користат за правилна инсерција. Поради тоа што често се користи комбинацијата на полиаденилатни и политимидилатни краеве на DNA-инсертот и на плазмидот, соодветно, оваа техника се нарекува и **ТА-клонирање**.



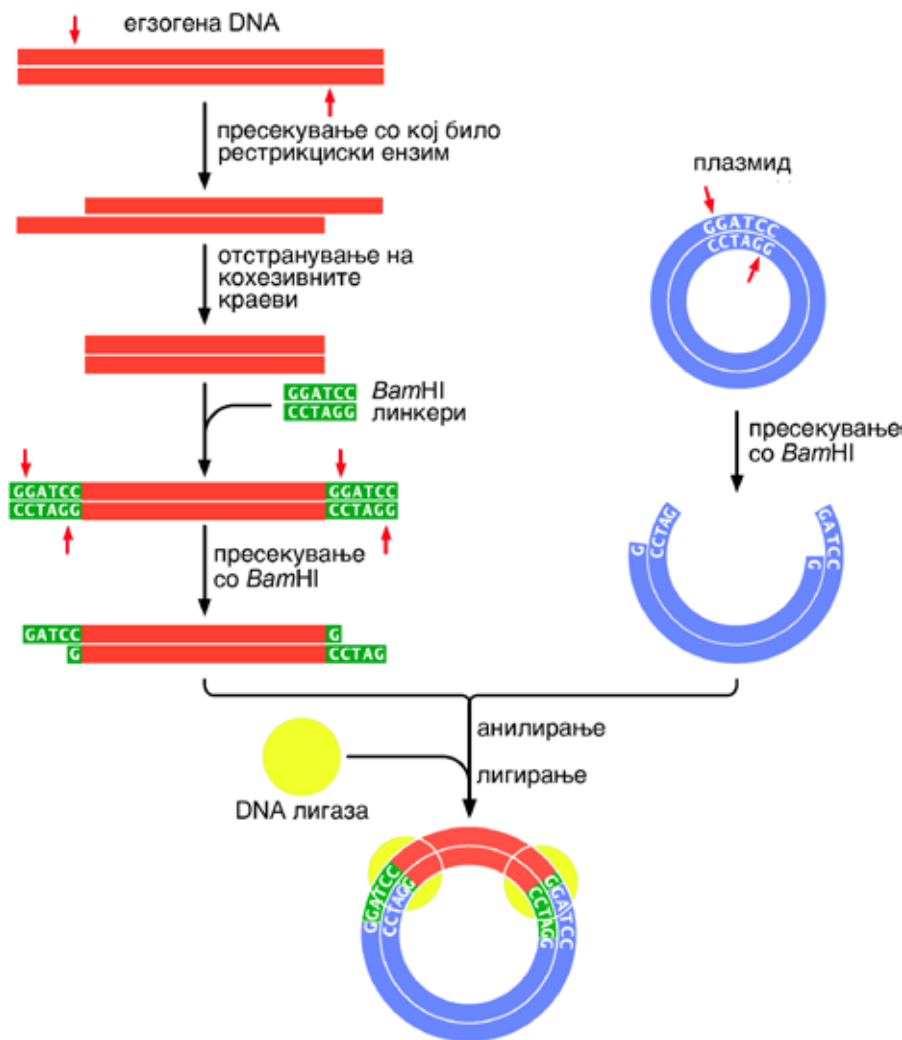
**Слика 21-5:** Принцип на клонирање на рекомбинантна DNA со синтеза на хомополимерни краеви.

**Инсерција со поврзувачи** - Алтернативно, при отсуство на рестрикциски места за во векторот и во DNA-инсертоот може да се корсита и друга техника, во која исто како и во претходно опишаната, најпрво се произведуваат тапи краеви и во двете молекули. Кај оваа техника се користат куси двоверижни синтетски DNA-молекули наречени **линкери** (од англ. збор за поврзувачи) кои содржат дизајнирани рестрикциски места. Линкерите се додаваат на тапите краеви од плазмидот и од DNA-инсертоот со лигирање, по што нивните краеви стануваат лепливи (кохезивни) (слика 21-6).

Секвенцата на едноверижните куси олигонуклеотиди за поврзувачите се бира според рестрикциската ендонуклеаза која ќе се користи за инсерција на туѓата DNA во векторот. Самите едноверижни олигонуклеотиди се нарачуваат од компаниите за синтеза (слично како и прајмерите за PCR-амплификација), а по растворањето, двата комплементарни олигонуклеотиди спонатно анилираат создавајќи двоверижен поврзувач кој се користи при клонирањето.



Користењето на поврзувачи е веројатно најфлексибилна и најчесто користена стратегија за инсерција на егзогена DNA која значително го олеснува изборот на рестрикциски ендонуклеази при клонирањето.



**Слика 21-6:** Принцип на клонирање на рекомбинантна DNA со линкери (поврзувачи).

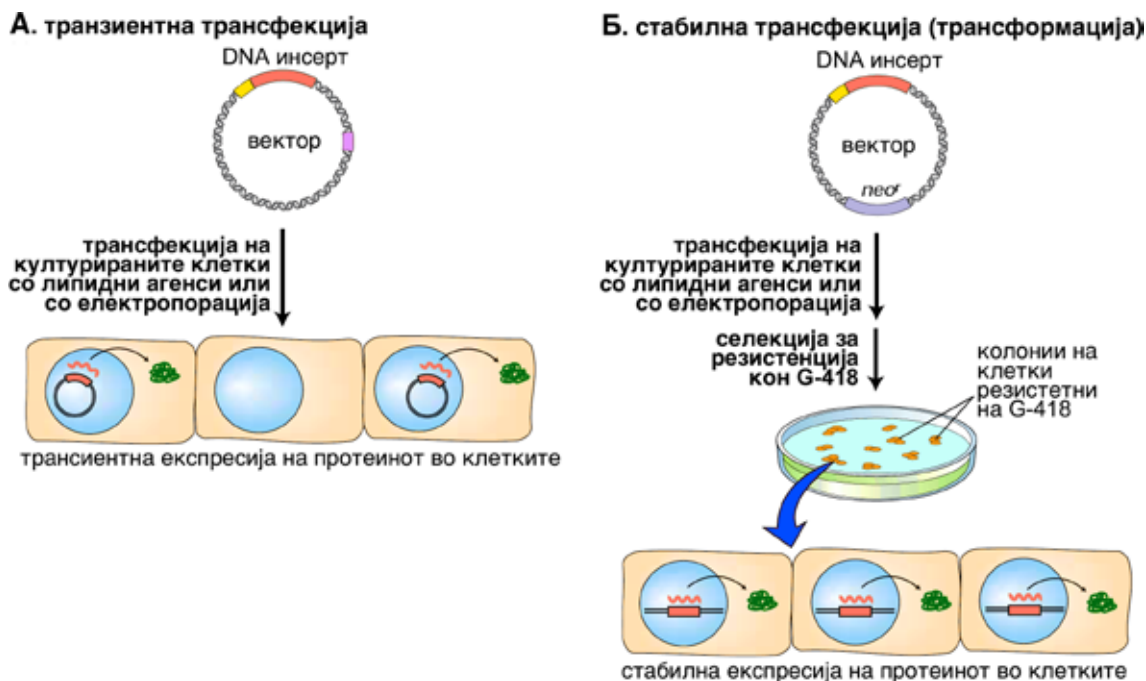
## 21.4 Внесување рекомбинирани вектори во клетките-домаќини

Кај повеќе молекуларно-биолошки техники за клонирање се користи внесувањето на плазмидна DNA во бактериските клетки преку процесот на трансформација. Овој процес е релативно лесен кај многу видови бактериски клетки, но, не и кај вообичаените соеви на *E. coli*. Бактериските соеви кои можат ефективно да се трансформираат се означуваат како **компетентни** соеви. Еден од едноставните методи за постигнување генетска компетентност за примање на туѓа DNA кај *E. coli* е примена на калциумови јони во посебни услови. Иако прецизниот молекуларен ме-

ханизам на овој метод не е јасен, се претпоштува дека калциумовите катјони ( $\text{Ca}^{2+}$ ) го обвиваат електростатски негативниот DNA-молекул и така ѝ овозможуваат да помине низ клеточната мембрана. За таа цел, плазмидната DNA и соодветниот сој на бактериски клетки кусо време се инкубираат во раствор на калциум хлорид при приближно  $0^\circ\text{C}$ , а потоа се изложуваат на краткотраен топлотен шок од околу  $40^\circ\text{C}$ . Од причини кои не се доволно јасни, овој третман предизвикува DNA-молекулите да навлезат во живите бактериски клетки, со што и се трансформираат со туѓата DNA.

За разлика од тоа, процесот на внесување на егзогена (во овој случај рекомбинантна) DNA во еукариотските клетки-домаќини се нарекува **трансфекција**. Таквите изменети домаќини се познати и како **трансгенични** клетки. За трансфекција на мамалиските клетки се користат: хемиски методи (липозоми, на пример), вирусни вектори (на пример, ретровируси) како и физички методи (**електропорација** - високонапонски електрични празнења кои формираат краткотрајни микроскопски пори во плазмалемата низ кои навлегува DNA-та).

Трансфекцијата на клетките-домаќини од вишите еукариоти со плазмидна DNA обично има краткотраен ефект (т.н. **транзиентна трансфекција**) (слика 21-7.А). По неколку дена, експресијата на протеинот не може да се открие поради деградацијата на векторот со нуклеазите присутни во цитоплазмата. За постигнување на долготрајна (стабилна) трансфекција се користи вектор (на пример, плазмид) во кој има и ген за резистентност кон соодветен антибиотик (слика 21-7.Б).



**Слика 21-7:** Ефекти по успешната трансфекција на егзогената DNA во еукариотските клетки. **А:** Транзиентна експресија на инсертираниот ген. **Б:** стабилна трансфекција која овозможува долготрајна експресија на протеинот кодиран од инсертираниот ген.

Случајното **интегрирање** на векторот во геномската DNA од клетката-домаќин се случува многу ретко, но, при анализа на милиони клетки може да се идентифицираат неколку клонови во кои е функционален и генот за селекција, за резистенција кон определен антибиотик, на пример. Имено, кај клетките во кои се вградил DNA-молекулот од векторот, ќе има експресија на генот за резистентност кон антибиотикот, па, ваквите клетки можат да преживеат и да се размножуваат и во присуство на антибиотикот во хранливиот медиум. Таквиот метод овозможува селекција и добивање на стабилни трансфектанти во кои има и експресија на туѓиот ген од интерес.

## 21.5 Селекција на клетките во кои успешно е внесен рекомбиниранiot вектор

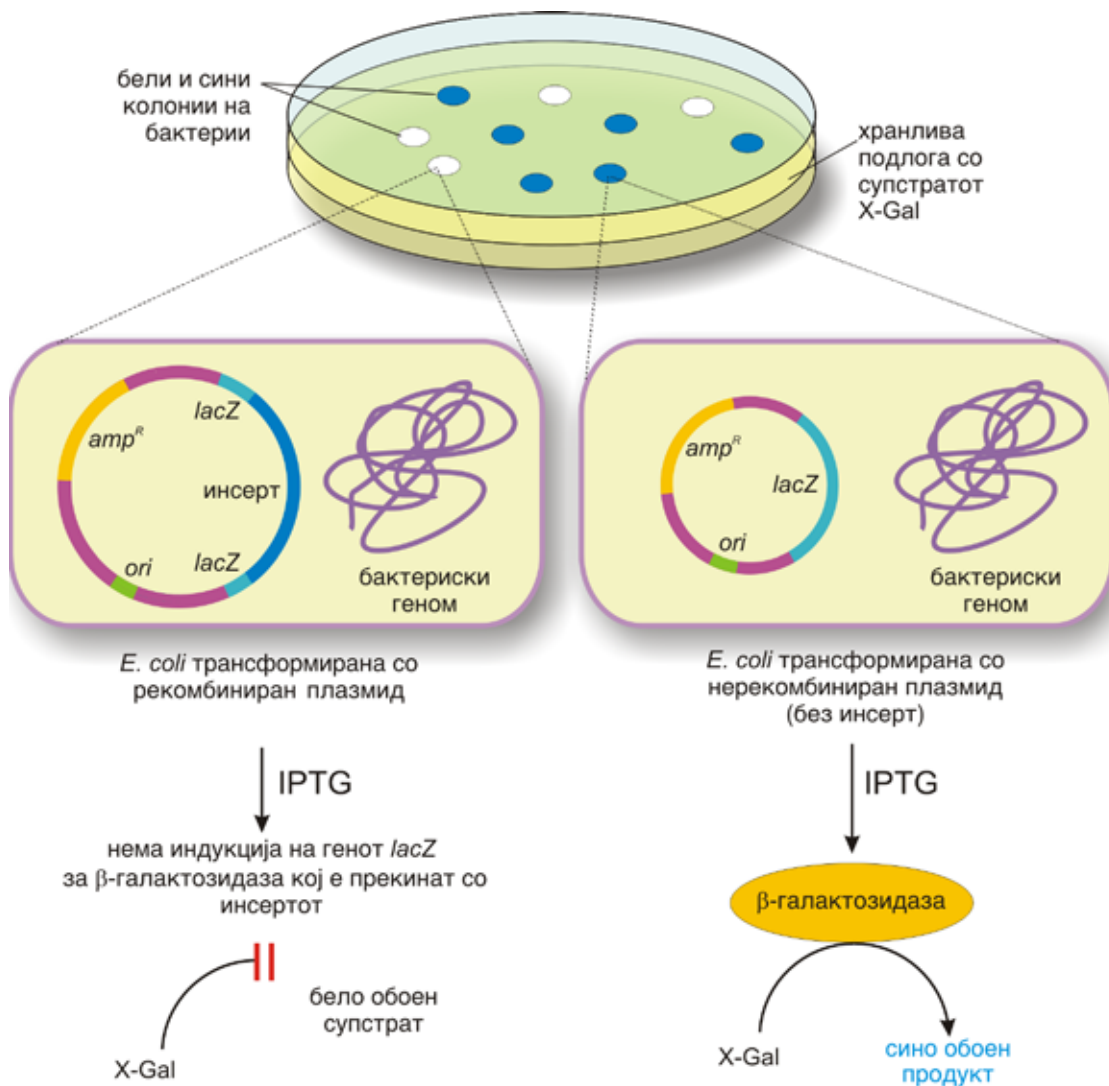
По умножувањето на клетките-домаќини, неопходно е да се селектираат успешно трансформирани (или трансфектирани) клетки во кои е внесен рекомбиниранiot вектор, наспроти останатите клетки без векторот.

При клонирањето со плазмидни вектори во бактериски клетки, колониите најчесто се селектираат на двоен начин: со **негативна селекција** која најчесто се врши со соодветен антибиотик и со **позитивна селекција** преку специфична фенотипска карактеристика која е определена со присуство на соодветен **ген-маркер** за селекција во векторот.

Имено, бактериските клетки кои воопшто не се трансформирани со плазмидниот вектор немаат присутни гени за резистенција кон ниту еден антибиотик. Наспроти тоа, плазмидот кој е користен при клонирањето содржи определен ген за резистенција (на пример, кон гентамицин). По трансформацијата, со самото засевање на бактериите на хранлива подлога која содржи гентамицин се овозможува селективно размножување само на оние клетки во кои успешно е внесен плазмидот и кај кои активно се експримира генот за резистенција кон овој антибиотик. Бактериите кои не се трансформирани воопшто не се делат и не создаваат колонии.

Покрај тоа, плазмидите често содржат и некој ген-маркер, каков што е генот за  $\beta$ -галактозидаза (*LacZ*), на пример. По лигирањето, плазмидите кои не се успешно трансформирани, т.е. во кои не е инсертирана егзогената DNA-секвенца, се очекува да имаат непрекинат ген кој кодира биолошки активен ензим  $\beta$ -галактозидаза.

По трансформацијата на бактериските клетки со нерекомбинирани плаزمиди и инкубација во соодветна хранлива подлога која содржи ензимски супстрат (каков што е: X-Gal), се експримира и ензимот кој го конвертира безбојниот супстрат во сино обоен продукт. Со тоа и колониите на *E. coli* трансформирани со нерекомбинирани плазмиди стануваат сино обоени. Спротивно на тоа, инсерцијата на туѓата DNA во клонирачкото место на плазмидот предизвикува прекин во интегритетот на генот *LacZ* и негова дисфункција. Во хранливата подлога се додава и соединението изопропил  $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозид (IPTG) кој е силен индуктор на генот. IPTG делува на тој начин што се врзува за репресорниот протеин кој во нормални околности ја репресира транскрипцијата на *lac*-промоторот. Со тоа, генот за  $\beta$ -галактозидаза има улога на негативен селективен маркер за успешноста на рекомбинацијата на плазмидот со инсертираната DNA во плазмидот.



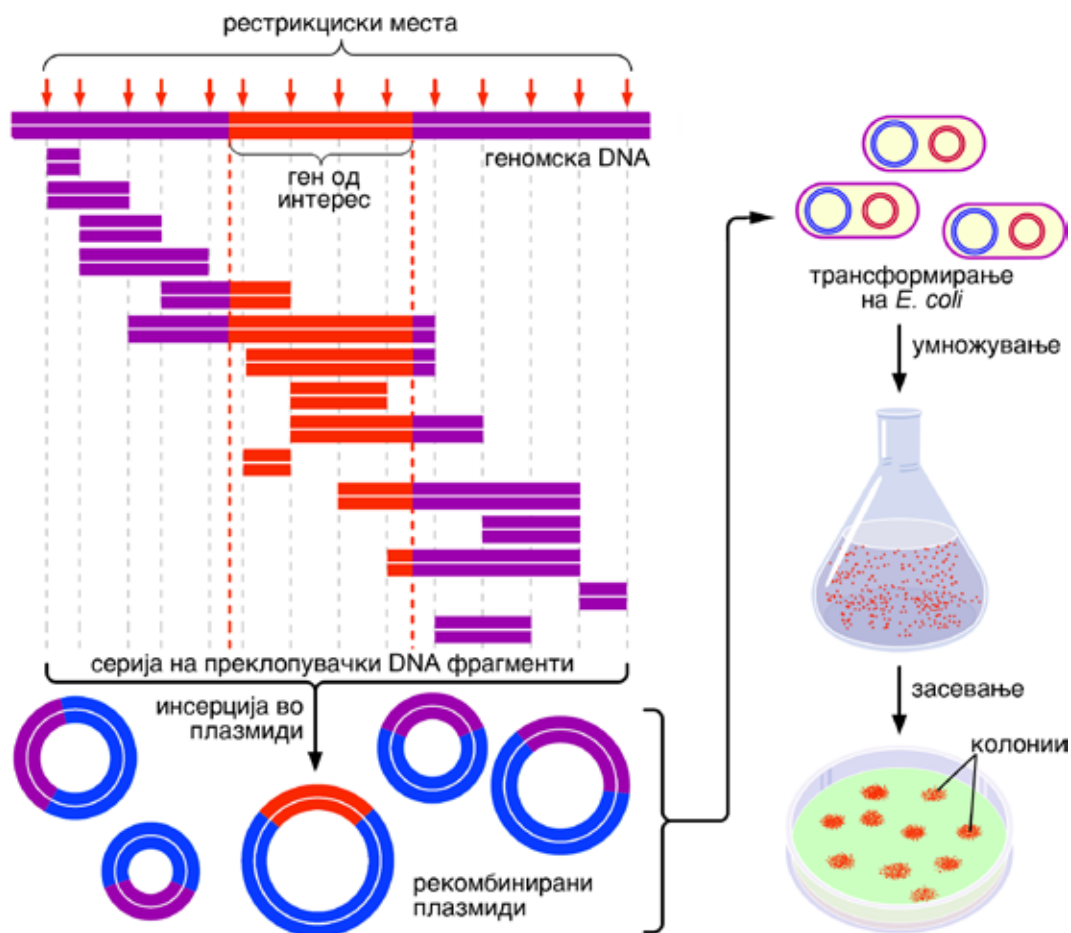
**Слика 21-8:** Принцип на бело-сината селекција на бактериските колонии по клонирањето на егзогена DNA со плазмиден вектор во *E. coli*.

По трансформацијата на бактериските клетки со такви успешно рекомбинирани плазмиди, нема експресија на функционален ензим, па, оваквите колонии имаат бела боја (слика 21-8). Поради овие две бои на колониите, ваквиот метод често се нарекува **бело-сина селекција**. Најчест метод за идентификација на еукариотските клетки кои ги содржат рекомбинантните гени е, исто така, присуството на соодветни маркер-гени во векторот кои имаат лесно забележливи фенотипски карактеристики. Често се користат гените за резистенција кон разни антибиотици, како и генот кој го кодира **зелениот флуоресцентен протеин (GFP)**, од англ. *green fluorescent protein*). Овој ген е клониран од медузата *Equorea victoria* и кодира протеин што флуоресцира зелено под ултравиолетова светлина. Клетките во кои се експримира GFP лесно се идентифицираат при осветлување со ултравиолетова светилка.

## 21.6 Создавање геномски библиотеки

Со терминот DNA-библиотека се означува популација на идентични вектори од кои секој содржи различен DNA-инсерт. При геномското клонирање се врши изолација на геномската DNA од организмот, се фрагментира и секој поединечен фрагмент се вметнува во засебен вектор. Поради случајноста на овој процес, при геномското клонирање се користат многу поголем број рекомбинирани вектори, отколку теоретскиот број на DNA фрагментите. Колекцијата на DNA-клонови што содржат фрагменти од целиот геном на организмот се означува како **геномска библиотека**. Ендонуклеазата се бира така што со пресекувањето на геномската DNA се добиваат DNA-фрагменти чија просечна должина дозволува да бидат инсертирани во соодветен вектор.

Тоа е можно само при формирањето на доволно голем број рекомбинирани плаزمиди за статистички да се постигне можноста секоја бактерија, трансфектирана со инсертиран DNA-фрагмент, да формира барем по една бактериска колонија. Идентификацијата на поединечните DNA-клонови од геномската библиотека се врши преку хи-



**Слика 21-9:** Создавање на геномска библиотека на клонови од DNA-фрагментите кои се преклопуваат од целокупниот геном на организмот.

бридизација со специфична DNA-сонда, со PCR-амплификација на дел од секвенцата или со имунодетекција на експримираниот протеински продукт со специфични антитела.

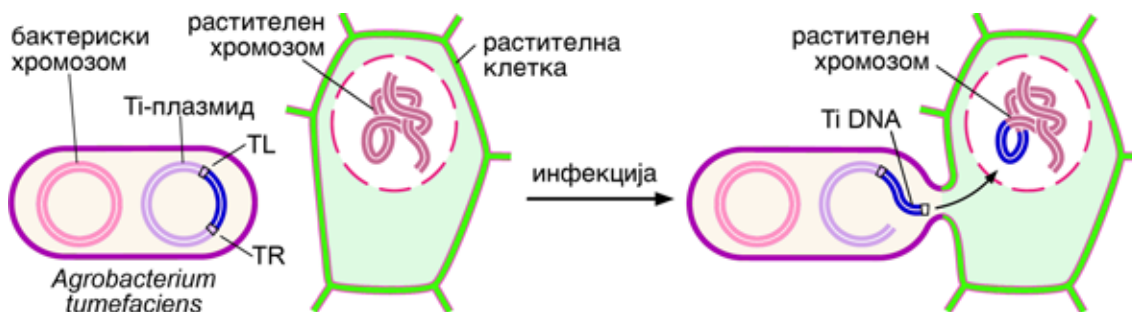
Покрај мултиплицирањето на DNA-инсертите, со клонирањето може да се врши и експресија на клониран ген и биотехнолошки да се произведуваат индустриски количества на важни протеини, каков што е хуманиот инсулин, на пример. Плазмидите не се погодни за клонирање на DNA-сегменти поголеми од 20 kb поради тоа што спонтано го губат DNA-инсертиот.

**Библиотека од комплементарна DNA (cDNA)** се добива со реверзна транскрипција на популацијата на mRNA молекули изолирани од некое ткиво или група клетки при што се синтетизира популација на соодветни cDNA-молекули. Истите потоа се вметнуваат во избраните вектори, слично како и при формирањето на геномска библиотека (слика 21-9).

## 21.7 Плазмидни вектори кај растенијата

За внесување на туѓа DNA во растителните клетки се користи бактеријата *Agrobacterium tumefaciens* која живее во почвата и предизвикува тумори кај некои растенија.

Во текот на природната инфекција, **Ti-плазмидот** (од англ. *Tumor-inducing*) кој се наоѓа во *A. tumefaciens* интегрира дел од сопствената DNA во еден од хромозомите на инфицираните растителни клетки. По интеграцијата, туѓите гени кодираат ензими за синтеза на растителни хормони кои доведуваат до неконтролиран раст на растителните клетки и создавање на туморско ткиво (слика 21-10).



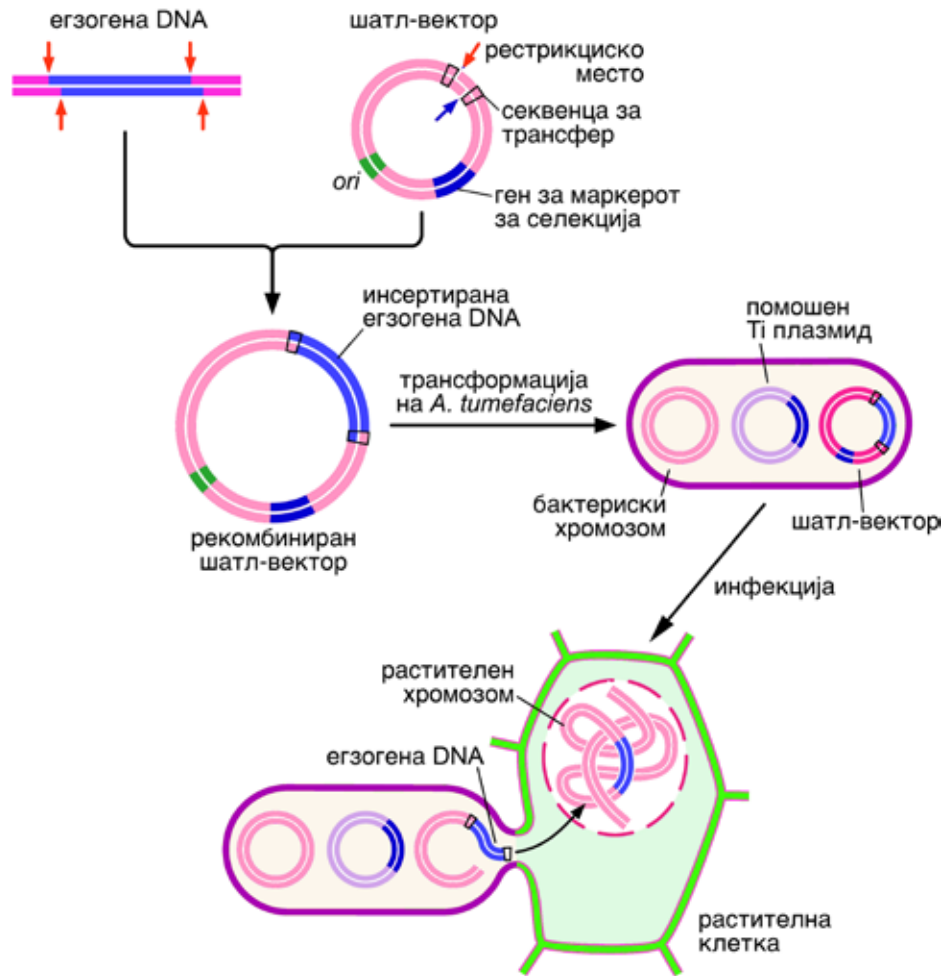
**Слика 21-10:** Принцип на внесување на егзогена DNA во растителните клетки со Ti-плазмидите и бактеријата *A. tumefaciens*.

*A. tumefaciens* и Ti-плазмидите можат да се користат и за вметнување туѓа DNA во хромозомите на растителните организми. Имено, за потребите на генетскиот инженеринг, конструиран е т.н. **шатл-вектор**, кој содржи повеќе места за различни рестрикциски ензими, маркер за селекција, како и бочните секвенци TL и TR кои се неопходни за интеграцијата во растителниот хромозом (слика 21-11).

Во избрано место на овој вектор се внесува егзогената DNA која е предмет на генетската манипулација. Покрај овој плазмиден вектор, неопходен е и **помошниот**



**Ti-плазмид** кој ги содржи секвенците неопходни за *A. tumefaciens* да предизвика инфекција на растителните клетки. Рекombинираниот шатл-векторот (со туѓата DNA) и помошниот Ti-плазмид се внесуваат во *A. tumefaciens* која, по инфекцијата, овозможува трансфер и интеграција на туѓите гени во растителниот геном.



**Слика 21-11:** Клонирање со рекомбинирани Ti-плазмидите кај растителните клетки.

Таквите вектори се користат за генетска модификација на растенијата во земјоделието, заради зголемување на отпорноста кон инсектите, хербицидите и слични предности важни за производството.



## 21.8 Потиснување на експресијата на специфични гени со *antisense*-RNA и со интерферирачка RNA

Во експериментални услови, потиснувањето на експресијата на гените со години било вршено со користење на синтетизирани *antisense*-RNA-молекули, кои откако ќе се внесат во клетката, предизвикаат потиснување на натамошното користење на соодветната mRNA за транслација. Сепак, ваквиот природ е често пати не-ефикасен, особено при експериментална или тераписка примена во услови *in vivo*.

Со неодамнешното откривање на феноменот на RNA-интерференција (описан во главата 11: Регулација на генската експресија), постигнати се извонредни резултати со потиснување на генската експресија, па, од неодамна таа станала метод од избор за брзо и релативно едноставно и евтино потиснување на гените. Во 2002 година, списанието Наука (Science) ја прогласи RNA-интерференцијата за научно достигнување на годината, а во 2006 година Нобеловата награда за физиологија или медицина е доделена на истражувачите кои први за објаснија молекуларната природа на феноменот. Бидејќи двоверижните siRNA се многу постабилни од *antisense*-RNA, потиснувањето на генската експресија со RNAi има подолготраен ефект и се применува релативно полесно како лабораториска техника.

Со оптимална примена на RNA-интерференцијата може да се постигне драстично намалување на експресијата на целиот ген што во литературата често се нарекува генски нокдаун (англ. *knockdown*), за да се разликува од целосното исклучување на генот со генски нокаут (англ. *knockout*), што е опишано малку понатаму во текстот.

Експерименталниот генски нокдаун се користи кај моделните организми *in vivo* и кај определени клеточни линии во услови *in vitro* за утврдување на попрецизните функции на гените во функционалната геномика.

Покрај тоа, потиснувањето на гените има значителен потенцијал за развој на лекови за заболувањата кај кои постои прекумерна експресија на специфични гени. Кај некои форми на рак кај луѓето, постои прекумерна експресија на определени гени кои ја стимулираат делбата на клетката (онкогени), како и на антиапоптозните гени (кои ја спречуваат програмираната клеточна смрт-апоптозата). Потиснувањето на овие абнормално активни гени со siRNA, може да ја намали пролиферацијата на клетките и да ја поврати способноста за апоптоза. Се очекува ваквиот природ, кој е сè уште во рана експериментална фаза, да има определен тераписки ефект врз туморот.

## 21.9 Хемиска синтеза на DNA во услови *in vitro*

Доколку е позната аминокиселинската секвенца на некој протеин, тогаш може да се примени органската хемија за да се синтетизира DNA-молекул кој го кодира соодветниот протеин. Во последно време, вештачката синтеза на DNA е автоматизирана и се изведува во многу комерцијални институции, од каде можат да се нарачаат куси и средно долги секвенци за различни потреби (олигонуклеотидни прајмери за PCR-амплификација и DNA-сонди за хибридациските техники, на пример).

За дизајнирање на синтетскиот ген се користи генетскиот код и познатата аминокиселинска секвенца. Освен оваа кодирачка секвенца, можат да се додаваат и други секвенци како што се кодони за иницијација и терминација на транслацијата, како и бочни (англ. *flanking*) секвенци за иницијација, терминација и регулација на транскрипцијата. Сепак, ако се очекува синтетскиот ген да биде транскрибиран, тој мора да биде ефективно препознаен од клетката-домаќин. Исто така е важен изборот на кодоните, бидејќи многу аминокиселини се кодирани од повеќе од еден кодон, а некои организми ја преферираат употребата на определени синонимни кодони.

### 21.10 Мутагенеза *in vitro*

Методите на молекуларното клонирање можат да се користат и за намерно инкорпорирање на мутации во генскиот сегмент со лабораториски техники, што се означува како **мутагенеза *in vitro***. Најчесто целта е испитување на ефектот на изменетата нуклеотидна секвенца врз процесите на генска транскрипција, а особено врз промените на фенотипските особините на експримираниот мутантен протеин врз клетката или организмот. Освен во базичните истражувања, мутагенезата преку клонирање има голема примена во биотехнологијата за дизајнирање на протеини со подобрени својства кои можат да имаат фармацевтска, агрономска и технолошка примена.

Техниките на мутагенеза довеле до важни сознанија во молекуларната биологија и генетика или експериментално ги потврдиле претходните теории. На пример, неопходноста од сигналната секвенца на *N*-крајот од некои протеини во нивниот транспорт низ мембраната на ендоплазматскиот ретикулум (ЕР) е докажана со делеција на кодоните за сигналната секвенца од генот за протеинот. Како што и се очекувало, експримираниот протеин не можел да ја премине мембраната на ЕР. Спротивно, кога сигналната секвенца била додадена на нехомологен ген кој кодирал растворлив цитоплазматски протеин, експримираниот протеин ја преминал мембраната.

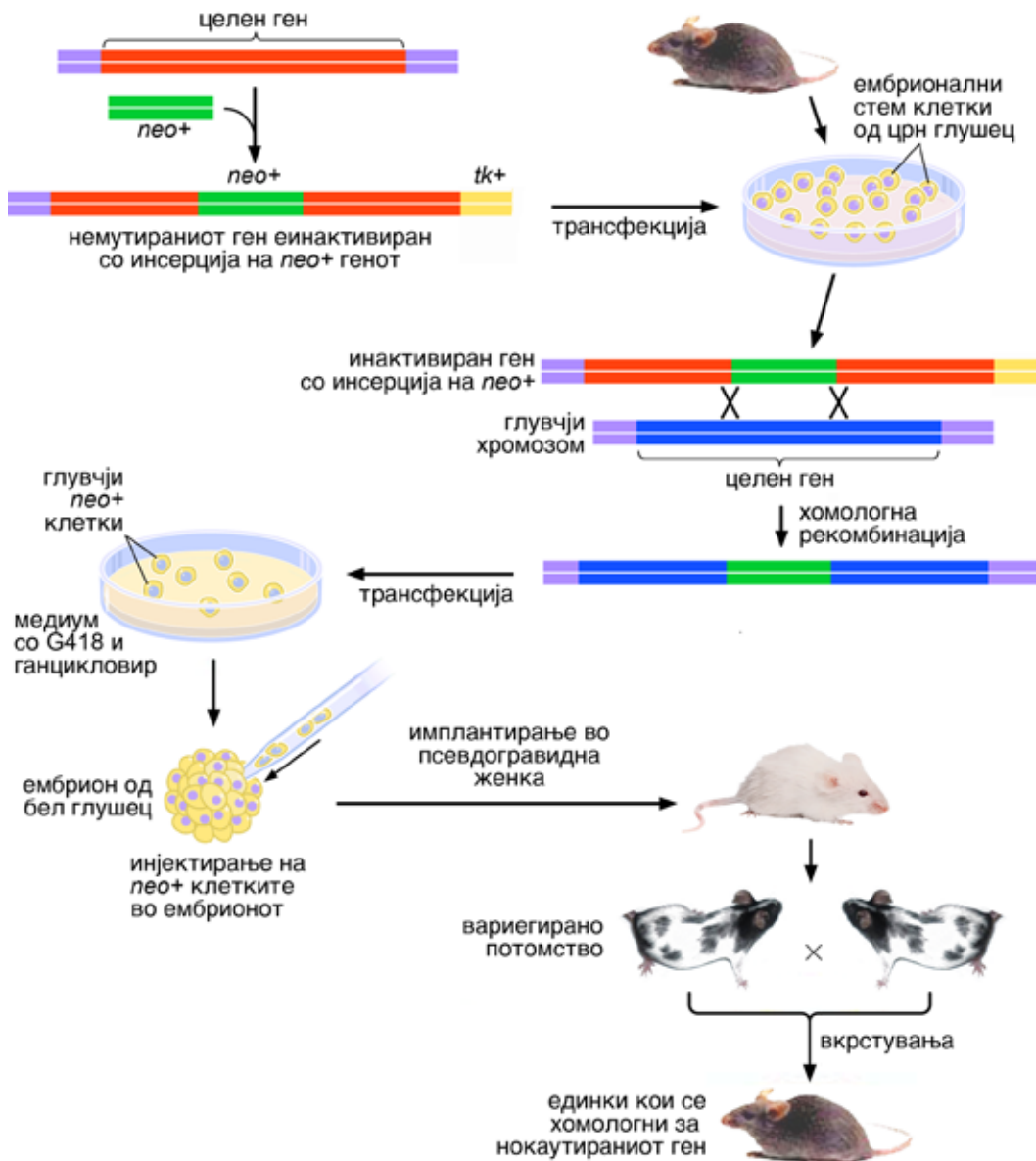
### 21.11 Инактивација на гените со хомологни рекомбинации

Вештачки индуцираните мутации во *in vitro* клеточни системи можат да бидат многу корисен извор на информации за улогата на некои гени во клеточната биологија. Техниката при која се користи хомологната рекомбинација овозможува добивање на такви податоци, но, на ниво на интактен организам. Целта на оваа техника е да се замени некој ген во клетката со неактивна форма на истиот ген (т.н. **генски нокаут**, од англ. *knockout*), по што се евалуира ефектот од инактивацијата кај организмот.

Во ваквите експерименти најчесто се користат глумците. Во плазмиден вектор се внесува нормалниот (дивиот) алел од испитуваниот глумчечки ген, а потоа се користат соодветни рестрикциски ензими за вметнување на фрагмент во средината на нормалниот ген. Во вметнатиот фрагмент е вклучен и генетски маркер: известувачки (*reporter*) ген. Оваа инсерција на туѓа DNA ја нарушува функцијата на

дивиот тип на генот, со што транскрипцијата и транслацијата на целниот ген станува нефункционална.

За да се испитаат ефектите кај цел организам, плазмидот се внесува (трансфектира) во клетките од ембрион на глушец. Бидејќи поголемиот дел од целниот ген е сè уште присутен во плазмидот (во двата раздвоени региони), постои хомологна секвенца за препознавање меѓу инактивираниот алел на плазмидот и нормалниот



**Слика 21-12:** Создавање на трансгеничен глушец со генски нокаут. Хомологната рекомбинација се користи за нормалниот глувчечки ген да се замени со инактивирана генска копија. Од ваквите експерименти можат да се излечат важни податоци за функцијата на гените.

алел (дивиот тип) во геномот на глушецот. По внесувањето во ембрионската клетка, понекогаш настанува хомологна рекомбинација меѓу плазмидот и соодветниот хромозом на глушецот, со што активниот глувчечки ген се заменува со инактивираниот ген од плазмидот. Со тоа, во хромозомот е внесен инактивиран алел, а на генот во плазмидот му недостига промотор, па, отсуствува експресија на генот. Инсериран-иот **ген-известувач** (англ. *reporter*) се користи за идентификација на **матичните (стем) клетки** во кои успешно е внесен инактивираниот ген. Ваквите трансфектирани стем-клетки се префрлаат во раниот стадиум на ембрионот на глушец со помош на микроскоп и микроманипулатор, по што се добива трансгеничен глушец со инактивиран целен ген и тоа во хомозиготна форма (**слика 21-12**).

Изменетиот фенотип на мутантниот глушец може да даде важни податоци за улогата на тој ген кај нормалниот, див сој на глушецот. Оваа техника на генско „нокаутирање“ има клучна улога во идентификацијата на функцијата на гените кои се активни во текот на ембриогенезата, како и кај многу други истражувања.

## 21.12 Синтетичка биологија и геномски инженеринг

Терминот синтетичка биологија за прв пат е употребен уште пред еден век, но, во последниве години станува сè поприсутен, иако многу автори сметаат дека се преклопува со изразот биоинженеринг. Во поширока смисла, овие два изрази се користат за експерименталните постапки со кои се врши измена на постојните молекули, клеточни структури и други компоненти во биолошките системи, како и на дизајнирање и создавање на целосно нови. Но, во потесна смисла, целите на синтетичката биологија се однесуваат на создавање на молекули кои не се наоѓаат во природата и на нивното внесување во биолошките системи. Такви се, на пример, модифицираните азотни бази кои се вградуваат во DNA-молекулите на место на стандардните. Меѓу перспективните цели на оваа дисциплина е и создавањето на целосно нови клетки и организми.

Во последниве години, брзиот технолошки развој овозможи многу поопсежни експериментални модификации на геномите отколку што досега се вршеа кај стандардниот генетски инженеринг. Некои автори ја нарекуваат новата дисциплина: **геномски инженеринг** и таа претставува своевидна надградба во големи размери на техниките на рекомбинантна DNA. Имено, наместо молекуларните интервенции на куси делови од гените или на поединечни гени, во геномскиот инженеринг се вршат екстензивни модификации, што некои автори го нарекуваат **генско уредување** (англ. *gene targeting*). Стратегиите за ваквите измени на геномот наметнуваат потреба и од специфични лабораториски методи и алатки. На пример, досегашните вообичаени техники на генетскиот инженеринг за внесување на определен корективен ген во геномот се вршат по пат на случајно вметнување во геномот, или пак, замена на дефектниот ген со корективниот по пат на хомологна рекомбинација. Во геномскиот инженеринг, инсерцијата на корективната DNA-секвенца се врши прецизно, на определени, однапред утврдени, места во геномот. За таа цел се користат посебни нуклеази кои можат селективно да пресекуваат само на уникатни места кои, статистички се наоѓаат многу ретко, најчесто еднаш во геномот на организмот каде се врши молекуларната интервенција. Постои повеќегодишно искуство со користе-

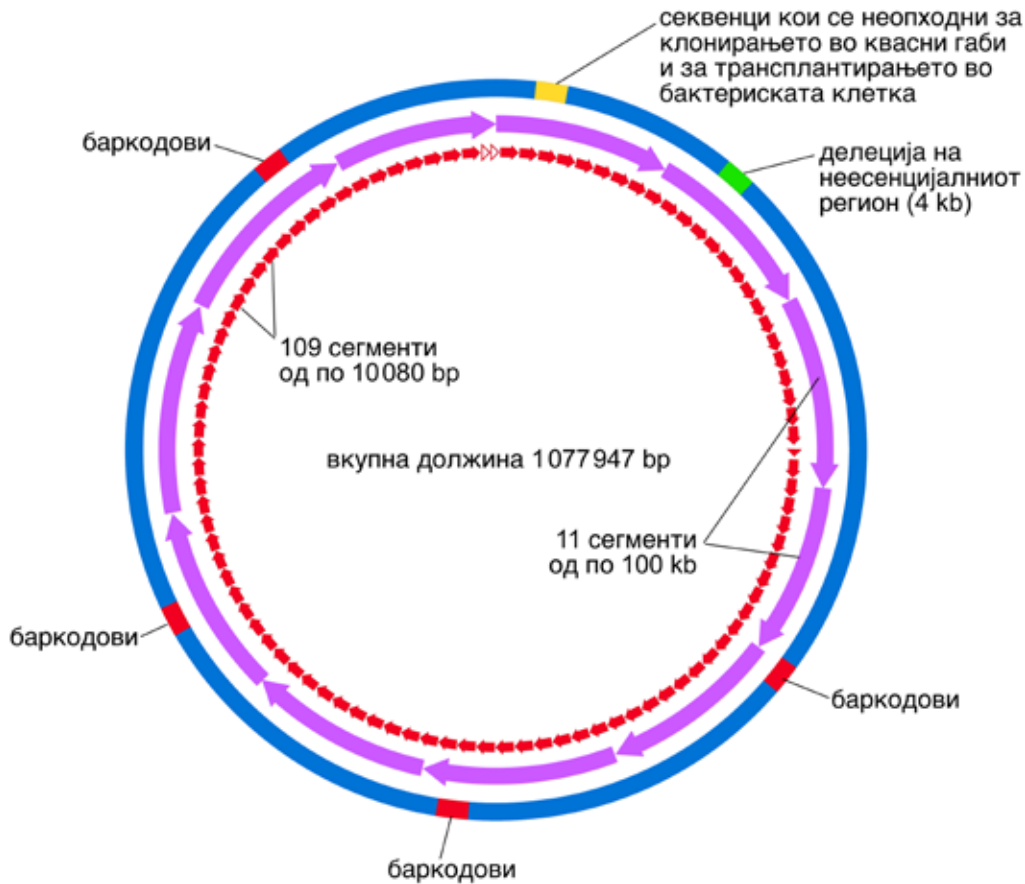
њето на т.н. **мегануклеази**, рестрикциски ендонуклеази кои имаат релативно долга препознавачка секвенца. Но, малиот број на комерцијално достапни мегануклеази значајно ја ограничува нивната употреба во овие цели. Наместо нив, во последниве години сè поголема примена имаат дизајнираните нуклеази кои се добиени со генетски инженеринг. Имено, препознавачкиот домен од овие ензими

Еден од најпроминентните истражувачи во областа на геномиката, Крег Вен-тер (Craig Venter), пред неколку години спроведе уникатен експеримент за утврдување на најмалиот можен број гени кои подржуваат живот на самостоен организам. Во **проектот за минимален геном**, користејќи инсерциска мутагенеза, Вентер и неговиот тим sukcesивно ги исклучувале еден по еден гените во геномот на бактеријата *Mycoplasma genitalium* (која има само 485 протеин-кодирачки гени), при што утврдиле дека најмалку 381 ген се неопходни за самостојниот живот и размножување на овој организам. Ваквата делумно лабораториски дизајнирана бактерија со минимален геном ја нарекле *Mycoplasma laboratorium* и претставува важно достигнување во новата ера на синтетичката биологија и геномскиот инженеринг.

Првата геномски конструирана бактерија способна за самостоен живот е добиена во 2010 година. Тимот на Истражувачкиот центар Крег Вентер (JCVI, од J. Craig Venter Institute) хемиски синтетизирал бактериски хромозом составен од DNA со вкупна должина од околу 1,08 милиони базни парови (1,08 Mb). Оваа секвенца е модификација на природниот геном на бактеријата *Mycoplasma mycoides*. Вредно е да се истакне дека прелиминарните експерименти за овој проект траеле речиси 15 години. По компјутерски изработениот дизајн, конструкцијата на синтетскиот геном се одвивала постепено, најпрво со хемиска синтеза на вкупно 1078 куси DNA-секвенци (касети), секоја долга по 1080 базни парови. Касетите биле така дизајнирани, што крајната секвенца од секоја касета се преклопувала по точно 80 базни пара со секвенцата на почетниот крај од следната касета (споредете го овој експериментален пристап со претходно опишаните концепти и методи за геномско секвенционирање). Со ова преклопување е овозможено прецизно постепено склопување на многу долга непрекината геномска DNA-секвенца. Имено, хемиската синтеза на DNA е наједноставна, најпрецизна и економски исплатива само за релативно куси секвенци, а освен тоа, долгите DNA-молекули се исклучително фрагилни, па, затоа целиот експериментален концепт се заснова на синтеза на куси сегменти. Интересно е што самата синтеза е вршена од страна на друга американска компанија, која е тесно специјализирана за хемиска DNA-синтеза. Склопувањето на вака добиените касети е вршено постапно, во три фази. Најпрво се асемблирани по 10 претходно синтетизирани касети создавајќи вкупно 109 подолги сегменти (секој со должина од 10080 bp). Во втората фаза, по 11 од секој од овие 109 сегменти се склопувани во уште подолги DNA-молекули (секоја долга по 100 kb). Во последната фаза, сите 11 сегменти од по 100 kb се асемблирани во непрекинат циркуларен DNA-молекул со должина од 1,08 Mb (**слика 21-13**).

Интересно е што, при компјутерскиот дизајн на геномот синтетизиран *de novo*, истражувачите внесле секвенци кои сликовито можат да се наречат водени жигови или бар-кодери (англ. *watermarks*), кои немаат директна функција во бактеријата, туку служат за лабораториска верификација. Имено, на повеќе места во геномот биле внесени DNA-секвенци кои, иако не подлежат на транслација, според кратенките за аминокиселините од генетскиот код, имаат значење на букви во англискиот

јазик. Тие ги „запишале“ своите 42 имиња на членовите на тимот, како и три филозофски цитати.



**Слика 21-13:** Генетска мапа на вештачкиот геном конструиран од тимот на Истражувачкиот центар Крег Вентер.

По клонирање во квасни клетки, целосно хемиски синтетизираните модифицирани геном на *M. mycoides* внимателно и технички софистицирано е издвоен од квасците и е **трансплантиран** во живи клетки-реципиенти од сродната бактерија *Mycoplasma capricolum*. Од природниот геном на овие бактерии-реципиенти, претходно биле отстранети сите гени кои кодираат рестрикциски ендонуклеази, со што било спречено овие ендогени ензими да го оштетат внесениот вештачки геном. Спротивно, рестрикциските ендонуклеази кодирани од внесениот синтетски геном постепено го разградиле геномот на *M. capricolum*. И покрај првичните проблеми при добивањето на живи бактерии, што се должело на постоење на мутации во DNA-секвенцата на вештачкиот геном, тимот успеал да ги коригира и да ја постигне целта. Процесите на репликација, транскрипција, транслација и репарација се одвивале ефективно, а со тек на бактериските делби, се разредиле и протеините синтетизирани од оригиналниот геном на реципиентот, односно преостанала само секвенцата на вештачкиот геном и протеините синтетизирани според новите генетски информации. Со овој ре-

волуционерен проект, за прв пат, компјутерски дизајнираната DNA-секвенца, е целосно хемиски синтетизирана, при што е конструиран нов хромозом кој е успешно трансплантиран во жива клетка.

Иако е многу млада интердисциплинарна гранка, перспективите на синтетичката биологија и користењето на геномскиот инженеринг се широки: од подобрување на квалитетите и потенцијалите на постојните геноми, па, сè до дизајн на сосем нови видови на живот. Веќе се одвиваат проекти за апликации на овие пристапи во создавањето на нови и многу ефективни вакцини, во биоремедиацијата и во создавањето на биогорива и други иновативни концепти со примена во медицината, фармацијата, земјоделието, екологијата и други науки.

### 21.13 Молекуларна анализа на полиморфизмите на репетитивните DNA-секвенци

Особеноста на поединецот е видлива и на ниво на секвенцата од хуманиот геном. DNA-мутациите и рекомбинациите во текот на половото размножување обезбедуваат секоја индивидуа (со исклучок на идентичните близнаци) да има единствена DNA-секвенца. Карактеризирањето на некоја индивидуа врз основа на нејзината DNA-секвенца е познато како **DNA-фингерпринтинг**.

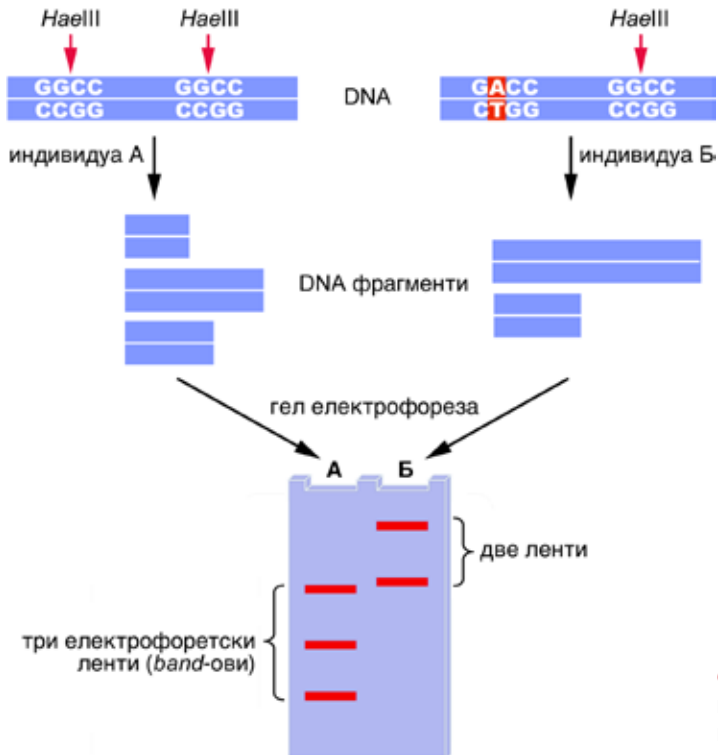
Идеален начин за разликување на некој поединец од преостанатите луѓе на Земјата, е со определување на секвенцата на неговата целосна геномска DNA, но, тоа не е сосем практично затоа што хуманиот геном содржи повеќе од 3 милијарди нуклеотидни парови. Наместо тоа, можат да се користат високо полиморфните DNA-секвенци кои имаат мултипли алели во човечката популација и се разликуваат меѓу различните поединци.

Умерено репетитивните DNA-секвенци во хромозомите се особено погодни за генетски анализи. Овие репетитивности се наследуваат од родителите. На пример, некоја индивидуа го наследува 15-тиот хромозом од својата мајка на кој има репетитивна секвенца повторена шест пати едно по друго, а кај хромозомот од таткото, истата секвенца се повторува два пати едно по друго. Овие повторувања наречени **VNTR** (англ. *variable number of tandem repeats*) или минисателити, можат лесно да се определат ако лежат меѓу две позиции за рестрикциски ензими. Ако DNA од оваа личност се пресече со определен ензим, ќе се формираат два фрагмента со различна должина: еден подолг (од мајката) и еден помал (од таткото). Фрагментите се раздвојуваат со гел електрофореза. Со неколку различни VNTR се добива уникатен профил на индивидуата (**слика 21-14**).

За DNA-фингерпринтинг тестот е потребен околу 1  $\mu\text{g}$  геномска DNA, или околу 100000 човечки клетки, но, оваа количина не е секогаш достапна. Со користењето на моќната PCR-амплификација, се добива потребното количество на амплифицирана DNA од само една клетка и тоа за само неколку часа.

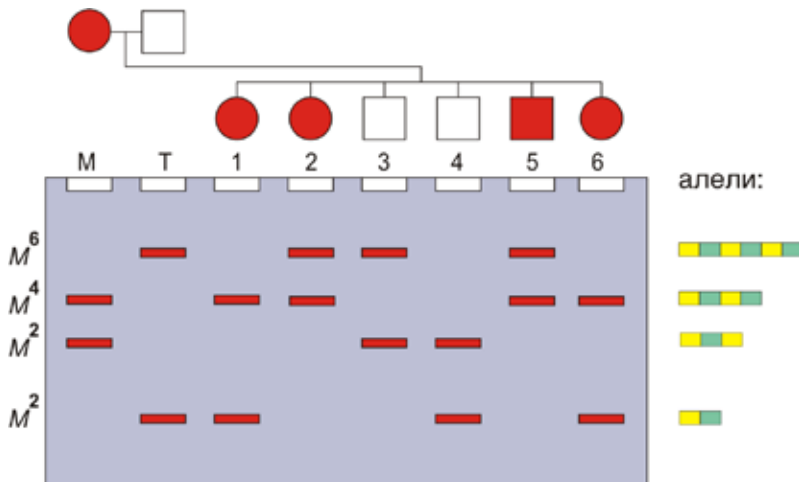
DNA-фингерпринтингот се употребува во форензиката за докажување на невиноста или вината на осомничените. Тоа може да се направи со анализа на DNA изолирана од влакно (или од друга криминалистичка трага од напаѓачот) и нејзина споредба со DNA од осомничениот. Теоретски, можно е две лица да имаат ист профил на VNTR, т.е. DNA-фингерпринт, па, доказот дека некое лице е криво не може да се заснова само врз овој маркер.





**Слика 21-14:** Користење на RFLP-полиморфизмите како генетски маркер.

Покрај минисателитите-маркери (VNTR), DNA-полиморфизмите можат да се анализираат и со други високо репетитивни DNA-секвенци какви што се **микросателитните маркери**, често означени и како **куси репетиции во тандем (STR)**, од англ.



**Слика 21-15:** Користење на микросателитите како молекуларни маркери за присуство на некое генетско заболување. Во овој пример е прикажано родословното стебло и електрофоретотограм од PCR амплификацијата на определен микросателитен локус кај едно семејство во кое се мапираат микросателитните маркери ( $M^1$ ,  $M^2$ ,  $M^4$  и  $M^6$ ). Постои голема веројатност дека микросателитниот алел со четири репетиции е врзан со доминантниот ген на заболувањето.

*short tandem repeats*). Овие генетски маркери се составени од DNA-региони во кои едно по друго се повторуваат куси секвенци, какви што се динуклеотидите 5'-CA-3'. При PCR-амплификација се користење на прајмери кои се специфични за регионите кои се наоѓаат од двете бочни страни од самиот микросателит, можат да се добијат PCR-продукти чија должина ќе зависи од бројот на репетиции. На **сликата 21-15** е прикажан пример за микросателитно мапирање. Блискоста на доминантниот алел за хипотетичното заболување, со испитуваниот микросателитен маркер ( $M^d$ ) може да има дијагностичка важност.

## DNA-фингерпринтинг во форензиката

Анализата на полиморфизмите на репетитивните DNA-секвенци има големо значење во медицината и во форензиката. Постојат и други примери за примената на DNA-фингерпринтингот. До 1992 година, кондорот бил истребен од природните живеалишта во Калифорнија, а во зоолошките градини постоеле само 52 единки. На тие конори била направена DNA-фингерпринтинг анализа за да се избере парот за парење со најголемо несовпаѓање на генските маркери. Со тоа се избрани најголеми генетски варијации со што е зголемена можноста нивното потомство да опстане. Благодареејќи на тие анализи, денес повторно се вратени голем број од овие птици во дивината.

DNA-фингерпринтинг е направен и врз илјадници растителни култури, какви што се: оризот, пченицата, пченката и грозјето, како на дивите соеви така и на културите, по што се оформени т.н. банки на семиња. Со тоа се определени нивните сличности и разлики, што би се користело во иднина при нивното натамошно одгледување.

DNA-фингерпринтинг-анализата може да се употреби и за потврда за автентичноста на некои производи какви што се на вината или квасците, на пример. Тркачките коњи кои вредат милиони долари, исто така можат прецизно да се идентифицираат со DNA-фингерпринтинг.

### 21.14 Примена на DNA-технологијата во медицината

Во последниве петнаесетина години, PCR-техниката екстензивно се применува во дијагностиката на инфекциите. Со анализата може да се докаже присуство на DNA од причинителот на инфекцијата во крвта или ткивата од инфицираниот пациент. Во примерокот се додаваат двата прајмери кои се специфични за патогената DNA, па, истата ќе се амплифицира доколку е присутна. Ваквите анализи се екстремно сензитивни бидејќи е потребен многу мал број молекули кои ја содржат целната секвенца, а притоа можат да се изберат прајмери кои специфично ќе се врзат за вирусниот или бактерискиот геном кој е предмет на испитувањето. Ова е од клучна важност при детекција на инфективни агенси кои бавно, тешко или воопшто не се размножуваат во лабораториски услови, какви што се повеќе вируси, и некои бактерии (*Mycobacterium tuberculosis*, на пример, за чие култивирање често пати се потребни неколку седмици).

Со PCR-анализата, детекцијата на испитуваниот инфективен агенс може да се направи многу побрзо, поспецифично и посензитивно, во однос на класичните микробиолошки техники.

Конечно, со определувањето на прецизниот генетски дефект кај различни заболувања, какви што се српестата анемија и цистичната фиброза, овозможено е брзите и прецизни PCR-базирани анализи да станат применливи во клиничката лабораториска дијагностика на овие заболувања.

## Генска терапија

Молекуларно-генетскиот пристап за лекување на некои вродени, инфективни, малигни, кардиоваскуларни заболувања и други, со кој директно или индиректно се врши генска манипулација со цел да се корегира определен генски дефект, да се зголеми имунолошкиот одговор или со друг генски-посредуван механизам да се лекува заболениот организам се означува како **генска терапија**.

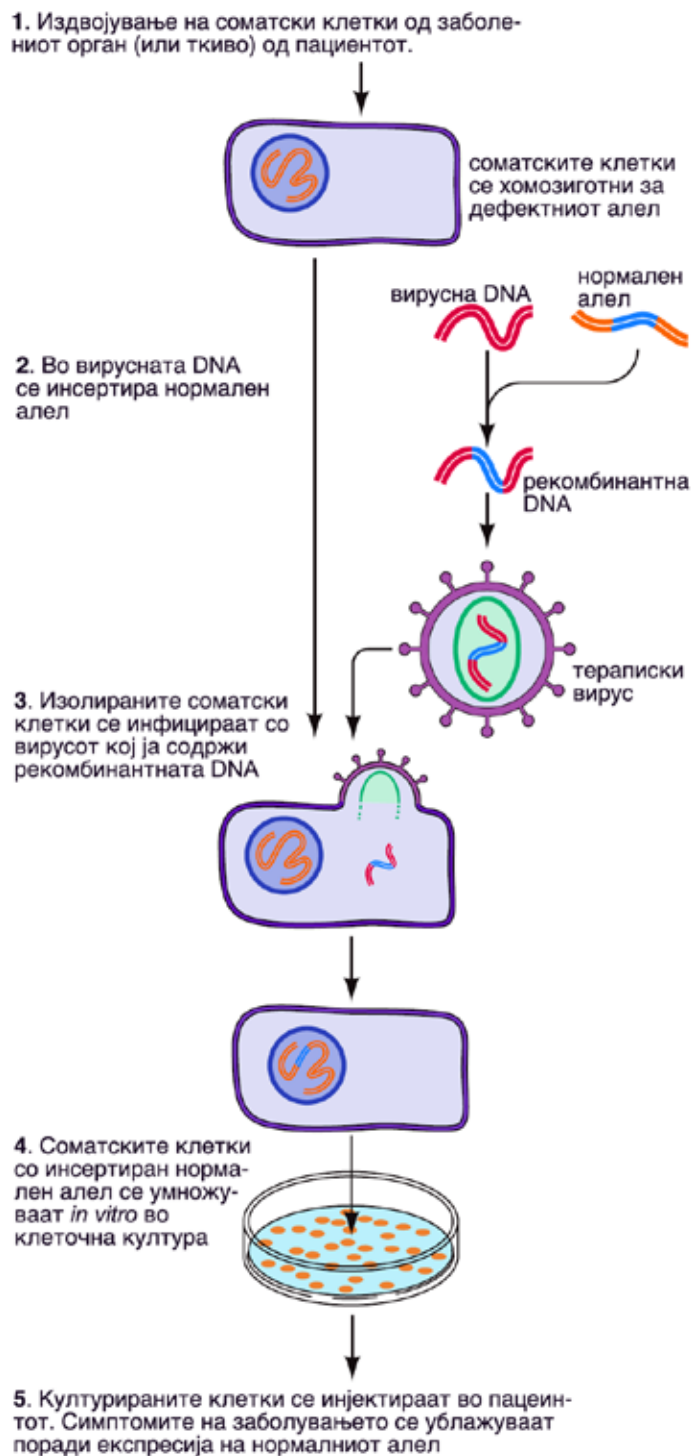
Често пати со генската терапија се прави обид дефектниот алел на некој ген, чија функција е нарушена поради мутација, на пример, да се надомести со нормален, див тип на алелот. Спротивно, може да се врши и потиснување на прекумерната експресија на некој ген. Во секој случај, терапискиот (корективен) ген и други елементи (какви што се соодветни промотори, засилувачи и други секвенци) се вметнуваат во вирус или некој друг вектор со кој може да се внесат во заболениите клетки, ткива и органи кај заболениот лице или експерименталното животно (**слика 21-16**).

Најдобро е истражен т.н. пристап *ex vivo* при кој заболениите клетки се издвојуваат од пациентот или од животното, а по внесувањето на корективниот ген, повторно се враќаат во организмот. Таков нов тип на молекуларна медицина е применет во лекувањето на некои форми на хемофилија, како и кај херeditарниот недостаток на аденозин деаминазата (имунодефициентно заболување). Кај некои болни се забележени драматични подобрувања по терапијата.

Другиот е т.н. пристап *in vivo* и е применет кај некои форми на канцер, како кај белодробниот карцином, каде директно во туморот е внесен вирусот со корективниот див тип на тумор-супресорски ген.

Генската терапија е сè уште во прелиминарна фаза, но, ветува голем успех во релативно скора иднина. Сепак, клиничките испитувања се релативно ретки, поради опасноста од несакани последици и строгите регулативи за користење на генската манипулација, особено со вирусни вектори, во хумани организми во повеќето земји.

Од друга страна, голем број истражувачки лаборатории експериментираат со култури на клетки во ин витро услови, како и со соодветни животински организми како предклинички модели за потенцијална генска терапија. Значителен број од истражувачките проекти се насочени кон подобрување на постоечките и пронаоѓање на нови вектори и механизми за доставување на тераписките генски конструкти до целните клетки или ткива во заболениите организми. Во иднина, потенцијална примена како вектори за внесување на корективните гени имаат и наночестичките програмирани селективно да ги препознаваат целните клетки.



**Слика 21-16:** Генска терапија Шематски е прикажан пристапот *ex vivo* со кој се надоместува дефектниот алел со нормален.



# ПРИМЕНА НА ГЕНЕТСКИОТ ИНЖЕНЕРИНГ ВО БИОТЕХНОЛОГИЈАТА

## Глава 22

Развојот на методите за манипулација со DNA овозможил вршење на експерименти со кои се откриени некои спектакуларни податоци за животот на молекуларно ниво. Но, покрај базичните истражувања, методите на рекомбинантната DNA се употребуваат и во комерцијални цели.

**Биотехнологијата** е научна дисциплина која ја проучува и развива употребата на живи клетки во производство на материи корисни за човекот, какви што се храната, лековите и хемикалиите. Спротивно на распространетото мислење, оваа применета област се користи уште од дамнешни времиња. На пример, квасецот се користел во производство на пиво и вино уште пред 8000 години, а употребата на бактериските култури за добивање на сирење и јогурт се применува повеќе векови. Долго време луѓето не биле свесни за клеточната основа и биохемиските процеси кои се во основата на производството, додека молекуларните аспекти на овие процеси почнале да се разјаснуваат дури во последниве неколку децении.

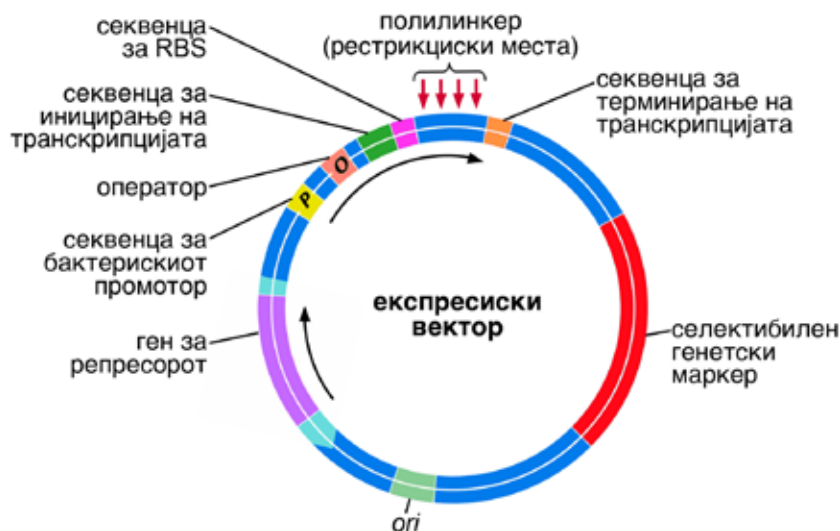
Благодарејќи на Луј Пастер, пред околу еден век, станало јасно дека некои бактерии, квасци и други микроорганизми, можат да се употребуваат како биолошки трансформатори за добивање на определени производи. Откриетието на Флеминг (Alexander Fleming) дека мувлата од родот *Penicillium* го синтетизира антибиотикот пеницилин, довело до брза комерцијализација на индустриското производство на антибиотици и други фармацевтски корисни соединенија. Денес, микроорганизмите се култивираат во огромни количини за производството на индустрискиот алкохол, глицерол, бутерна и лимонска киселина, кои се користат како суровини во индустријата или, пак, се крајни производи.

Во минатото, биотехнолошкото производство било ограничено само на оние производи кои биле веќе природно создавани од микроорганизмите. Подоцна, некои соединенија, какви што се хормоните и определени ензими, морале да се екстрахира-

ат од вишите организми користејќи сложени и ниско ефективни постапки. Сето ова се променило со воведувањето на генскиот инженеринг. Технологијата за внесување на речиси кој било ген во соодветна бактерија или квасна габа, како и методите за генска индукција, овозможуваат создавање на големи количини од бараниот производ во клеточни култури или ферментори. Од низа причини, микроорганизмите се преферираат за користење во биотехнолошки цели. Но, и растенијата и животните се користат сè повеќе за произведување на протеински продукти. Животинските или растителните организми кои се изменети со техниките на генетскиот инженеринг се нарекуваат **генетски модифицирани организми (ГМО)**. Поипрецизно, доколку при таквата модификација е извршено внесување на туѓи гени во ембрионскиот развој, тие се нарекуваат и **трансгенични организми**.

## 22.1 Синтеза на еукариотски протеини со клонирање во експресиски вектори

Внесувањето на некој еукариотски ген во типичен плазмид и последователната трансфекција во *E. coli*, често не доведува до синтеза на протеинскиот продукт на генот или пак, таа се врши во незначителен обем. Причината за тоа е што кај еукариотските гени не постои бактериски промотор кој е неопходен за врзување на RNA-полимеразата од *E. coli*, ниту секвенци за терминација на транскрипцијата или специјални секвенци на mRNA кои се неопходни за врзување со рибозомите. Сиве овие фактори се неопходни за успешна експресија на еукариотскиот ген и за синтеза на неговиот продукт во бактериската клетка.



**Слика 22-1:** Приказ на структурата на експресиски плазмид конструиран за експресија на туѓи протеини во бактериски клетки. Спротиводно (во 5'-насока) од клонирачките места се лоцирани секвенците на промоторот, операторот, како и секвенците за иницирање на транскрипцијата и за врзување на рибозомот (RBS). Низводно (во 3'-насока) од клонирачките места се наоѓа секвенцата за терминарање на транскрипцијата. Покрај нив, во плазмидот се наоѓа и ген кој го кодира репресорниот протеин, извор на репликација (*ori*) и соодветен ген-маркер за селекција на трансформираниите бактерии.



За надминување на овие проблеми, создадени се **експресиски вектори** кои ги имаат сите потребни секвенци за експримирање на туѓите еукариотски гени во бактеријски клетки, што е поефтино и поедноставно (**слика 22-1**).

Експресијата на туѓите (егзогени) протеин-кодирачки гени може да се врши и кај еукариотски клетки. Експресиските вектори кои се користат за таа цел, покрај наведените секвенци кои се неопходни за експресија на еукариотски гени, содржат дополнителна полиаденилатна секвенца (*poly-A*), места за врзување на транскрипцискиот фактор и засилувачи (енхенсери). Кога овие секвенци ќе се вметнат на соодветни места во векторот, трансфектираниот ген може да се експримира во подобни еукариотски клетки.

Експресискиот вектор може да се модифицира на неколку начини. На пример, може да се инсертира и индуцирачки промотор кој реагира на специфична хормонска стимулација, па, транскрипцијата на туѓиот ген ќе се индуцира само при присуство на соодветниот хормон. Исто така може да се додаде и засилувач кој реагира на хормонската стимулација, со цел добивање на максимално ниво на транскрипција на генот и протеинската синтеза, што е од голема важност при производството во фармацевтската индустрија.

Доколку е неопходна локализирана експресија само во определено ткиво и во определено време, може да се користи **промотор кој е специфичен за ткивото**.

На експресискиот вектор можат да му се додадат и специфични **сигнални секвенци** за да се насочи протеинскиот продукт кон определена органела (заради посттранслациско модифицирање) или истиот да се лачи од клетката во форма на секреторни гранули.

## 22.2 Синтеза на протеини во фармацевтската индустрија

Со помош на биотехнологијата се произведуваат голем број на фармацевтски препарати, а стотици се во различни фази на индустриски развој. Инсулинот, на пример, е полипептиден хормон кој со децении се издвојувал од говедскиот панкреас и се користел во терапијата на дијабетесот. Но, за добивање на доволно големи количества на пречистен инсулин била потребна огромна маса на панкреасно ткиво, што, со оглед на тенденцијата на постојано зголемување на бројот на лица заболени од дијабетес во развиените земји, довело до неприфатливо висока цена на крајниот производ. Потребата од комплицирани препаративни техники за пречистување на инсулинот, како и зголемувањето на стандардите за квалитет со текот на времето, исто така, допринеле природно екстрахираниот инсулин да стане скап и недоволно достапен за сите заболени луѓе. Но, најважниот проблем со таквиот инсулин бил што и малите разлики во аминокиселинската секвенца меѓу човечкиот и говедскиот инсулин, предизвикувале имунолошки реакции кај некои болни, со што се намалувала и неговата терапевска ефективност. Користењето на свињскиот инсулин како алтернативен извор доведувал до привремено подобрување на таквата состојба, но, често пати, повторно се развивала имунолошка резистентност. Покрај тоа, секогаш постоела опасност од пренесување на патогени микроорганизми со препаратите издвоени од животни. Со клонирање на гените за двете полипептидни вериги (од кои е составен човечкиот инсулин) во плазмидни експресиски вектори, овозможено е

добивање на теоретски неограничени количества на исклучително чист хуман инсулин, без опасност од појава на имунолошки реакции или присуство на инфективни агенси. Во денешно време, рекомбинантниот инсулин целосно го потиснал користењето на природен инсулин екстрахиран од животински панкреас, па, тоа е еден од примерите во кои продуктите од рекомбинантниот генетски инженеринг се користат најекстензивно во медицината.

Повеќе други протеински продукти кои се користат во тераписки цели се произведуваат со рекомбинантна DNA-технологија. Почесто користени се:

- **еритропоетин**, кој се користи во терапијата на анемиите кај пациентите на хронична бубрежна дијализа и кај болните под терапија со цитостатици;
- **фактор за стимулирање на колониите на гранулоцити и макрофаги**, кој се користи за стимулирање на продукцијата на леукоцити кај пациентите кои примаат цитостатска терапија, како и кај заболените од СИДА;
- **коагулациски фактор VIII**, се користи во третманот на хемофилија А;
- **фактор на раст**, се користи во лекување на недостатокот од овој хормон;
- **вакцини** за некои инфективни агенси (хепатитис В и С, на пример), со експресија на определени протеински антигени во експресиски вектори.

### 22.3 Рекомбинантна DNA-технологија во современото земјоделие

Традициите на земјоделството, односно селективното култивирањето растенија и одгледувањето животни кои датираат од пред 8000 години, всушност ги содржи најстарите примери за емпирска примена на биотехнологијата. Низ вековите, луѓето научиле да ги користат растенијата и домашните животни за своите потреби. Со емпирска селекција и одгледување на посакуваните и раси на корисни растенија и домашни животни, соодветно, кои се појавиле во природата поради мутациски варијации, добиени се организми со посакуваните карактеристики, какви што се висок принос на млеко, отпорност кон болести и други.

Со развојот на генетиката во текот на последниве 100 години, започнало и нејзиното научно користење во земјоделството. Наспроти некои спектакуларни успеси, какво што е одгледувањето на т.н. супержито, или пченка, повеќето други селектирани вкрстувања резултирале со неуспеси. Многу од посакуваните својства се резултат на комплексни генски интеракции, па, тешко е да се предвидат резултатите од вкрстувањата. При половото размножување, распоредот на неврзаните гени многу брзо се менува со генетска рекомбинација. Покрај тоа, при одгледувањето на растенијата со традиционалното земјоделство потребно е и долго време за развивање на новите генерации на соевите со посакувани својства.

Во однос на традиционалните методи на одгледување, модерната технологија на рекомбинантна DNA, овозможува неколку важни предности:

- избор на специфични гени со што целиот процес е многу попрецизен, па, има помалку шанси за неуспех;
- внесување на кој било ген од кој било организам во растенијата или животните. Оваа можност, комбинирана со техниките на мутагенеза, отвора речиси неограничени можности за добивање на нови својства;
- експериментирање во култури на клетки во лабораториски услови, а потоа ре-

генерирање на цели растенија од нив, со што значително се скусува времето потребно за одгледување на растенијата.

Биотехнологијата има широка примена во земјоделството, тргнувајќи од зголемување на хранливата вредност на растенијата, па, сè до употребата на животните како протеински фабрики. Светската здравствена организација предвидува создавање на плодови (банани, на пример), кои се генетски инженерирани да експримираат определени антигени. Се очекува ваквите плодови да имаат улога на вакцини кои се многу постабилни и полесни за транспорт до некои тешко достапни локации (џунгли) отколку традиционалните форми на вакцини.

### Експримирање на гени кај трансгенични животни

Како што е претходно објаснето, определен гени од интерес и соодветен промотор можат да се внесат во ембрионските клетки на животните, со што може да се создаде трансгеничен организам во кој се експримира внесениот ген.

Генските продукти можат да имаат фармацевтско значење. На пример, определен тип на емфизем кај луѓето е резултат на оштетување на белите дробови поради недостаток на потребните количини на протеинот наречен  $\alpha$ -1 антитрипсин ( $\alpha$ -1 АТ). Овој протеин ја инхибира еластазата, ензим кој ги разложува сврзните ткива. Оттаму, користењето на специфичен инхибитор на еластазата може да ги олесни симптомите на ова заболување. Поради тоа што од човечкиот серум можат да се изолираат премногу мали количини на  $\alpha$ -1 АТ, извршено е клонирање на генот кој го кодира овој протеин за да се задоволи потребата од терапевтски количества. Накусо, генот е внесен во јајце-клетките од овца, низводно (во 3'-насока) од промоторот за лактоглобулин (млечен протеин). Како резултат на тоа, биле создадени големи количини на протеинот  $\alpha$ -1 АТ кои се наоѓале во млекото од овците, од каде лесно бил издвојуван во индустриски количества. Трансгеничните кози, овци и крави денес можат се користат за производство на корисни фармацевтски производи, и тоа директно во млекото.

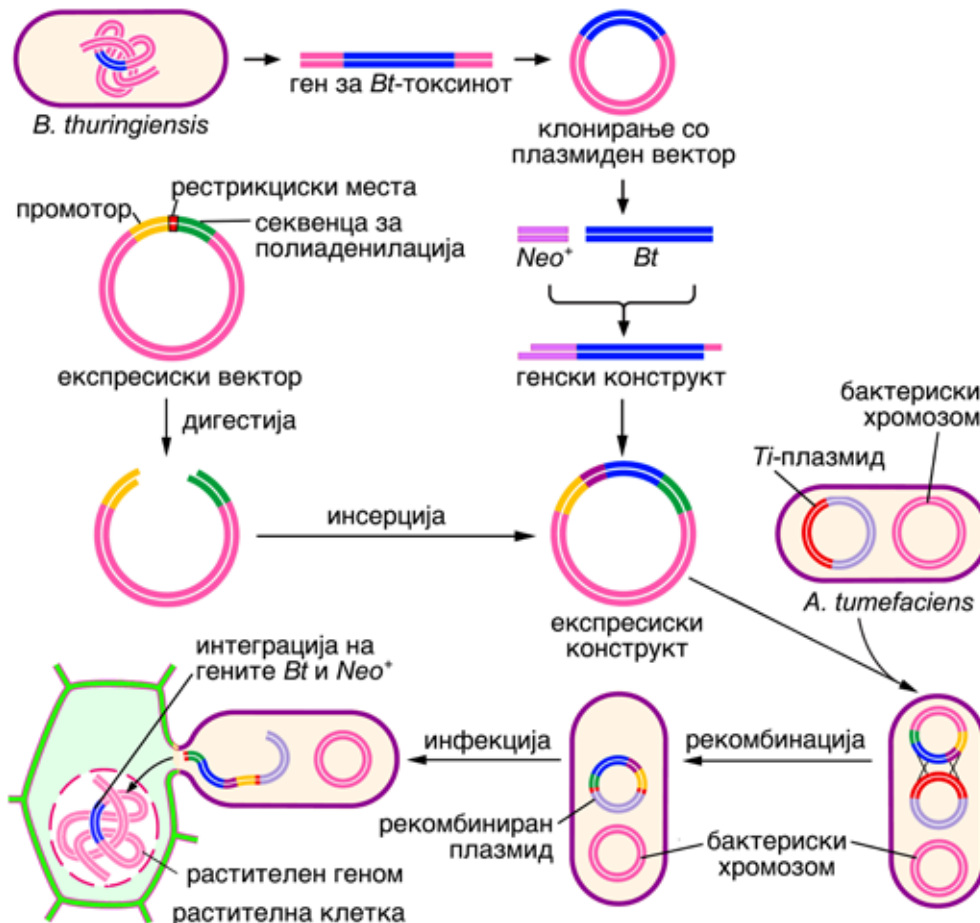
### Примена на трансгеничните растенија во земјоделието

Растенијата кои се култивираат во земјоделието се подложни на инфекции од вируси, бактерии, габи, но, најголемата опасност за нив сепак претставуваат хербиворните инсекти. Од тие причини, со децении биле користени различни хемиски соединенија-инсектициди, но, повеќето вакви препарати, како, на пример, органофосфатите, се релативно неспецифични и ги убиваат и корисните инсекти во екосистемот, а некои имаат и штетно влијание врз здравјето на човекот. По нанесувањето на површината на растенијата, инсектицидите можат да бидат однесени со ветерот и на други места каде што предизвикуваат непредвидливи ефекти. Покрај токсичниот ефект, докажано е дека некои од долго користените инсектициди се и канцерогени.

Во поново време, воведени се голем број на генетски модификации со кои се надминува дел од проблемите во современото земјоделе. Оттаму, не зачудува што рекомбинантната DNA-технологија има големо влијание врз производството на храна и производи од растително потекло.

## Растенија кои создаваат инсектициди

Некои бактерии синтетизираат протеини кои ги убиваат ларвите на инсектите кои ги јадат. На пример, некои соеви од *Bacillus thuringiensis* синтетизираат протеин, наречен **токсин Bt**, кој е летален за ларвите од инсектите доколку ги изедат овие бактерии. Интересно е што токсичноста на овој протеин е десетици илјади пати поголема од таа на комерцијалните инсектициди, а, покрај тоа, спонтано се разградува во околината и не е токсичен за луѓето и домашните животни. Набргу по откривањето, почнато е комерцијално производство на суви екстракти од *B. thuringiensis* кои биле користени за запрашување на земјоделските култури и рекламирани како безбеден инсектициден препарат, но, нивното главно ограничување било тоа што морале одново да се нанесуваат врз растенијата секоја година. Потрајно решение би било растенијата генетски да се модифицираат со цел самите да си го синтетизираат Bt-токсинот. Во пионерските експерименти кон крајот на 1980-тите години, Век



**Слика 22-2:** Клонирање на генот за синтеза на токсинот Bt од *B. thuringiensis* и негова трансфекција во клетките растителниот организам преку *A. tumefaciens*. Neo<sup>+</sup> е маркер за селекција и обезбедува резистентност кон антибиотиците неомицин и канамицин, кои се токсични за растителните клетки.

(Mark Vaeck) со соработниците извршиле успешно внесување на генот за *Bt*-токсинот во култури на растителни клетки од тутун. Генот бил претходно изолиран од *B. thuringiensis* и клониран од друга група истражувачи. Најпрво, генот за *Bt*-токсинот бил клониран во плазмиден вектор заедно со генот *Neo*<sup>+</sup> за резистенција кон антибиотиот неомидин, а потоа ваквата рекомбинантна DNA била умножена во *E. coli* (слика 22-2). Овој генски конструкт бил вметнат во експресиски вектор кој содржел и растителни промотори, терминарачки секвенци и сигнални секвенци за полиаденилација.

Потоа, била извршена трансформација на *A. tumefaciens* со ваквиот експресиски вектор при што неговите DNA-молекули се рекомбинирале со тие на Ti-плазмидот присутен во бактеријата. Тутуновите клетки биле инфицирани во *in vitro* услови со генетски модифицираниот *A. tumefaciens*. Со третирање на растителните култури со антибиотици, била извршена селекција само на успешно трансфектираните клетки во кои се интегрирала рекомбинантната DNA која ги содржи гените: *Neo*<sup>+</sup> и *Bt*. По израснувањето, возрасните растенија од овој трансгеничен тутун биле отпорни кон инсекти во природни услови.

Досега се создадени трансгенични домати, пченка, соја, компири, памук и други растенија отпорни кон инсектите од кои претходно биле напаѓани. Соевите со вметнат *Bt*-ген се користат екстензивно во земјоделието ширум светот. Само во САД, околу 85% од сите посеви на пченка и околу 90% од сојата се генетски инженерирани.

## Отпорност на растенијата кон вирусни инфекции

Со техниките на генетски инженеринг постигната е резистенција кон определени вируси кои се патогени за определени растителни организми кои имаат економска важност користејќи форма на генетски вакцини. Имено, со вметнување на гени кои кодираат селектирани вирусни протеини, растението создава одбрамбени механизми кои го штитат од природните патогени вируси со што се намалува потребата од некои хемиски пестициди.

## Растенија резистентни кон хербициди

Плевелот е паразитско растение кое претставува еден од најголемите проблеми во земјоделството. За намалување на штетите, со години е користен глифозатот - ефективен хербицид кој дејствува само врз растенијата, инхибирајќи го ензимскиот ситем кој е одговорен за синтеза на аминокиселините во хлоропластите. Иако глифозатот е извонреден хербицид, кој отстранува 76 од 78 најраспространети видови плевели во светот, тој ги уништува и културните растенија, поради што мора да се користи крајно внимателно. Откриени се бактерии кои имаат ензим за разложување на глифозатот, па, од нив е издвоен и клониран генот за синтеза на овој ензим. Генот е внесен во растителните клетки, при што е додадена и DNA-секвенца за насочување на протеинот кон хлоропластите. Овој рекомбинантен ген бил внесен кај пченката, памукот и сојата со што се создале генетски модифицирани организми отпорни кон глифосфат.

## Житни растенија со подобрени хранливи карактеристики

За одржување на здравјето на човекот неопходна е правилна исхрана која вклучува и витамини. Дефицитот на определени витамини може да предизвика различни здравствени нарушувања. На пример, поради недостаток на витаминот А, околу 400 милиони луѓе во светот се подложни на инфекции и слепило. Во организмот, витаминот А се синтетизира од провитаминот  $\beta$ -каротин кој се внесува со храната. Една од причините за дефицитот на витаминот А е што голем дел од исхраната на човештвото (особено во Кина) се базира само врз житните растенија кои не го содржат овој  $\beta$ -каротинот, туку само неговиот прекурзорен молекул. Некои организми, како, на пример, бактериите од родот *Erwinia*, поседуваат ензими со кои ги конвертираат тие прекурзорни молекули во  $\beta$ -каротин. Изолирани се неколку гени одговорни за  $\beta$ -каротинската синтеза и еден од нив, заедно со соодветна промоторска секвенца, бил внесен во ориз со помош на *Ti* плазмидот. Со тоа е создаден трансгеничен ориз со карактеристична жолта боја поради присуството на  $\beta$ -каротинот. Интересно е што мали количества од овој генетски модифициран ориз се доволни за задоволување на потребите од провитаминот  $\beta$ -каротин кај еден човек.

## 22.4 Јавното мислење за биотехнологијата

Паралелно со поинтензивното користење на генетски модифицирани организми (ГМО) за исхрана, расте и загриженоста која се изразува со јавното мислење, поради што во некои земји, веќе постои и забрана или ограничување на продажбата на ГМО. Загриженоста е предизвикана од повеќе аспекти.

Определени групи сметаат дека генетската манипулација е вештачко мешање во природните процеси (па дури и дека е неприфатлива од религиски аспект) што е во доменот на филозофските дебати. Спротивно, застапниците на биотехнологијата постојано нагласуваат дека и сите поважни растителни култури кои не се модифицирани со генетски инженеринг можат да се сметаат за неприродни, бидејќи се добиени со вештачко вкрстување на растенијата во неприродна средина (плантажи) и со човеково влијание (селекција) во текот на неколку илјади години. Со DNA-технологијата, тоа само преминало на ново, посоефицицирано ниво.

Кај некои критичари постои страв дека генетски модифицираната храна не е безбедна за употреба во хуманата популација. Иако меѓу овие автори постојат и истражувачи чии сознанија се објавени во научни трудови, дел од резултатите се оспорени поради несоодветната методологија или погрешната статистичка обработка. Оттаму, недостасуваат убедливи докази за директни негативни ефекти врз човековото здравје при консумирање на генетски модифицираните растенија кои се одобрени од соодветни институции. На пример, **Администрацијата за храна и лекови** во САД (FDA од англ. Food and drug administration), која е меѓу најстрогите водечки институции од таков вид во Светот, ги има одобрено сите генетски модифицирани растенија кои легално се култивираат во агрономската индустрија во САД и во земјите во кои се извезуваат. Имајќи ги предвид строгите критериуми на оваа институција и бројните студии врз чии резултати се засноваат нивните ставови, не е

претерано да се заклучи дека стравот од користењето на генетски модифицираната храна е, веројатно, претеран.

Од друга страна, постои оправдано сомнение дека ГМО не се целосно безбедни за природната околина. Ваквата загриженост произлегува од потенцијалните ефекти врз околината и можноста за неконтролирано преминување на гените од културираните, во други растенија. Ако, на пример, генот одговорен за резистентноста кон хербицидите несакано се пренесе во плевелот, таквиот плевел би можел да опстане и на површини запрашени со хербициди.

Ефектите на генската модификација на растението во нова средина, можно-то влијание врз биодиверзитетот како и потенцијалот да предизвика еколошко нарушување се реални, барем врз основа на некои добиени сознанија од досегашната пракса. Особено загрижува можноста неконтролираното размножување на ГМО во природните екосистеми, бидејќи тие се ослободени од определени природни непријатели и други ограничувачки механизми. При употребата на трансгенични растенија, неопходни се претходни интензивни испитувања во природни услови, пред да се премине на ниво масовно користење во индустриски размери. И покрај тоа, поради комплексноста на биолошкиот свет, невозможно е да се предвидат сите можни ефекти и нуспојави.

Сепак, поради големите бенефиции кои DNA-технологијата ги носи на земјоделството, постои тенденција за натамошно продолжување на нејзината употреба, но, со сè построги мерки на претпазливост. Покрај тоа, во некои земји постои законска обврска од обележување на етикетата на прехранбениот производ во однос на тоа дали е добиен од ГМО.

Посебна категорија на контроверзии постои околу генетското манипулирање со животинските организми и, особено, околу примената на генетскиот инженеринг во хуманата популација (за генска терапија, на пример). Обемот на аргументи за и против користењето се предмет на дебати и во научните кругови, но, и само нивното набројување го надминува опсегот на овој текст.

Јавноста треба да прифати дека пошироката примена на молекуларното клонирање е уште една од најмоќните алатки откриени од човекот, која, како и сите досега користени (огнот, ножот, атомската енергија и други) може да допринесе за благосостојба, или пак да се злоупотреби.





# ПРИМЕНА НА БИОИНФОРМАТИКАТА ВО МОЛЕКУЛАРНАТА БИОЛОГИЈА И ГЕНЕТИКАТА

## Глава 23

**Б**иоинформатиката е пропулзивна научна дисциплина која е резултат од здружениот пристап на биологијата, математиката и на информатиката кон проучувањето на биолошките информации. Главната улога на биоинформатиката анализа е „трансформирање“ на информациите од анализите на биолошките примероци, во резултат кој е разбирлив и корисен за истражувачите. За тие цели се користат компјутерски програми, развиени врз основа на математички моделирања и алгоритми.

Биоинформатичкиот пристап е неопходен за да може да се анализира енормното количество податоци кои се добиваат при секвенционирањето на DNA од геномите на животните, растенијата и на микроорганизмите. Структурните анализи врз макромолекулите, каква што е кристалографијата на протеини, на пример, исто така можат да резултираат со огромен број податоци кои мораат компјутерски да се обработат за да се добие корисен резултат.

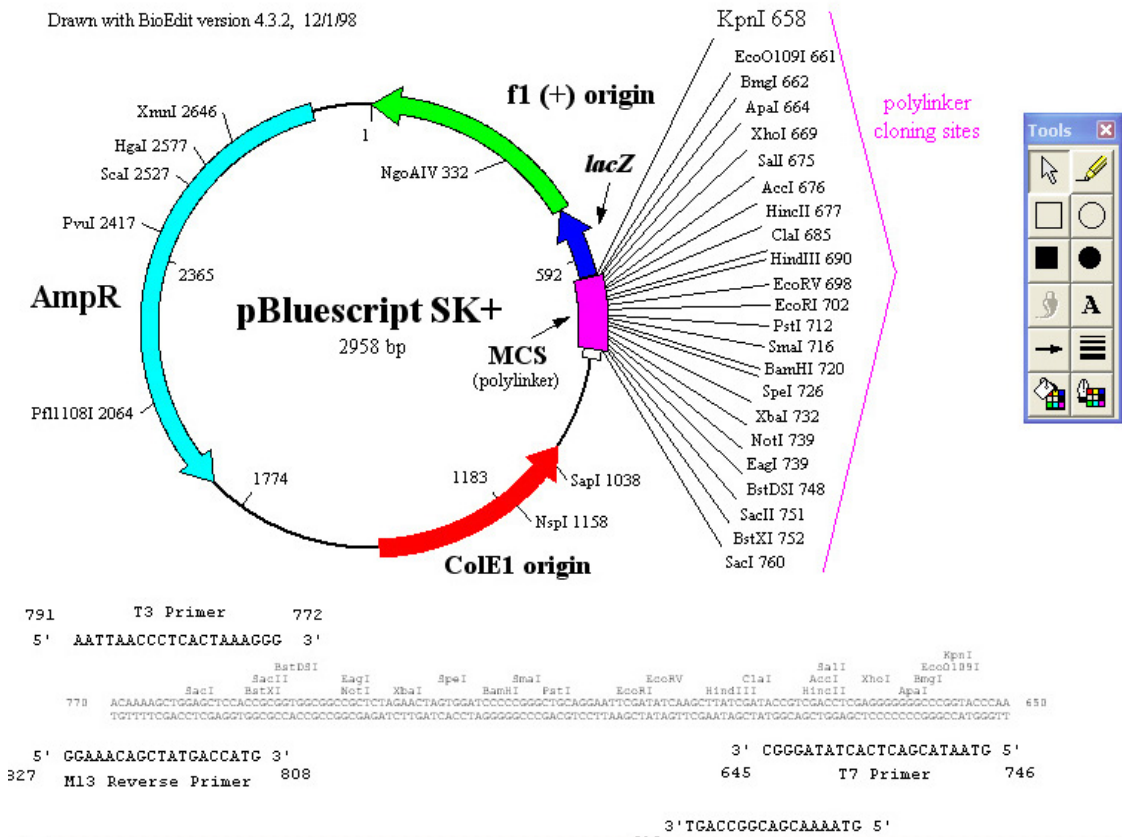
По дефиниција, биоинформатичката анализа ги опфаќа приемот на податоци од биолошките експерименти какви што се нуклеотидните и аминокиселинските секвенци во DNA и протеините, соодветно, структурните, биохемиските и други податоци, нивната компјутерска обработка, статистичката анализа, пребарувањето и сторнирањето во бази на податоци.

Биоинформатиката користи и компјутерско моделирање преку изнаоѓање на алгоритми за опишување, предикција и анализа на биолошките структури и процеси. Се анализираат и филогенетските и еволуциските аспекти, а биоинформатичкиот пристап се користи и во еколошките и во популациските студии. Покрај тоа, во биоинформатиката се вклучуваат и базите на литературни податоци, како и компјутерските методи за нивно категоризирање, пристап, пребарување, поставување на интернет и слично.

Но, во потесна смисла, особено во последните неколку години, биоинформатиката се изедначува со компјутерска анализа на макромолекулите. Поради тоа што биоинформатичките истражувања се вршат компјутерски, понекогаш се означуваат и како *in silico* анализи. Во рамките на овој текст ќе бидат прикажани само аспектите на биоинформатиката кои се однесуваат на определени анализи на молекуларно-биолошки податоци.

### 23.1 Обработка на DNA-базирани податоци

Компјутерските програми можат да бидат корисни алатки за разни молекуларно-биолошки задачи, каков што е дизајнот на теоретски најоптимален пар прајмери за PCR, графичко прикажување на структурата на плазмидите и на други вектори и слични базични активности, кои се извонредно макотрпни и долготрајни при мануелна работа (слика 23-1). На располагање се бесплатни (за академска употреба) и комерцијални **компјутерски програми за дизајнирање на прајмери** (иницијални олигонуклеотиди за PCR) кои ги користат формулите за пресметување на Tm-



**Слика 23-1:** Изгледот на екранот при прикажување на комерцијален плазмид. Означени се позициите за рестрикциските ензими, како и дел од двоверижната DNA од местото за инсерција со олигонуклеотидните прајмери.

вредностите, како и предикција на евентуалната секундарна структура и меѓусебно анилирање на олигонуклеотидите. Овие програми заменуваат голем број часови рачно пресметување, но, нудат и напредни опции кои се речиси невозможни при рачните пресметки. Графичкиот приказ на структурата на векторите со означување на позициите за рестрикциски ендонуклеази е корисен за планирање на експериментите, за објавување во научни публикации, како и во едукативни цели.

## Асемблирање на DNA-секвенци

Податоците од DNA-секвенционирање на подолги региони во геномските проекти резултира со голем број фрагменти кои делумно се преклопуваат. Воспоставувањето на континуирана нуклеотидна низа (*contig*) составена од два или повеќе е линеарни DNA-фрагменти, врз основа на преклопување на секвенците, може да се направи брзо и прецизно со соодветни компјутерски програми. Овој процес се означува како **асемблирање** (склопување). Иако постапката е релативно едноставна, проблеми се јавуваат кога на регионите од двата фрагмента кои се преклопуваат се присутни репетитивни секвенци (на пример: 5'-ТАТАТАТАТА-3'). Во тие случаи е невозможно да се утврди вистинската должина на репетитивниот регион, па, е неопходно вршење нови експерименти со кои тие региони ќе се секвенционираат во непрекината низа.

## Барање позиции за рестрикциски ендонуклеази во DNA-секвенци

Постоењето на една или повеќе позиции за рестрикциски ендонуклеази во определена DNA-секвенца може да се анализира брзо и прецизно со соодветни компјутерски програми. Тоа е важно при дизајнот на многу експерименти, како што е при молекуларното клонирање, детекција на мутации и други анализи.

На располагање се повеќе специјализирани програми кои, за академска и лична употреба, можат да се снимат или да се користат директно (*on-line*) на интернет, каков што е WebCutter. Постојат и софтверски пакети кои имаат опција за рестрикциска дигестија на испитуваната секвенца, при што можат да се избираат поединечните ендонуклеази, како и нивната комбинација. Некои од нив се BioEdit, DNA Club и многу други кои, под определени услови и правила, можат да се повлечат од интернет, да се инсталираат на персонален компјутер и да се користат во истражувачки и едукативни цели. Постојат и комерцијални компјутерски програми со слични, но, понапредни и пософистицирани опции.

## Барање на протеин-кодирачки гени

Наместо директната анализа (секвенционирање) на аминокиселинскиот редослед во протеините, поради релативната едноставност и низа технички предности, речиси редовно се врши секвенционирање на соодветниот кодирачки DNA-регион. Со оваа индиректна анализа, од DNA-секвенцата се врши предикција на редоследот на аминокиселините во кодираниот протеин. Како што е претходно објаснето, во се-

кој регион на двоверижна DNA, теоретски постојат вкупно шест рамки на читање на кодот за протеини, по три за секоја верига, но, само мал процент од DNA-секвенцата на геномот вистински кодира протеини. Според статистичките пресметки кај еукариотските геноми, просечно на секои двесте кодони се јавува по еден стоп-кодон. Само регионите кај кои стоп-кодонот се јавува значително поретко се кандидати за гени, па, алгоритмите вградени во компјутерските програми за предикција на гени ги пребаруваат тие региони кои покрај таа, но, мора да имаат и други карактеристики. Една од нив е да започнуваат со старт-кодон (ATG) и да завршуваат со терминациски (стоп-) кодон (TAA, TAG или TGA), т.е. да се отворени рамки на читање, по дефиниција. Во зависност од поставките во софтверот, пребарувањето се врши на тој начин што предвид се земаат само подолги отворени рамки на читање, обично со 100 или повеќе кодони.

Компјутерската предикција на гените кои кодираат протеини е многу покомплицирани кај еукариотските геноми, каде што кодирачките региони се „испрекинати“ со голем број долги некодирачки секвенци-интрони. Кај мултицелуларните организми мора да се бараат и други карактеристични секвенци во гените-кандидати, какви што се регулаторните региони, сигналните гранични секвенци меѓу егзоните и интроните и други. Пребарувањето на долгите DNA-секвенци за постоење на рамки на читање се прави со посебен софтвер кој користи некој од постојните алгоритми. Еден од често користените програми за таа цел е ORF Finder.

## 23.2 Барање на сличности меѓу секвенци

Барањето на сличности меѓу две или повеќе испитувани нуклеотидни или аминокиселински секвенци е најекстензивно користената анализа во биоинформатиката. Со поимот идентичност се изразува степенот на сличност меѓу секвенците кои се споредуваат. Хомологните секвенци се слични поради заедничкиот анцестор и можат да се најдат кај филогенетски мошне оддалечени организми.

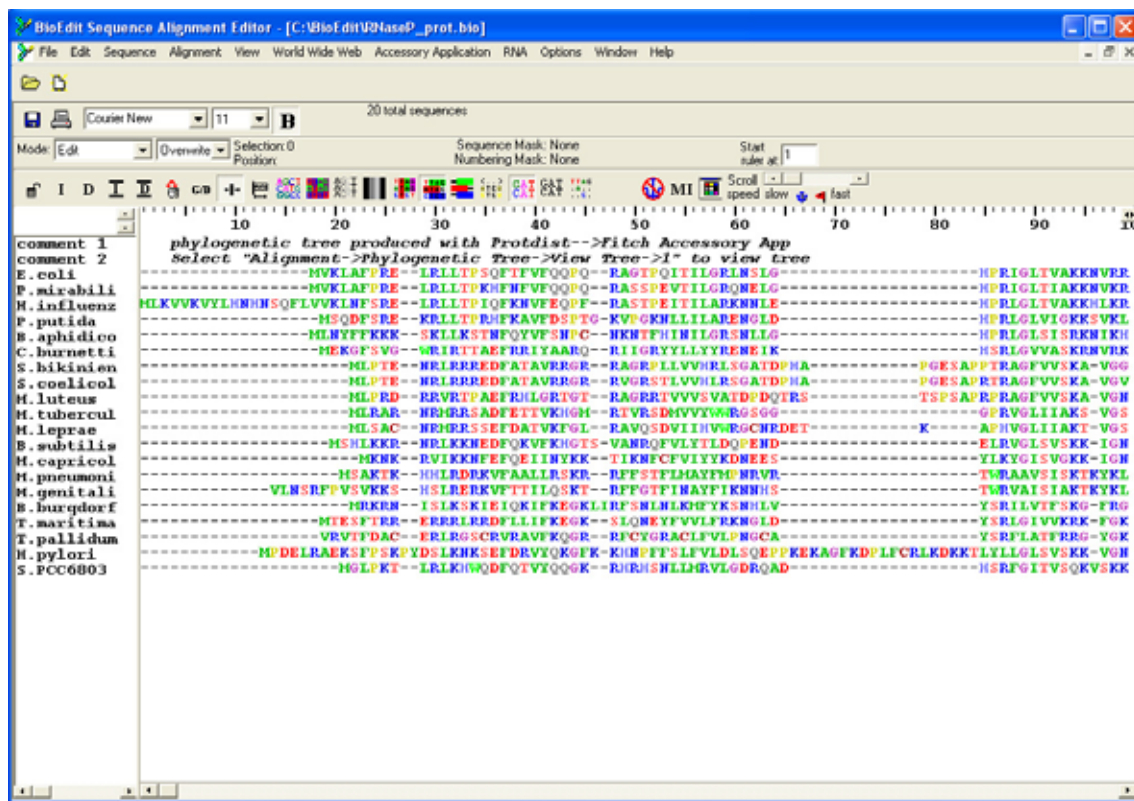
На пример, голем број гени идентифицирани во човековиот геном имаат свои хомолози (со висока сличност) кај нематодите, *Drosophila*, па, дури и кај габите и бактериите. Препознавањето на хомологните секвенци во DNA-молекулите или протеините се користи во компјутерските алгоритми за идентификација на гени во организми чиј геном се анализира, иако хомологијата не значи секогаш и иста функција на двата гена. Со вакви биоинформатички методи, користејќи информации за некој ген кај добро проучените организми-модел, може да се предвиди функцијата на некој ген во испитуваниот геном, иако за тоа не постојат биохемиски или генетички податоци.

Еден од основните алгоритми кои се користат за барање сличности и споредување на две секвенци е BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). Постојат повеќе верзии на BLAST наменети за споредување меѓу нуклеотидни (BLASTN) и меѓу аминокиселински секвенци (BLASTP), а можат да се прават и други понапредни пребарувања (на пример со BLASTX кој ја споредува испитуваната нуклеотидна секвенца во сите 6 можни рамки на читање со база на протеински секвенци). FASTA е уште еден често користен алгоритам за барање на слични секвенци. Кај овие алгоритми, се пребаруваат соодветни бази на податоци за постоење на слични секвенци со

испитуваната секвенца. Степенот на сличност се изразува со посебни бодови и со статистички вредности.

Пребарувањето за сличности меѓу испитуваната секвенца и референтните во базата на податоци може да биде **глобално**, кога се бараат сличности со целата испитувана секвенца или **локално**, кога се бараат сличности со нејзини (делови) сегменти.

За споредување на повеќе од три секвенци истовремено, се користат програми за т.н. **мултипли порамнувања** при што се споредуваат хомологните секвенци во протеините или нуклеинските киселини. Повеќе секвенци (оттаму изразот мултипли) од разни организми се порамнуваат вертикално според хомологијата на нуклеотидите или на аминокиселините, а на позициите во кои не се совпааат се оставаат празни места со цел што поголем дел од секвенците да бидат подредени (**слика 23-2**). На располагање се неколку програми за ваква анализа кои се бесплатни за академска употреба. Софтверските пакети BioEdit и GeneDoc се, меѓу другото, наменети за мултипли порамнувања.



**Слика 23-2:** Изгледот на екранот при мултиплото порамнување на DNA-секвенци. Порамнети се нуклеотидните секвенци на кодирачката верига од генот за RN-аза P од повеќе микроорганизми.

### 23.3 Пребарување на молекуларно-биолошки бази на податоци

Базите на податоци можат да се пребаруваат со цел определена аминокиселинска или нуклетодина секвенца да се спореди со слични секвенци, доколку постојат. Во основа, овие пребарувања се слични на стандардното споредување (барање на сличности), но, се вршат на далеку поголем број секвенци сторнирани во базата на податоци. Пребарувањето на базите на податоци е меѓу најчесто користените компјутерски анализи во молекуларната биологија.

Пред околу 25 години, етаблирани се првите бази на молекуларно-биолошки податоци, кои континуирано се дополнуваат со секвенционирани региони од DNA, хромозоми, како и од цели геноми од разни организми, како и од аминокиселинските секвенци на илјадници протеини. Базата GenBank во почетокот на 2001 година содржела  $10^{10}$  нуклеотиди од разни DNA региони и геномски секвенци од повеќе организми. Се претпоставува дека бројот на податоци во оваа база се удвојува секоја година.

Постојат три главни и јавно достапни бази на генски податоци:

- **EMBL** сместена во Европската лабораторија за молекуларна биологија во Велика Британија;
- **GenBank** при Националниот биоинформатички институт во САД; и
- **DDJB** - банка на DNA податоци на Јапонија.

Овие три бази на податоци се поврзани преку интернет и се усогласуваат меѓусебно секои 24 часа.

Јавно се достапни и бази на протеински податоци:

- **PIR** - интернационална и најстара база на молекуларни податоци (етаблирана во 1984 година);
- **Swiss-Prot** - Швајцарска база на протеински секвенци; и
- **PDB** - протеинска база на податоци сместена во Брукхевен, САД.

Постојат и специјализирани бази на податоци за геномски, мутациски и за структурни податоци (тридимензионални модели на протеини, кристалографски податоци и слично).

Пребарувањето на протеинските бази е околу 2 до 5 пати посензитивно отколку на базите на нуклеотидни податоци, што се должи на повеќе причини. „Азбуката“ на DNA е составена од само четири букви, додека на протеините од 20, што резултира со поголема информативност на секоја позиција во секвенцата која се испитува. Поради тоа што генетскиот код е редундантен (постојат повеќе кодони за повеќето аминокиселини), пребарувањето на некоја секвенца може да покаже идентичност со протеинскиот продукт и покрај тоа што секвенцата на кодирачката DNA може да биде различна, што се должи на алтернативните кодони за секоја аминокиселина. Исто така, протеинските секвенци се еволуциски повеќе конзервирани отколку DNA-секвенците.

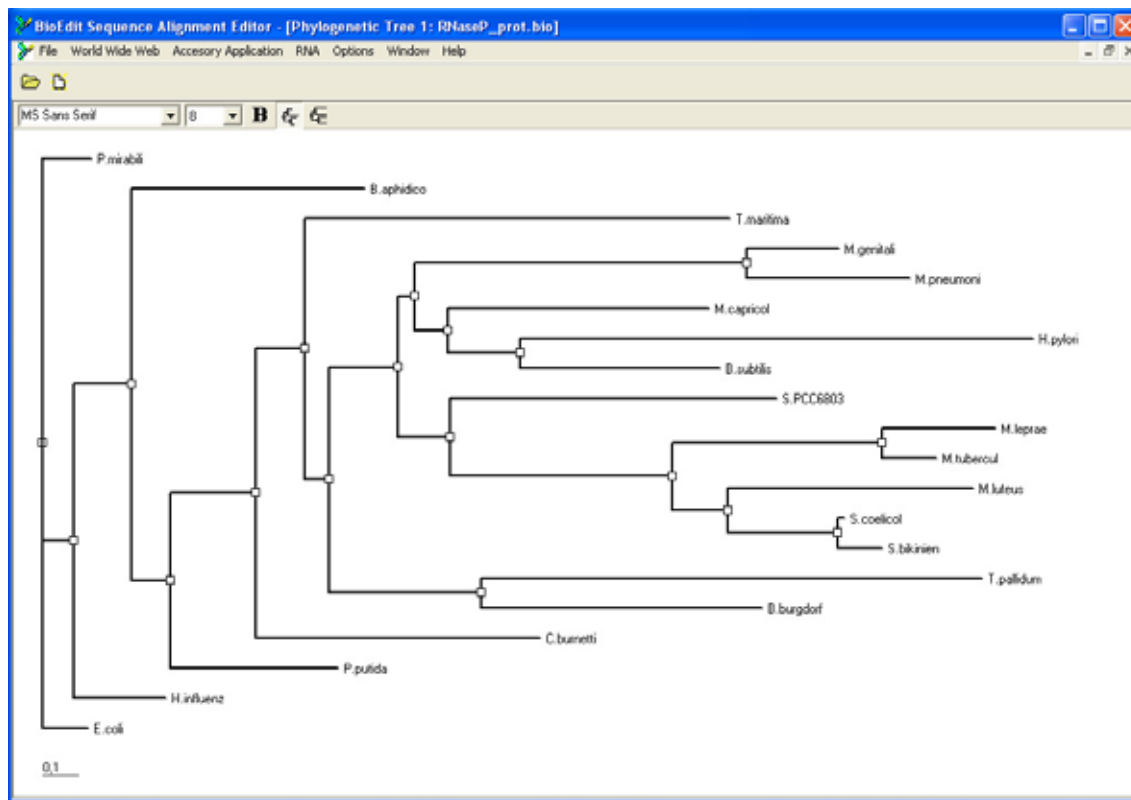
Во рутинските молекуларно-биолошки лаборатории, пребарувањата на базите на податоци се вршат најчесто поради повлекување на некоја секвенца и нејзино користење како референтна (при анализа на мутации и полиморфизми) или за споредба на експериментално добиената секвенца со оние што се сторнирани во базата на податоци (при идентификација на нови соеви микроорганизми, на пример).



## 23.4 Филогенетски анализи

Врз основа на сличноста (хомологијата) на нуклеотидната или на аминокиселинската секвенца на определен ген или протеински продукт од различни животински или растителни организми, можат да се анализираат еволуциските соодноси меѓу испитуваните видови или други таксони. Посебен софтвер ги определува овие аспекти врз основа на сложени алгоритми кои се развивани низа години и кои се базираат врз класичните морфолошки методи во микробиологијата, споредбената анатомија, физиологијата и други дисциплини.

Филогенетските стебла конструирани според нуклеотидните секвенци на организмите, се основна алатка во т.н. споредбена геномика. Алгоритмите за филогенетска анализа се засноваат врз две различни групи методи. Едната е т.н. **фенетичка**, кај која разликите во секвенците не ги рефлектираат нужно и еволуциските оддалечености на испитуваните организми, а стеблата кои се конструираат со овие анализи се нарекуваат **дендрограми**. Кај другата група на методи се користат посложени веројатносно-статистички алгоритми, при што се пресметуваат и веројатните еволуциски соодноси меѓу организмите, а се конструираат т.н. **кладистички** или **филогенетски** стебла, чии гранки се пропорционални на еволуциската дистанца (слика 23-3).

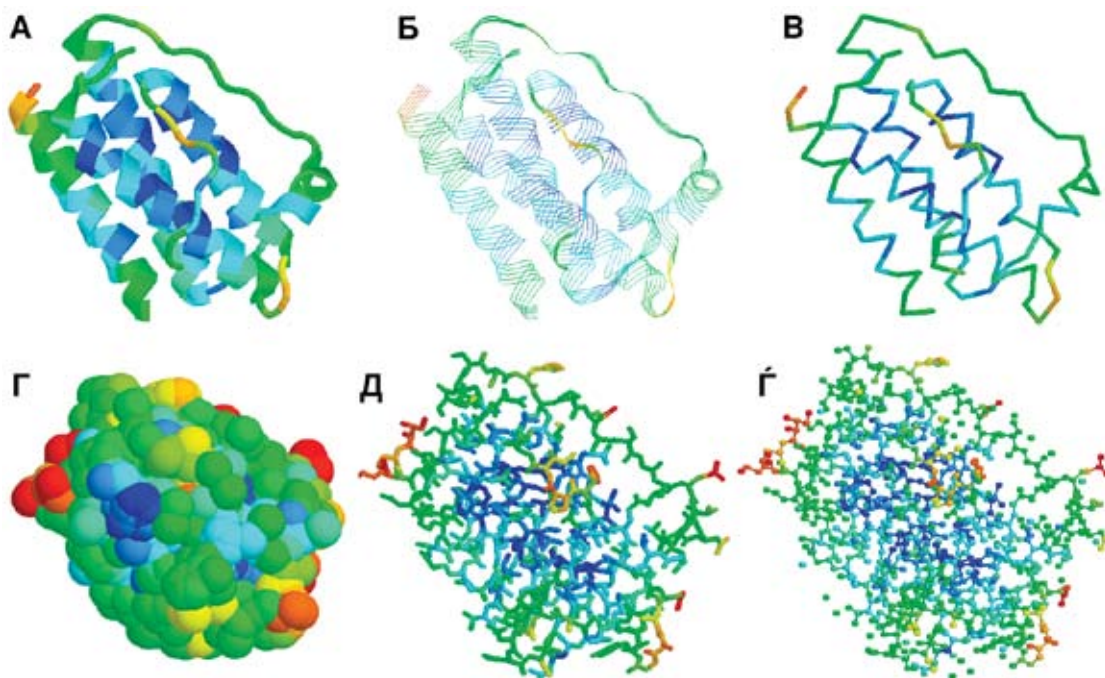


**Слика 23-3:** Приказ на изгледот на екранот при филогенетската (кладистичка) анализа на ензимот RN-аза кај различни микроорганизми. Хоризонталните отсечки се нарекуваат гранки на кладистичкото стебло, додека белите квадратчиња се јазлите.

На прикажаното филогенетско стебло се забележува „коренот“ кој го претставува заедничкиот предок на овие организми, гранките кои ги поврзуваат таксоните според приоритет на сродноста и чија хоризонтална должина зависи од бројот на изменети нуклеотидни или аминокиселински остатоци во испитуваната секвенца. Со јазли се претставени таксономските единици (на пример, некој вид или негов предок). Со скалата на оддалеченост се претставуваат разликите меѓу секвенците кои се споредуваат (на пример: 0,1 одговара на 10% разлика). Од вака конструираните стебла може да се извлечат важни информации за еволуцискиот сооднос меѓу организмите.

### 23.5 Прикажување на структурни модели на макромолекулите

Една од примените на компјутерите во молекуларната биологија е прикажување на структурни модели на макромолекулите. Структурните информации се експериментално добиени со кристалографија со рендгенски зраци, NMR спектроскопија и други методи и се вклопени во посебни компјутерски документи за таква намена. Овие документи се архивирани и достапни во базите на податоци, а врз основа на нив, компјутерските програми каков што е RasMol или ProteinExplorer можат да ја прикажуваат тридимензионалната структура на нуклеинските киселини и протеините. Особено е корисно што, притоа, можат да се ротираат тридимензионал-



**Слика 23-4:** Компјутерски создадени модели на протеински молекули. Протеинот *лептин* (од човек) е составен од пет  $\alpha$ -хеликални структури поврзани со различни јамки. На сликата е прикажан со модел на: **A** - пантлика, **B** - Безиерови ленти, **B** -  $\alpha$ -скелет, **Г** - *СРК* (модел со калоти), **Д** - скелет, и **Г** - стапчиња и топчиња.

ните слики и да се избира моделот со кој се прикажуваат секундарните и другите структури. На **сликата 23-4** прикажани се неколку различни компјутерски модели за претставување на секундарната структура на еден ист протеин, во овој пример: човековиот лептин.



# ОРГАНИЗМИ-МОДЕЛИ ВО МОЛЕКУЛАРНАТА БИОЛОГИЈА И ГЕНЕТИКА

## Прилог А

Видовите кои се репрезентативни претставници на својата таксономска категорија и кои се најмногу и најдолго проучувани во молекуларната биологија и генетика се нарекуваат **организми-модел**. Причините за нивниот избор во текот на долгата историја на проучување е мошне разновидна: достапноста на организмот за истражувачот кој оригинално го користел при своите експерименти, едноставноста при нивното одржување во лабораториски услови, кусиот животен циклус и многу други карактеристики кои се релевантни за научниот пристап. Очекувано е дека испитуваните параметри кај ваквите организми, во голема мерка, се слични или блиски со тие кај останатите видови организми. На пример, голем број од молекуларните механизми за транслација на протеините се слични кај повеќе ето досега испитувани вертебралните организми, па, оправдано е дека резултатите од овие истражувања кај лабораторискиот глушец, ќе бидат модели за останатите вертебрални видови. Сепак, треба да се има предвид дека сите карактеристики и податоците, воопшто, кои се пронајдени при проучувањето на организмите-модел, не се секогаш исти кај останатите видови од групата организми на кои припаѓа. Од тие причини некои претставници се избрани токму поради нивните „екстремни“ карактеристики кои не се наоѓаат кај сродните видови, но, се особено важни за научната дисциплина поради погодноста за експерименталниот пристап. На пример, рибата-балон има невообичаено компактен геном кој е многу полесно да се секвенционира отколку далеку поголемите геномите на останатите коскени риби на кои припаѓа. Слично се однесува и на геномот на моделното растение *Arabidopsis*.

Во натамошниот текст се прикажани најважните карактеристики на некои организми-модел кои се често користени во молекуларната биологија и генетика. Се користат и многу други видови кои се помалку или повеќе подобни за определени истражувања. Покрај тоа, важно е да се има предвид дека дел од податоците кои се прикажани во натамошниот текст, се подложни на брза промена, поради постојаното подобрување на квалитетот на истражувањата и освежување на информациите со нови резултати добиени со посоефицирани методи и опрема. Наведениот број на идентифицирани гени во табелите се однесува на податоците кои се достапни на крајот на 2009 година.

***Escherichia coli* (Грам-негативна бактерија)**

<b>големина на геномот</b>	4,64 Mb
<b>број на хромозоми</b>	1 циркуларен
<b>пресметан број на гени</b>	4289
<b>проценти на гени кои се хомоложни со човековите</b>	8%
<b>просечна големина на ген</b>	1 kb, (нема интрони)
<b>транспозони</b>	≈60 копии
<b>година во кој геномот е целосно секвенциониран</b>	1997

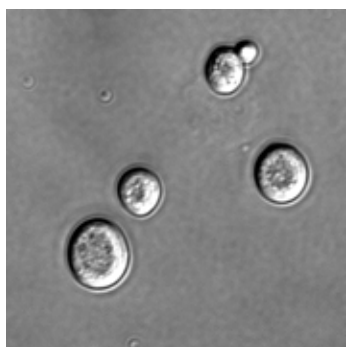


**Слика ПА-1:** Скенинг-електронска микрографија на клетки од *E. coli*. Сликата е во јавен домен на интернет и е превземена од архивата на *Rocky Mountain Laboratories, NIAID, NIH*.

*E. coli* е ситен грам-негативен бацил со тенок клеточен ѕид, надворешна мембрана и со околу 10 флагелуми. Овој едноклеточен прокариотски микроорганизам е дел од нормалната флора на дигестивниот тракт на човекот и повеќето цицачи, но, постојат и патогени соеви кои можат да предизвикаат цревни инфекции. Во генетиката, оваа бактерија се користи повеќе од 60 години и историски првиот организам кај кого е се вршени експериментите со бактериска конјугација, како и проучувањето на генетиката на бактериофазите. Екстензивно се користи за истражување на генските мутации, репликацијата, рекомбинацијата и транслацијата и генската регулација кај прокариотските организми. Воедно, *E. coli* е и најчесто употребуван организам во генетскиот инженеринг.

***Saccharomyces cerevisiae* (готварски квасец)**

<b>големина на геномот</b>	12,1 Мб
<b>хаплоиден број на хромозоми</b>	16 линеарни хромозоми (кај хаплоидните: 7 автозомни)
<b>пресметан број на гени</b>	6257
<b>проценти на гени кои се хомологни со човековите</b>	23%
<b>просечна големина на ген</b>	1,5 kb (0,03 интрони/ген)
<b>транспозони</b>	ретки
<b>година во кој геномот е целосно секвенциониран</b>	1996



**Слика ПА-2:** Микрографија на клетки од *S. cerevisiae* фотографирани со оптички микроскоп со техниката на диференцијален интерферентен контраст (DIC). Сликата е во јавен домен на интернет и е достапна на [www.wikimedia.org](http://www.wikimedia.org).

Постојат податоци дека човекот го користи квасецот за ферментација и производство на леб уште од преантичките времиња. Во генетиката има улога која симболично може да се опише како „еукариотска *E. coli*“. Имено, *Saccharomyces cerevisiae* е едноклеточен еукариотски организам кој може да создаде компактни колони составени од поголем број клетки. Во текот на размножувањето на природните соеви на *S. cerevisiae* наизменично се менуваат хаплоидната и диплоидната фаза. За разлика од нив, постојат лабораториски соеви кои се хаплоидни. Од многу причини, меѓу кои е и едноставната култивација и брзината на размножување (клеточниот циклус трае 90 минути), *S. cerevisiae* е од голема важност за проучување на генските рекомбинации, сигналната трансдукција, генетската контрола на клеточниот циклус, митохондриското наследување, генските интеракции, како и воопштено за геномските истражувања и системската биологија. Воедно, тоа е и првиот еукариотски организам чиј геном е целосно секвенциониран уште во 1996 година. Интересно е што, за разлика од повеќето еукариотски клетки, геномот на *S. cerevisiae* содржи само околу 5% интронски секвенци. Интересно е што дури 23% од секвенцата на квасниот геном иа хомологија со човековиот.



***Neurospora crassa* (филаментозна квасна габа)**

<b>големина на геномот</b>	43 Мб
<b>хаплоиден број на хромозоми</b>	5 линеарни хромозоми
<b>пресметан број на гени</b>	10 000
<b>проценти на гени кои се хомологни со човековите</b>	6%
<b>просечна големина на ген</b>	1,7 kb (нема интрони)
<b>транспозони</b>	ретки
<b>година во кој геномот е целосно секвенциониран</b>	2003



**Слика ПА-3:** Фотографија на култури на *N. crassa*.

Оваа портокалова мувла од филумот *Ascomycota* е еден од првите еукариотски микроорганизми кој е употребен како модел за молекуларната генетика. Историски, тоа е првиот еукариотски организам со кој, пред околу 70 години, Бидл и Татум ја поставиле теоријата за еден ензим-еден ген. *N. crassa* има хаплоиден животен циклус и рецесивните карактеристики можат лесно да се експримираат, што значително ги олеснува генетските анализи. Таа е клучен организам за проучување на: генетиката на мејозата, метаболичните интеракции, циркадскиот ритам и фунгалната цитогенетика.

***Arabidopsis thaliana* (цветно растение)**

<b>големина на геномот</b>	125 Mb
<b>хаплоиден број на хромозоми</b>	5 автозомни
<b>пресметан број на гени</b>	25 706
<b>проценти на гени кои се хомологни со човековите</b>	18%
<b>просечна големина на ген</b>	2 kb (4 интрони/ген)
<b>транспозони</b>	10% од геномот
<b>година во кој геномот е целосно секвенциониран</b>	2 000



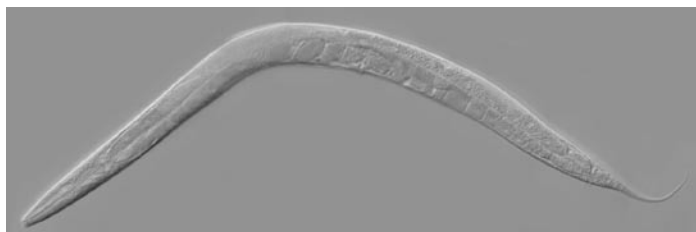
**Слика ПА-4:** Фотографија на *A. thaliana*. Сликата е во јавен домен на интернет и е достапна на [www.wikimedia.org](http://www.wikimedia.org).

Ова ситно цветно растение припаѓа на фамилијата *Brassicaceae* (зелки) и е распространето во Европа, Азија и Северозападна Африка. Наспроти пченката и пченицата, ова растение нема економско значење, но, има најмал геном од сите цветни растенија (само 125 милиони базни парови). Таа важна карактеристика, како и малите димензии и кусиот животен циклус од само 6 седмици, го прават атрактивен модел во молекуларната биологија и генетиката. *Arabidopsis thaliana* може да егзистира и во хаплоидна фаза, што значително ги олеснува генетските анализи. Од аспект на рекомбинантната технологија, важно е и што во клетките на ова растение релативно лесно може да се внесе егзогена DNA со бактеријата *Agrobacterium tumefaciens*. Тоа е организам кој е важен за проучување на растителната молекуларна генетика, како и молекуларната биологија на растителниот развој и фотосензитивноста.

Најновите податоци за геномот и протеомот на *A. thaliana* се ажурираат од страна на Иницијативата (TAIR, од англиски: The Arabidopsis Information Resource) и се достапни на интернет на страницата: <http://www.arabidopsis.org>.

### *Caenorhabditis elegans* (валчесто црвче)

големина на геномот	103 Мб
хаплоиден број на хромозоми	6 (5 автозомни, има X хромозом)
пресметан број на гени	21 000
проценти на гени кои се хомоложни со човековите	25%
просечна големина на ген	5 kb (5 егзони /ген)
транспозони	неколку типа, активни се кај некои подвидови
година во кој геномот е целосно секвенциониран	1998



**Слика ПА-5:** Микрографија на *C. elegans* фотографирани со оптички микроскоп со техниката на диференцијален интерферентен контраст (DIC). Сликата е во јавен домен на интернет и е достапна на [www.wikimedia.org](http://www.wikimedia.org).

Возрасната единка на оваа микроскопска нематода има должина од околу 1 mm и е транспарентна, а содржи 959 клетки. Тоа овозможувај релативно едноставно да се анализираат голем број мутации кои предизвикуваат морфолошки видлив ефект или промена во однесувањето на црвчето. *Caenorhabditis* е клучен организам-модел за проучување на: апоптозата, генетиката на развојот, однесувањето, невромускулните истражувања и стареењето. Феноменот на RNA-интерференција е особено често истражуван кај овој организам, пред сè поради фактот што генското потиснување се постигнуваа и со едноставното хранење на црвчињата со бактерии кои експримираат мали интерферирачки молекули (siRNA или shRNA) насочени кон генот од интерес.

Заедно со останатите претходно истакнати предности на овој анимален модел, *C. elegans* е организам кај кој RNA-интерференцијата е најуспешно користена во истражувачки цели. Со екстензивни експерименти на селективно потиснување на генската експресија на околу 86% од сите гени (вкупно околу 21 000), расветлена е функцијата на околу 9% од геномот на *C. elegans*.

***Drosophila melanogaster*** (винска мушичка)

<b>големина на геномот</b>	180 Мб
<b>хаплоиден број на хромозоми</b>	4 (3 автозомни и еден полов хромозом: X или Y)
<b>пресметан број на гени</b>	14 000
<b>проценти на гени кои се хомологни со човековите</b>	≈50%
<b>просечна големина на ген</b>	3 kb (4 егзони/ген)
<b>транспозони</b>	најчести се P-елементите
<b>година во кој геномот е целосно секвенциониран</b>	2 000



**Слика ПА-6:** Фотографија на *D. melanogaster*. Сликата е во јавен домен на интернет и е достапна на [www.wikimedia.org](http://www.wikimedia.org).

Винската мушичка е еден од првите организми кои биле интензивно проучувани во генетиката. Овој инсект е долг само 3 mm, има кус животен циклус, може крајно едноставно да се одгледува, механизмите на наследувањето се добро проучени, а цитогенетските анализи се релативно лесни поради тоа што има само 4 пара хромозоми. Интересно е што полот на овој инсект е определен со односот на половите и автозомните хромозоми, а не со самото присуство на Y хромозомот (како кај луѓето). со *D. melanogaster* е клучен организам за проучување во класичната (трансмисиска) генетика, цитогенетиката, ембриогенезата, клеточната диференцијација, невромускулните истражувања, невронауката, како и истражувањата на однесувањето, видот и стареењето.

Околу 20% од геномот кодираат протеински производи (досега се идентифицирани околу 14000 протеин-кодирачки гени), додека дури 60% од геномската секвенца има функции поврзани со регулацијата на генската експресија.

### *Fugu rubripes* (риба-балон, понекаде означена и како *Takifugu rubripes*)

големина на геномот	390 Мб
хаплоиден број на хромозоми	22
пресметан број на гени	26 700
проценти на гени кои се хомологни со човековите	75%
просечна големина на ген	5690 bp (7,8 екзони/ген)
транспозони	ретки (во однос на останатите вертебрати)
година во кој геномот е целосно секвенциониран	2002



**Слика ПА-7:** Фотографија на *F. rubripes*. Сликата е во јавен домен на интернет и е достапна на [www.wikimedia.org](http://www.wikimedia.org).

Рибата-балон е позната по тоа што содржи еден од најсилните отрови во природата: тетродотоксин. Но, од аспект на молекуларната генетика, важно е што оваа риба го има еден од најкомпактните геноми кај вертебралните организми. Иако пресметаниот вкупен број гени е сличен како и кај останатите анализирани коскени риби и кај вертебралните, воопшто, геномот на рибата-балон е помал од нив просечно околу седум пати. Споредено со човековиот, геномот на *F. rubripes* е 11 пати помал. Се претпоставува дека причината за овој феномен е непознат селективен притисок која довел до драстична редукцијата на бројот и должината на интроните и на интергенските секвенци. Геномот на оваа риба содржи помалку од 15% дисперзирани репетитивни секвенци.

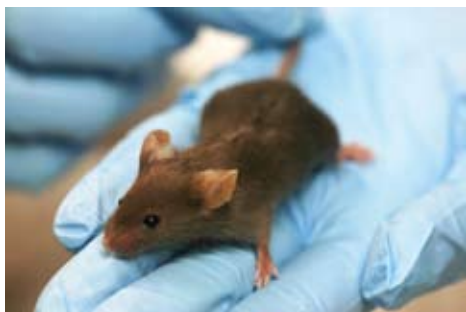
Интересно е што, иако ги делат 450 милиони години еволуција од заедничкиот анcestor (предок), дури околу 75% од гените кај рибата -балон имаат хомологија со гените од хуманиот геном. Разликите во останатите 25% од гените од хуманиот геном кои не се наоѓаат кај *F. rubripes*, претежно се однесуваат на гени кои имаат улога во имуниот систем и регулацијата на метаболизмот кај луѓето.

Овие карактеристики го прават *F. rubripes* особено подобен за истражувања на вертебралните геноми и откривање на нови гени во нив.

Треба да се истакне дека уште покомпактен геном (само 340 Мб) има блискиот роднина од истиот род Tetraodon: слатководната риба-балон *Tetraodon nigroviridis* која исто така се користи во геномските истражувања.

***Mus musculus*** (глушец)

<b>големина на геномот</b>	2 600 Мб
<b>хаплоиден број на хромозоми</b>	20 (19 автозомни, и два полови хромозоми: X, Y)
<b>пресметан број на гени</b>	23 786
<b>проценти на гени кои се хомологни со човековите</b>	≈99%
<b>просечна големина на ген</b>	40 кб (8,3 егзони/ген)
<b>транспозони</b>	38% од геномот
<b>година во кој геномот е целосно секвенциониран</b>	2002



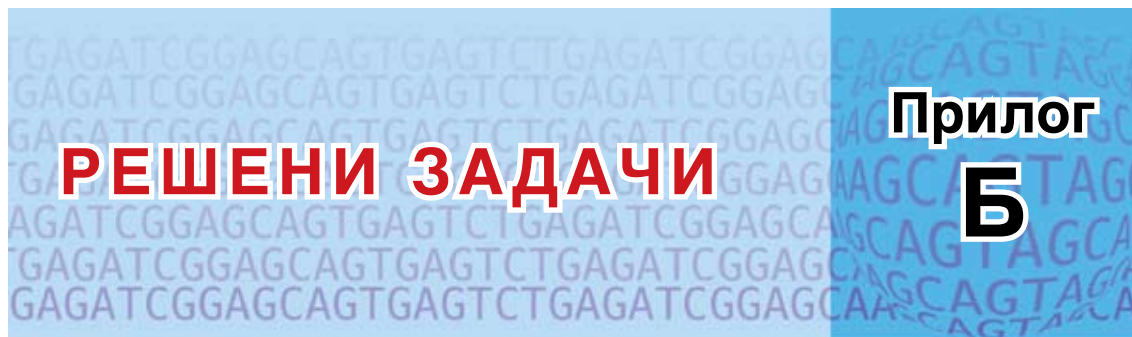
**Слика ПА-8:** Фотографија на еден од бројните соеви на лабораторискиот глушец. Сликата е во јавен домен на интернет и е достапна на [www.wikimedia.org](http://www.wikimedia.org).

Глушецот е идеален организам-модел за проучување на генетиката кај цицачите. Неговите димензии, брзата репродукција и едноставноста на одгледувањето, се причина за широката примена на глушецот во генетските експерименти. Поради високата хомологија со геномот со човековиот, *M. musculus* е клучен организам-модел за биомедицинските истражувања на голем број заболувања кај луѓето (на пример, имунолошките нарушувања, канцерот, дијабетесот, дислипидемиите), како и на мутациите, ембриогенезата, имуниот систем, невронауката и однесувањето и на многу други.

Од комерцијални извори, како и со академска соработка, достапни се и трансгенични глумци кај кои постои експресија на туѓи гени каков што е зелениот флуоресцентен протеин (GFP), на пример. Покрај тоа, глумците кај кои постои knock-out на определен ген се особено важни за многу истражувања кај кои се истражува генската функција, како и последиците од потиснувањето на истата.







**ПБ-1:** Процентуалниот удел на цитозин во определен двоверижен DNA-молекул изнесува 40%. Пресметајте го процентуалниот удел на аденинот, тиминот и гуанинот.

**Решение:** Во двоверижната DNA, согласно Вотсон-Криковите правила, аденинот се спарува со тимин, а гуанинот со цитозин, од што и произлегува дека процентуалниот удел на аденинот е еднаков со тој на тиминот и уделот на гуанинот е еднаков со тој на цитозинот. Ако цитозинот е застапен со 40%, тогаш и гуанинот исто така е со удел од 40%. Вкупниот процентуален удел на цитозин и на гуанин е 80%, па, останатите 20% се однесуваат на аденин и на тимин ( $A + T = 100\% - 80\% = 20\%$ ). Со оглед на тоа што процентуалниот удел на аденинот е еднаков со тој на тиминот, уделот на тимин е  $20\% / 2 = 10\%$ .

**ПБ-2:** Со анализа е утврдено дека во некој вирус, процентуалниот удел на нуклеотидите изнесува: аденин 10%, тимин 24%, гуанин 30% и цитозин 36%. Дали нуклеинската киселина на овој вирус е: двоверижна DNA, едноверижна DNA, двоверижна RNA или едноверижна RNA?

**Решение:** Самото присуство на тимин, а отсуство на урацил во утврдениот базен состав, имплицира дека овој вирус содржи DNA, а не RNA-молекули. Со оглед на тоа што процентуалните удели на нуклеотидите не се според Чаргафовите правила за двоверижна DNA, вирусната нуклеинска киселина е едноверижна DNA.

**ПБ-3:** Со анализа на базниот состав на генетскиот материјал изолиран од новооткриен вирус, идентифицирани се аденин, гуанин, цитозин и урацил. Нивните процентуални удели се:  $A = 21\%$ ;  $G = 29\%$ ;  $C = 29\%$  и  $U = 21\%$ . Од каков тип нуклеинска киселина е изграден геномот на овој вирус.

**Решение:** Со оглед на присуството на урацил, а отсуството на тимин во анализираниот генетски материјал, јасно е дека се работи за RNA-молекул. Односот на процентуалните удели на базите е: %A = %U и %G = %C, што индицира дека RNA-молекулот е двоверижен.

**ПБ-4:** Нуклеотидната секвенца на едната верига од некој двоверижен DNA-молекул е: 5'-ACGGATCTAGATCT-3'. Определете ја секвенцата на комплементарната DNA верига (пишувајќи ја во вообичаената насока 5'→3').

**Решение:** Секвенцата на комплементарната DNA-верига е: 5'-AGATCTAGATCCGT-3'.

**ПБ-5:** Замислете дека во текот на еволуцијата се појавил организам со DNA-молекул составен од шест типа бази (три комплементарни парови), додека бројот на аминокиселини е вообичаен (20).

- Колку кодони, т.е. комбинации на триплети на нуклеотиди, би можеле теоретски да постојат кај овој организам доколку генетскиот код би бил вообичаен?
- Дали шесте бази би биле доволни за кодирање на 20-те аминокиселини, како и за и старт- и стоп-кодоните, доколку кај овој организам генетскиот код би бил составен од дублети на нуклеотиди?

**Решение:**

- Едноставната пресметка покажува дека теоретскиот број на триплети е:  $6^3 = 216$  кодони.
- Доколку генетскиот код би бил составен од дублети нуклеотиди, тогаш би постоеле:  $6^2 = 36$  кодони од по два нуклеотиди, што е повеќе од доволно за кодирање и на 20-те аминокиселини и за стартниот и стоп-сигналот.

**ПБ-6:** Напишете некоја секвенца на едноверижен RNA-молекул која може да создаде структура во вид на шнола (*hairpin*). Подвлечете го делот од секвенцата кој не е самокомплементарен, па, ја формира јамката од шнолата.

**Решение:** На пример: 5'-AGCGAUCUAUCUCUAGAUCGAUAGAUCGCU-3'.

**ПБ-7:** Нуклеотидната секвенца на урнек DNA-веригата е: ACGGATCTAGATACT. Под услов, во овој пример, RNA-полимеразата да врши транскрипција во насока од лево кон десно:

- Определете ја секвенцата на RNA-транскриптитот.
- Означете ги 5'- и 3'-краевите на урнек DNA-веригата и на RNA-транскриптитот.

**Решение:**

- Секвенцата на RNA-транскриптитот е: 5'-UGCCUAGAUCUAUGA-3'.
- Ориентацијата на урнек DNA-веригата е: 3'-ACGGATCTAGATACT-5'.

**ПБ-8:** Во клетката на некој диплоиден еукариотски организам има 2 милијарди базни парови двоверижна DNA ( $2 \times 10^9$  bp).

- Колку нуклеозоми се наоѓаат во клетката?
- Пресметајте го бројот на молекули од секој хистонски протеин кој е поврзан со DNA-молекулот.

**Решение:** За решавање на оваа задача треба да се има предвид дека секој нуклеозом опфаќа околу 200 bp од двоверижната DNA (од 144 до 147 bp DNA се замотани околу секое нуклеозомско јадро, од 20 до 22 bp се поврзани со хистонот H1, а останатите 30 до 40 bp се поврзувачка (*linker*) DNA која се наоѓа меѓу соседните нуклеозоми.

- Теоретскиот број на нуклеозоми во клетката може да се определи со едноставно делење на бројот на базни парови од двоверижниот DNA-молекул ( $2 \times 10^9$  bp) со бројот на базни парови кои ги опфаќа секој нуклеозом (200 bp).  
Во клетката има:  $2 \times 10^9 \text{ bp} / 200 \text{ bp} = 1 \times 10^7$  нуклеозоми.
- Во секој нуклеозом се наоѓаат по две молекули од хистонските протеини H2A и H2B, H3 и H4. Од тоа произлегува дека во клетката има по  $2 \times 10^7$  од секој хистонски молекул H2A и H2B, H3 и H4. Поради тоа што секој нуклеозом е поврзан и со по еден молекул од хистонскиот протеин H1, произлегува дека во клетката има  $1 \times 10^7$  молекули H1.

**ПБ-9:** Која од следниве куси двоверижни DNA-молекули имаат повисока точка на денатурација (*T<sub>m</sub>*):

- $$5\text{'-AGTTACTAAAGCAATACATC-3'}$$

$$3\text{'-TCAATGATTTTCGTTATGTAG-5'}$$
- $$5\text{'-AGGCGGGTAGGCACCCTTA-3'}$$

$$3\text{'-TCCGCCCATCCGTGGGAAT-5'}$$

**Решение:** Точката на денатурација на двоверижниот DNA-молекул зависи од процентуалниот удел на паровите GC. Поради тројните водородни врски кои се наоѓаат во секој пар GC, наспроти двојните врски во AT паровите, DNA-молекулите со поголема застапеност на паровите GC имаат повисока *T<sub>m</sub>* вредност. И без користење на некоја од формулите за пресметување на точката на денатурација, јасно е дека во овој случај тоа е молекулот означен со б.

**ПБ-10:** Определете која од следниве две двоверижни DNA-молекули има пониска точка на денатурација:

- $$5\text{'-AGTCAATCAGACGACATGTATGTAT-3'}$$

$$3\text{'-TCAGTTAGTCTGCTGTACATACATA-5'}$$
- $$5\text{'-AGGCGCTCAGACGGCGTGACGTGC-3'}$$

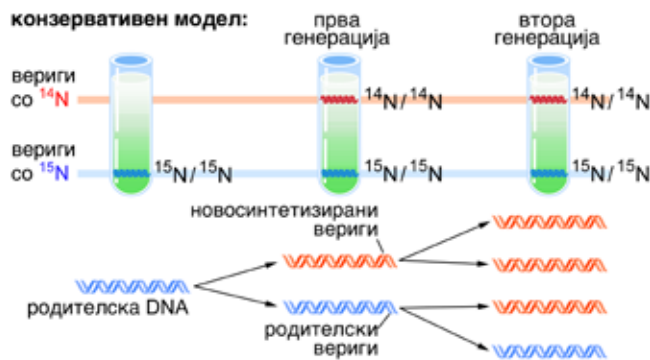
$$3\text{'-TCCGCGAGTCTGCCGCACGTGCACG-5'}$$

**Решение:** Едноставното броење и елементарната пресметка покажуваат дека секвенцата на DNA-молекулот под **а.** има 16 парови А-Т од вкупно 25 базни парови (процентуален удел на аденин и тимин 64%, наспроти тој на гуанин и цитозин: 36%). DNA-молекулот под **б.** има 18 парови G-C од вкупно 25 базни парови (процентуален удел на гуанин и цитозин: 72%, а на аденин и тимин: 28%). Оттаму, пониска точка на денатурација има молекулот под **а.** заради поголемиот број на водородни врски (3) меѓу паровите G-C.

**ПБ-11:** Претходно е објаснето дека репликацијата на DNA се одвива според семиконзервативниот модел. Користејќи ја приложената шема на резултатите од Мезелсон-Сталовиот експеримент со изотопи на азотот, предвидете ги хипотетичните експерименти во случај DNA-репликацијата би се вршела според конзервативниот и дисперзивниот модел. Нацртајте шеми според прикажаната, обрнувајќи внимание на положбата и бројот на центрифугални прстени при центрифугирање на DNA-изолатите од бактериските клетки по првата и втората генерација на размножување во хранлив медиум со лесниот изотоп на азотот.



**Решение:** По аналогија на прикажаната шема, хипотетичките резултати од експерименталниот дизајн на Мезелсон и на Стал според конзервативниот и според дисперзивниот модел би можеле да се претстават на следниов начин:



**ПБ-12:** Хипотетичен протеин-кодирачки ген има должина од 4320 bp. Протеинскиот продукт е долг 576 аминокиселински остатоци. Одговорете ги следниве прашања:

- Која е теоретската најмала должина на генот (поточно на отворената рамка за читање - ORF) за да може да кодира продукт со должина од наведените 576 аминокиселини?
- Која е причината за многу поголемата должина на генот во однос на кодираниот протеински продукт?
- Колку интрони би имал генот ако претпоставиме дека има 12 егзони?

**Решение:**

- Најмалата должина на генот неопходна за кодирање на овој ензим е бројот на аминокиселини помножен со три нуклеотиди колку што има секој кодон, вклучувајќи го и стартниот кодон за метионин. Пресметката е:  $576 \times 3 = 1728$  bp.
- Должината на генот е поголема (4320 bp) отколку пресметаниот најмал број нуклеотиди (1728 bp) неопходни за кодирање на протеинскиот продукт пред сè поради интроните и регулаторните секвенци (промотори, 5'- и 3'-UTR и други) кои не специфицираат аминокиселински остатоци, но, се составен дел од генот.
- Ако има 12 егзони, генот би имал 11 интрони.

**ПБ-13:** Следнава урнек-верига од некоја бактерискиот DNA-молекул има секвенца: 5'-AGGTTTAAACGTGCAT-3'. Определете ја аминокиселинската секвенца на кодираниот протеински продукт.

**Решение:**

Секвенцата на DNA урнек-веригата е: 5'-AGGTTTAAACGTGCAT-3'

Транскрибираната mRNA има секвенца: 3'-UCCAAAUUGCACGUA-5'

Транслацијата на mRNA се одвива во насока 5'→3', па, за натамошното решавање е поедноставно оваа секвенца да „преврти“ наопаку и транскрибираната mRNA-секвенца да се напише со таква ориентација: 5'-AUGCACGUUAAACCU-3'.

Според табелата на генетскиот код, може да се напише следниов редослед на овие кодони и соодветните аминокиселини кои ги специфицираат:

5'-AUG CAC GUU AAA CCU-3'

N- fMet His Val Lys Pro-C

Поради тоа што наведениот пример се однесува на бактериска DNA, првата аминокиселина е формилметионин (fMet), а не метионин, како кај еукариотите.

**ПБ-14:** Следнава урнек-верига од средишниот дел од некој ген е со нуклеотидната секвенца: 5'-ACCGGCTAAGATCTGACTAGC-3'.

- Определете ги секвенците на теоретските три рамки на читање на кодот и изберете ја онаа mRNA која е транскрипт од средината на функционалниот ген.
- Определете ја аминокиселинската секвенца на кодираниот протеински продукт од избраната mRNA.

**Решение:**

а. Секвенцата на DNA урнек-веригата е: 5'- ACCGGCTAAGATCTGACTAGC -3'

Транскрибираната mRNA има секвенца: 3'- UGGCCGAUUCUAGACUGAUCG -5'

Транслацијата на mRNA се одвива во насока 5'→3', па, за натамошното решавање е поедноставно оваа секвенца да „преврти“ наопаку и транскрибираната mRNA секвенца да се напише со таква ориентација: 5'-GCUAGUCAGAUCUUAGCCGGU-3'.

Теоретски, оваа mRNA има три рамки на читање:

прва рамка на читање:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
G	C	U	A	G	U	C	A	G	A	U	C	U	U	A	G	C	C	G	G	U
	Ala		Ser		Gln		Ile		Leu		Ala		Gly							

втора рамка на читање:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
G	C	U	A	G	U	C	A	G	A	U	C	U	U	A	G	C	C	G	G	U
/	Leu		Val		Arg		Ser		STOP		/		/							/

трета рамка на читање:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
G	C	U	A	G	U	C	A	G	A	U	C	U	U	A	G	C	C	G	G	U
/	/	STOP		/		/		/		/		/		/		/		/		/

Со оглед на тоа што втората и третата рамка на читање содржат стоп-кодони, тие не можат да бидат транскрипти од средишниот дел на некој функционален ген, па, само првата рамка на читање е возможниот транскрипт.

б. Според табелата на генетскиот код, аминокиселинската секвенца на дел од кодираниот полипептид е: N-Ala-Ser-Gln-Ile-Leu-Ala-Gly-C.

**ПБ-15:** Определен двоверижен DNA-молекул со должина од 5 милиони базни парови (5 Mb) содржи процентуален удел на гуанин и цитозин: 62% (%G+C = 62). Пресметајте на колку места овој молекул, според статистичката веројатност, ќе биде препознаена, а со тоа и пресечена, со следниве рестрикциски ендонуклеази:

- Hind*III (ја препознава секвенцата: AAGCTT)
- Hpa*II (ја препознава секвенцата: CCGG)
- Bam*HI (ја препознава секвенцата: GGATCC)

**Решение:** Со оглед на тоа што во оваа двоверижна DNA %G+C = 62, тогаш, согласно Вотсон-Криковите правила за спарување комплементарни бази, %G = %C = 62% / 2 = 31%, односно гуанинот и цитозинот се застапени со процентуален удел од по 31%. Процентуалниот удел на другите две бази се пресметува на следниов начин: %A+T = (100% - %G+C) = 38%. %A = %T = 38% / 2 = 19%, односно аденинот и тиминот се застапени со процентуален удел од по 19%. За да се пресмета статистичката веројатност за

пресекување со определен рестрикциски ензим, треба да се помножат поединечните веројатности од појавување на секоја од четирите бази на рестрикциското место:

- а. Бројот на места за препознавање на секвенцата AAGCTT е:

$$0,19 \times 0,19 \times 0,31 \times 0,31 \times 0,19 \times 0,19 \times 5\,000\,000 = 0,000125238481.$$

За да се пресмета веројатноста од бројот на места на целата секвенца, се множи добиената вредност со должината на DNA-молекулот (5Mb):  $0,000125238481 \times 5\,000\,000 = 626$  места, т.е, според статистичката веројатност, ензимот *Hind*III ќе го пресече дадениот DNA-молекул просечно на 626 места, создавајќи 627 DNA-фрагменти.

- б. Бројот на места за препознавање на секвенцата CCGG е:

$$0,31 \times 0,31 \times 0,31 \times 0,31 = 0,00923521.$$

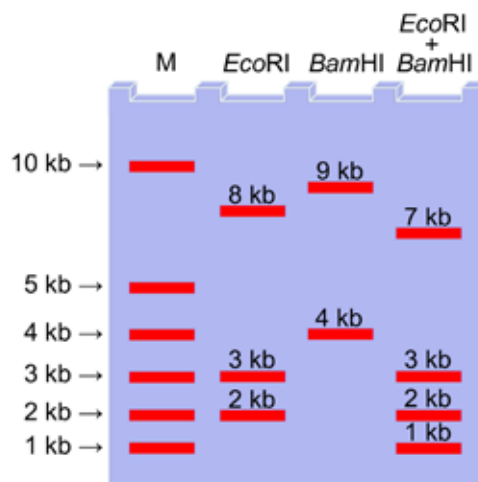
Со множење на добиената вредност со должината на DNA-молекулот се добива:  $0,00923521 \times 5\,000\,000 = 46\,176$  места, т.е, ендонуклеазата *Hpa*II ќе изврши пресекување на DNA-молекулот на 46 176 места, со што теоретски ќе се создадат 46 177 фрагменти.

- в. Бројот на места за препознавање на секвенцата GGATCC е:

$$0,31 \times 0,31 \times 0,19 \times 0,19 \times 0,31 \times 0,31 = 0,0003333.$$

Со множење на добиената вредност со должината на DNA-молекулот се добива:  $0,0003333 \times 5\,000\,000 = 1655,5$  места, односно ензимот *Bam*HI ќе го пресече дадениот DNA-молекул просечно на 1655,5 места, создавајќи околу 1657 DNA-фрагменти.

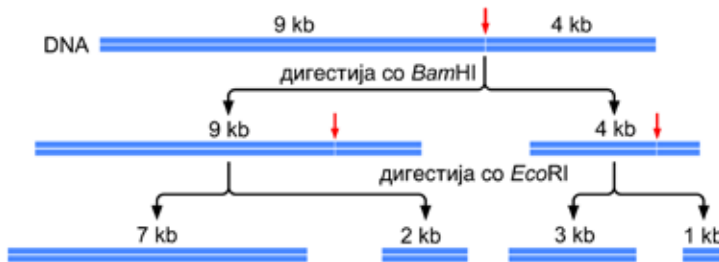
**ПБ-16:** Примерок на амплифицирана линеарна двоверижна DNA со должина од 13 000 bp (13 kb) е пипетиран во три епрувети: во едната е додадена само рестрикциската ендонуклеаза *Eco*RI, во другата само *Bam*HI, а во третата и двата ензима. По целосната дигестија на 37°C, примерок од секоја епрувета е аплициран во агарозен гел. На позицијата М (маркер) е аплицирана комерцијално подготвена смеса на DNA-фрагменти со позната должина. По електрофорезата, фрагментите се визуализирани со флуоресцентно бојење и прикажани на шемата на електрофоретограмот. Определете ги рестрикциските места на оригиналниот DNA-молекул (13 kb) со *Eco*RI и со *Bam*HI, цртајќи едноставна шема.





**Решение:** Рестрикциските места на 13 kb DNA-молекулот можат да се пронајдат со анализа на електрофоретските ленти на продуктите од трите дигестии. Дигестијата само со ензимот *EcoRI* произведува три фрагменти со должина од 8 kb, 3 kb и 2 kb што индицира дека на оригиналниот 13 kb DNA-молекул постојат две места за пресекување со *EcoRI*. Со дигестијата само со *BamHI* се добиваат 2 фрагмента: 9 kb и 4 kb, што укажува дека има само едно рестрикциско место за овој ензим. Ова место се наоѓа од 9 kb едниот и 4 kb од другиот крај на оригиналната DNA. Дигестијата со двата ензима истовремено произведува четири фрагменти: 7 kb, 3 kb, 2 kb и 1 kb.

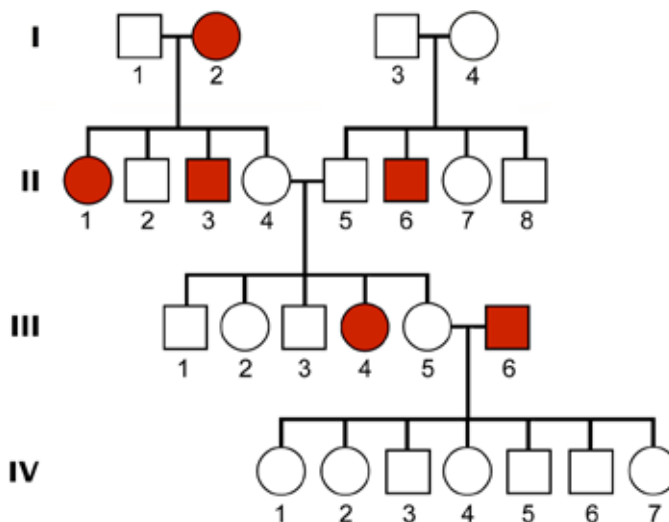
Поради тоа што ни еден од фрагментите кои се добиваат со дигестија само со *BamHI* не се наоѓаат при двојната дигестија, произлегува дека *EcoRI* ги пресекува и двата *BamHI* фрагменти. Понатаму, може да се забележи дека збирот од двата фрагмента (7 kb и 2 kb) кои се добиваат при двојната дигестија, одговара на должината на еден од продуктите (9 kb) на дигестија со *BamHI*. Слично, сумата на должините на фрагментите 3 kb и 1 kb од двојната дигестија, одговара на должината на другиот продукт (4 kb) на дигестија извршена само со ензимот *BamHI*. Оттаму произлегува дека *EcoRI* го пресекува првиот *BamHI*-фрагмент произведувајќи ги фрагментите со должина од 7 kb и 2 kb и го пресекува вториот *BamHI*-фрагмент давајќи 3 kb и 1 kb продукти. Од овие заклучоци може да се нацрта следнава шема на дигестија:



Од ова е јасно дека рестрикциското место за ензимот *BamHI* се наоѓа меѓу двете посочени места за *EcoRI*. Сепак, од четирите фрагменти кои настануваат при двојната дигестија, можат да се претпостават неколку можни комбинации кај кои продуктите на дигестија со *BamHI* се вклопуваат меѓу двете *EcoRI*-места. За да се определи точниот редослед на рестрикциските места, треба да се споредат должините на продуктите на дигестијата со *EcoRI* со тие од двојната дигестија. Имено, при пресекување на оригиналниот 13 kb DNA-молекул само со ензимот *EcoRI* се добиваат фрагменти со должина од 8 kb, 3 kb и 2 kb. Од нив, 3 kb и 2 kb-фрагменти се наоѓаат и кај двојната дигестија, што упатува на тоа дека тие фрагменти не содржат места за пресекување со *BamHI*. Наспроти тоа, 8 kb фрагмент не се наоѓа кај двојната дигестија, каде се наоѓаат фрагментите со должина од 7 kb и 1 kb, што укажува дека во 8 kb фрагмент се наоѓа рестрикциско место за ензимот *BamHI*. Се наметнува заклучокот дека фрагментите 7 kb и 1 kb се поставени еден до друг, додека 2 kb и 3 kb фрагменти се наоѓаат на спротивните краеве. Од сево ова може да се нацрта и бараната шема на рестрикциските места за двата ензима во оригиналниот 13 kb DNA-молекул:



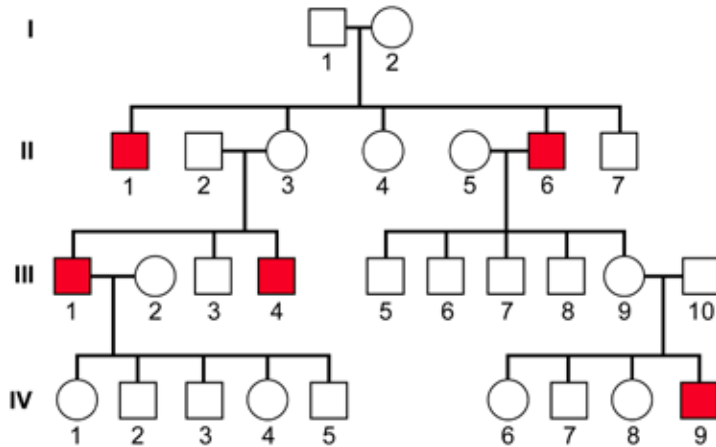
**ПБ-17:** На следново родословно стебло се прикажани членовите на семејството кај кое постои наследување на некое заболување условено со алелите  $A$  и  $a$ .



- Објаснете кој е најверојатниот тип на наследување.
- Наведете ги најверојатните генотипови на секоја од прикажаните индивидуи.

**Решение:**

- Од разгледувањето на родословното стебло може да се забележи дека заболувањето не се јавува кај сите генерации, што упатува на рецесивен тип наследување (кај доминантниот тип нема прескокнување на генерациите). Важно е да се забележи и дека родителите II-4 и II-5 имаат една заболена ќерка (III-4), што е дополнителна потврда за рецесивноста. Со оглед на тоа што наследувањето е рецесивно, може да се претпостави дека заболени се индивидуите кај кои е присутен алелот  $a$  во хомозиготна состојба ( $aa$ ). Фенотипски здрави се индивидуите со хомозиготна присутност на алелот  $A$  ( $AA$ ), а преносители се хетерозиготните индивидуи ( $Aa$ ). Според приближно рамномерната застапеност на состојбата кај машките и кај женските индивидуи, може да се заклучи дека наследувањето е автозомно. Доколку наследувањето е рецесивно и е врзано со X-хромозомот, би се очекувала појава на состојбата кај потомството на заболениите машки индивидуи. Тие би имале здрави ќерки-преносители кои би го пренесувале заболувањето врз своите машки деца.
- Најверојатните генотипови на членовите на прикажаното родословно стебло се: I-1 ( $Aa$ ); I-2 ( $aa$ ); I-3 ( $Aa$ ); I-4 ( $Aa$ ); II-1 ( $aa$ ); II-2 ( $Aa$ ); II-3 ( $aa$ ); II-4 ( $Aa$ ); II-5 ( $Aa$ ); II-6 ( $aa$ ); II-7 ( $Aa$ ); II-8 ( $Aa$ ); III-1 ( $AA$  или  $Aa$ ); III-2 ( $AA$  или  $Aa$ ); III-3 ( $AA$  или  $Aa$ ); III-4 ( $aa$ ); III-5 (веројатно  $Aa$ ); III-6 ( $aa$ ); IV-1 па сè до IV-7 ( $Aa$ ).



**ПБ-18:** Појавата на ретко заболување кај пошироко семејство е прикажана на следново родословно стебло. Определете кој е најверојатниот тип на наследување на заболувањето под претпоставка дека е целосно пенетрантно.

**Решение:** Од родословното стебло е забележливо дека заболувањето се јавува само кај машките индивидуи, па, најверојатно, не е во прашање автозомно доминантен, ниту автозомно рецесивен тип на наследување кои подеднакво би ги афектирале и машките и женските лица. Во прилог на заклучокот дека состојбата не е автозомно доминантна е и фактот што заболените членови немаат заболен родител.

Појавата на фенотипот само кај машките членови може да укажува на наследување врзано со Y-хромозомот, но, во таквиот случај заболените татковци секогаш би ја пренесувале болеста на сите своите синови, што не е случај со ова семејство (заболената индивидуа II-6 има четири здрави синови, на пример). Доминантното наследување врзано со X-хромозомот може, исто така, да се отфрли, поради тоа што заболените машки индивидуи не ја пренесуваат болеста кај сите женски потомци (на пример, таткото II-6 има неафектирана ќерка III-9).

Од родословното стебло се забележува и дека заболените машки индивидуи се родени од здрави мајки, што е во прилог на рецесивното наследување врзано со X-хромозомот. Како што е претходно објаснето, при ваквиот тип наследување многу почесто заболуваат машките членови на афектираното семејство, што е случај и со прикажаното. Уште една важна карактеристика е отсуството на пренесување на болеста од татко на син.

Може да се претпостави дека индивидуите II-3 и III-9 се можни преносители поради тоа што околу 50% од нивните машки деца се заболени.

**ПБ-19:** Според официјалните податоци пресметано е дека во јануари 2009 година на планетата има околу 6,7 милијарди ( $6,7 \times 10^9$ ) луѓе. Сегашните сознанија индицираат дека секоја индивидуа има по околу 30 000 гени ( $0,3 \times 10^5$ ), а просечната мутациска стапка изнесува  $10^{-5}$  во секој локус.

- Пресметајте колку изнесува вкупниот број спонтани мутации во човечката популација.
- Пресметајте колку нови мутации се појавиле во секој ген од човечката популација, под претпоставка дека мутациите се рамномерно распоредени во гените.

**Решение:** Со оглед на тоа што секоја индивидуа е диплоидна, секој ген е присутен со по две алели кои потекнуваат од двата родитела.

- Вкупниот број на спонтани мутации може да се пресмета на следниов начин:  
 $(2 \times 0,3 \times 10^5 \text{ гени / индивидуа}) \times (6,7 \times 10^9 \text{ индивидуи}) \times (10^{-5} \text{ мутации / ген}) =$   
 $= (0,6 \times 10^5) \times (6,7 \times 10^9) \times (10^{-5}) =$   
 $= 4,02 \times 10^9 \text{ мутации во човековата популација.}$
- Бројот на нови мутации во секој ген од човековата популација е:  
 $4,02 \times 10^9 \text{ мутации} / 0,6 \times 10^5 \text{ гени} = 6,7 \times 10^4 \text{ мутации во секој ген од популацијата.}$

**ПБ-20:** Кој од наведените парови олигонуклеотидни прајмери можат да се користат за PCR-амплификација на следниов DNA-молекул:

5'-AGGCACTCAGACGACGTGTACGTACGTACACGCGGGTAGGCACCCTTA-3'  
 3'-TCCGTGAGTCTGCTGCACATGCATGCATGTGCGCCCATCCGTGGGAAT-5'

парови прајмери:

- 5'-AGGCGGGTAG-3' и 3'-TCCGTGGGAAT-5'
- 5'-AGGCACTCAG-3' и 5'-TAATGGGTGCC-3'
- 5'-TCCGTGAGTC-3' и 3'-TAATGGGTGCC-5'

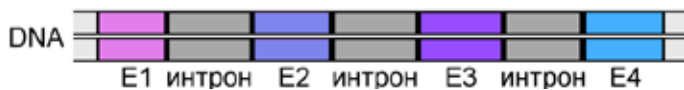
**Решение:** За стандардната PCR амплификација потребни се два прајмера кои анилираат со бочните краеве од двете спротивни вериги на матичната DNA. Потребно е да се обрне внимание на антипаралелната поставеност на секој прајмер при анилирање со комплементарната верига од матичната двоверижна DNA. Заради правилото на пишување на нуклеинските киселини во правец 5'→3', по еден прајмер од секој пар е напишан во обратна ориентација во однос на онаа при која анилира (3'→5').

Решението е парот прајмери означени со б, како што е прикажано подолу:

5'-AGGCACTCAGACGACGTGTACGTACGTACACGCGGGTAGGCACCCTTA-3'  
 3'-CCGTGGGAAT-5'

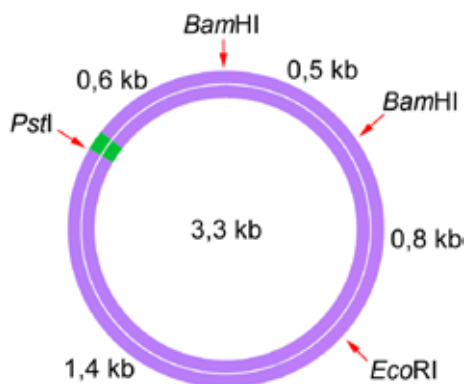
5'-AGGCACTCAG-3'  
 3'-TCCGTGAGTCTGCTGCACATGCATGCATGTGCGCCCATCCGTGGGAAT-5'

**ПБ-21:** На следнава шема поедноставено е прикажана кодирачката секвенца на генот составен од четири егзони и три интрони. Наведете ги комбинациите на егзони кои можат да се добијат со алтернативниот сплајсинг под услов егзоните 1 и 4 да се присутни во сите варијанти кои настануваат со преспојувањето на овој ген.



**Решение:** Со таквите ограничувања на преспојувањето, единствено можни се следни-ве варијанти: E1 + E2 + E3 + E4; E1 + E3 + E4; E1 + E2 + E4 и E1 + E4.

**ПБ-22:** На следнава шема прикажана е рестрикциската мапа на определен плазмид:



Пресметајте ги должините на DNA-фрагментите кои би се добиле при рестрикциска дигестија со:

- Bam*HI
- Eco*RI
- Bam*HI и *Eco*RI истовремено

**Решение:** Со собирање на вредностите на прикажаните растојанија меѓу рестрикциските места можат да се пресметаат должините на дигестиските фрагменти:

- Со ензимот *Bam*HI би се добиле два фрагмента: со 0,5 и со 2,8 kb.
- Со *Eco*RI би се добил само еден фрагмент со должина од 3,3 kb, т.е. би се линеаризирал плазмидниот циркуларен DNA-молекул
- Со двата ензима *Bam*HI и *Eco*RI истовремено би се добиле три фрагмента со должина од: 0,5, 0,8 и 2,0 kb.

# РЕЧНИК НА ЧЕСТО КОРИСТЕНИ ИЗРАЗИ И КРАТЕНКИ

## Прилог В

**3'-бочен регион** - DNA-секвенца лоцирана низводно (во 3' насока) од генот, не се наоѓа во зрелите mRNA-молекули, но, влијае врз формирањето на нивните 3'-краеви. Овој регион може да содржи засилувачи (енхенцери) и други секвенци со кои се врзуваат регулаторни протеини.

**3'-непреводлив регион (3'-untranslated region, 3'-UTR)** - дел од генот кој се транскрибира во mRNA и станува нејзин 3'-крај, но, не содржи секвенца што кодира протеини. Иако самиот не подлежи на транслација, овој регион содржи секвенца неопходна за додавање на полиаденилатната опашка - poly(A) на 3' крајот од mRNA-молекулите, а може да влијае и врз ефективноста на транслацијата на mRNA или врз нејзината стабилност.

**5'-бочен регион** - DNA-секвенца лоцирана спротиводно (во 5' насока) од генот која не се транскрибира во mRNA. Во овој регион се наоѓа промоторот, а може да има и енхенцер и други секвенци на кои се врзуваат протеини (транскрипциски фактори).

**5'-непреводлив регион (5'-untranslated region, 5'-UTR)** - дел од генот кој се транскрибира во mRNA и станува нејзин 5'-крај, но, не содржи секвенца што кодира протеини. Иако самиот не подлежи на транслација, овој регион содржи секвенци кои можат да влијаат врз ефективноста на транслацијата или врз стабилноста на mRNA-молекулите.

**автордиографија** - техника при која макромолекулите во микроскопски пресек или електрофоретски гел се визуализираат преку радиоизотопи по што се експонира рендгенски филм.

**автозом** - кој било хромозом освен половите хромозоми (X и Y). Луѓето, на пример, имаат 22 пара на автозомни хромозоми.

**агароза** - хидролитички дериват на природниот агар-агар од кој може да се формира гел што се користи за електрофоретско раздвојување на нуклеински киселини.

**аденин (А)** - пуринска база која се спарува со тимин од комплементарната верига во DNA-хеликсот.

**аденозин** - нуклеозид чија азотна база е аденин.

**акриламид** - мономер кој заедно со бис акриламид и со соодветни катализатори формира полиакриламиден гел што се користи за електрофоретско раздвојување на макромолекули.

**алел** - алтернативна форма на ген во определен генетски локус. Кај диплоидните организми, едниот од двете алели се наследува од мајката, а другиот од таткото. Различните алели предизвикуваат варијации во наследните карактеристики, какви што се бојата на очите или крвните групи кај различни индивидуи.

**алогеничност** - термин за две генетички различни единки од ист вид. На пример, освен монозиготните (еднојајчани) близнаци, сите луѓе се алогенични.

**алтернативен сплајсинг** - процес при кој се формираат различни mRNA-молекули од ист примарен транскрипт. Овој процес настанува со различно сплајсирање на примарниот транскрипт во една иста клетка или во различни ткива на организмот.

**Alu-елемент** - најчестата репетитивна DNA-секвенца која е дисперзирана низ хуманиот геном со стотици илјади копии со што опфаќа околу 11% од вкупната геномска DNA. Овој елемент има должина од околу 300 нуклеотиди, а името го добил според рестрикциската ендонуклеаза која го препознава и го пресекува.

**амплификација** - умножување на DNA-молекулот во поголем број идентични копии. Во лабораториски услови амплификацијата најчесто се врши *in vitro* преку молекуларно клонирање или *in vivo* со полимеразната верижна реакција (PCR).

**амплексон (PCR продукт)** - DNA-сегмент амплифициран во огромен број идентични копии со полимеразната верижна реакција (PCR) или со молекуларно клонирање.

**амплимер** - регион од DNA-молекулот кој се амплифицира со полимеразната верижна реакција (PCR). Регионот е дефиниран со парот на иницирачки олигонуклеотиди (прајмери).

***Arabidopsis thaliana*** - цветно растение од фамилијата *Brassicaceae* кое има мошне мал геном (околу 140 Mb) и речиси не содржи репетитивна DNA. *Arabidopsis* е најчесто користен виш растителен модел во генетиката поради кусиот репродуктивен циклус, природното самоопрашување и присуството на пет мали хромозоми.

**асемблирање** - склопување на секвенците од повеќе преклопувачки DNA-фрагменти во точен редослед, како што се нативно распоредени во хромозомите. Асемблирањето е една од најважните операции при геномското секвенционирање.

**базен (нуклеотиден) пар** - два комплементарни нуклеотида од двете вериги на DNA



поврзани со водородни врски.

**бактериофаг** - *видејте* фаг

**бактериски вештачки хромозом (*bacterial artificial chromosome, BAC*)** - вектор синтетски конструиран од F плазмидот со помош на генетски инженеринг. Се користи за клонирање на големи DNA-фрагменти со должина од 100 до 200 kb (илјадници базни пара).

**BLAST** - компјутерски програма за идентификација на хомологни (слични) гени или на DNA-секвенци од различни организми (споредување на генот за некој ензим кај *Homo sapiens*, *Drosophila melanogaster* и *Cenorabditis elegans*, на пример).

**вектор** - молекуларно „возило“ кое се користи при клонирањето за трансформација на клетките со егзогена (туѓа) DNA. Најчесто користени вектори се природните или генетски модифицирани плаزمиди, бактериофази, вируси, како и синтетските вектори - космиди, фагемиди и вештачки (артифициелни) хромозоми.

**вестерн блотинг (*Western blotting*)** - техника при која протеинските молекули најпрво се раздвојуваат електрофоретски, се пренесуваат врз нитроцелулозна или друга мембрана и се визуализираат со обележано специфично антителио.

**вирус** - безклеточен биолошки ентитет кој во инфицираните клетки има свој репродуктивен циклус. Поедноставено, вирусите се состојат од нуклеински киселини пакувани во обвивка од протеини и други молекули.

**наследен (херeditарен)** - фенотипска карактеристика, најчесто заболување) кое е резулата на генетски дефект.

**ген** - фундаментална структурна и функционална единица на наследувањето; наследна детерминанта на фенотипот. Во молекуларно-генетска смисла, генот е составен од целокупната DNA-секвенца која е вклучена во кодирањето на полипептиди или функционални RNA-молекули (tRNA и rRNA). Во состав на генот се и контролните регулаторни секвенци (промотори) неопходни за транскрипција, бочните и непреводливите региони и интроните.

**геном** - целокупниот генетски материјал на определен биолошки ентитет. Во потесна смисла, обично се однесува на нуклеарниот (хромозомски) геном, додека посебно се означуваат митохондрискиот или хлоропластниот геном.

**геномика** - научна дисциплина која ги проучува структурата, функцијата и еволуцијата на целокупните геноми од организмите, користејќи ги методите на молекуларно карактеризирање и клонирање.

**геномска библиотека** - колекција на DNA-клонови што содржат фрагменти од целокупниот геном на испитуваниот организам.

**геномска DNA** - целокупната DNA во определени клетки на организмот, вклучувајќи ги и нефункционалните и репетитивните DNA-секвенци.

**генотип** - вкупниот сет на гени во една клетка или организам.

**гласничка RNA (mRNA)** - тип на информациски RNA-молекули кои настануваат по процесирањето на примарниот RNA-транскрипт. Кај еукариотите, секвенците кои одговараат на интроните се отстранети од зрелата mRNA, а освен тоа присутна е 7-метилгуанозинска „капа“ на 5'- и полиаденинска „опашка“ на 3'-крајот.

**гуанин (Г, G)** - пуринска база која се спарува со цитозин.

**гуанозин** - нуклеозид чија азотна база е гуанин.

**гуанозинска Капа (cap, 7-mG cap)** - 7-метилгуанозински остаток присутен на 5'-крајот од mRNA-молекулите.

**DDGE - (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, гел-електрофореза со денатуирачки градиент)** - метод за детекција на мутации и полиморфизми во амплифицирана DNA преку разликите во подвижноста при електрофореза во гел со растечки градиент на хемиски денатурант.

**деоксирибонуклеаза (DN-аза)** - ензим кој дејствува хидролитички врз DNA-молекулите и со тоа ги разградува.

**делеција** - губење на сегмент од хромозомскиот материјал. На ниво на DNA, делецијата се дефинира како отсуство на еден или на поголем број нуклеотиди кои нормално се присутни во DNA-молекулот од дивиот тип.

**денатуирачка електрофореза** - техника за електрофоретско раздвојување на макро-молекулите во денатурачки услови. Притоа, DNA-молекулите патуваат како едноверижни, а протеините како денатуирани, линеаризирани молекули без секундарна, терциерна и кватернарна структура.

**див тип (wild type, wt)** - нативен, немутиран генотип или фенотип кај биолошките организми кој се наоѓа кај поголемиот број на индивидуи од определен вид во природата или во нормални лабораториски услови.

**DNA-полимераза** - ензим кој ја катализира синтезата на нова DNA-верига од DNA-урнек. Покрај синтезата на DNA, некои DNA-полимерази имаат и нуклеазна активност.

**доминантен алел** - чија фенотипска карактеристика се експримира и во хетерозиготна и во хомозиготна состојба. При хетерозиготна состојба, доминантиот алел целосно ја потиснува експресијата на рецесивниот алел.

**егзон** - еден или повеќе континуирани нуклеотидни секвенци од генот кои директно кодираат протеини. Секвенците на егзоните не се отстрануваат од примарниот транскрипт, па, се присутни во mRNA молекулите. Кај еукариотите, речиси, сите гени содржат повеќе егзони раздвоени со интервенирачки секвенци (интрони).

**егзонуклеаза** - ензим кој катализира разградување на фосфодиестерските врски на полинуклеотидот, почнувајќи од еден од неговите краеве (5' или 3'). На пример, егзону-

клеазата III ја разградува исклучиво двоверижната DNA од спротивните 3'-краеви од двете вериги.

**екстракција** - процедура на издвојување на определени супстанција од хетерогена смеша. Во молекуларната биологија обично се однесува на екстракција на нуклеинските киселини (DNA или RNA) од хомогенизиран биолошки материјал. Екстракцијата се заснова на разликите во физичко-хемиските својства меѓу молекулите кои се издвојуваат и преостанатите молекули.

**електрофореза** - електрохемиски процес на движење на макромолекулите (нуклеински киселини и протеини) во електрично поле. Раздвојувањето се заснова врз разликите во електростатскиот полнеж и/или големината на макромолекулите со што варира брзината на нивното движење низ електрофоретскиот медиум. Се користи за раздвојување и пречистување на макромолекулите, од што произлегуваат изразите аналитичка и препаративни електрофореза, соодветно.

**ендонуклеаза** - ензим кој катализира разградување на фосфодиестерските врски на полинуклеотидот од која било позиција, освен од краевите. Најчесто нуклеазната активност на овие ензими е ограничена со присуство на определена секвенца и во тој случај се означуваат како рестрикциски ендонуклеази.

**засилувач (*enhancer*)** - *cis*-регулаторна DNA-секвенца која го зголемува нивото на транскрипција на генот врз кого влијае. Засилувачите се наоѓаат 5', 3' или меѓу самата кодирачка секвенца на генот. Можат да дејствуваат од големи растојанија (десетици илјади базни парови) врз експресијата на гените. Засилувачите се често специфични за ткивата, резултирајќи со експресија на различни гени во различните ткива на вишите организми.

**извор на репликацијата - *origin (replication origin)*** - регион во DNA-молекулите (во хромозомите и во векторите) каде започнува раздвојувањето на двете комплементарни вериги и започнува репликацијата на DNA.

**информациска RNA** - класа на RNA-молекули која ги опфаќа примарните RNA-транскрипти и зрелите mRNA-молекули.

**иницијациски (старт) кодон** - триплет на нуклеотиди кој кодира почеток на трансляцијата на протеинот. Кај еукариотите, тоа е обично првиот AUG-кодон лоциран околу 30 нуклеотиди во 5'-насока од местото на започнување на транскрипцијата (секвенцата за Икапирањев). Соседните секвенци околу иницијацискиот кодон се, исто така, важни и можат да придонесат првиот AUG-кодон да биде пропуштен при скенирањето од страна на рибозомот, по што полипептидната синтеза започнува од следниот AUG-кодон.

**интрон (интервенирачка секвенца)** - DNA-сегменти со нејасна функција и со различна должина кои не кодираат полипептиди, но, се наоѓаат меѓу егзоните на гените. Иницијално се транскрибираат, но, подоцна се отстрануваат од примарниот RNA-транскрипт со процесот на сплајсинг. Се претпоставува дека интроните можат да имаат улога во создавањето на генетскиот диверзитет.

**јадренце (нуклеолус)** - органела во јадрото (нуклеус) која содржи rRNA-молекули. Во хромозомските региони структурно асоцирани со нуклеолусот се наоѓаат DNA-сегменти што содржат амплифицирани, мултипли копии на гените за rRNA.

**кватернарна структура** - структурно и функционално организирање на протеинските субединици во мултимери, ковалентно врзани со дисулфидни мостови.

**киназа** - ензим кој катализира трансфер на  $\gamma$ -фосфатната група од аденозин трифосфат (ATP) врз 5'-хидроксилната група од нуклеинските киселини или врз соодветна група од протеинските молекули.

**Кленоу (*Klenow*) фрагмент** - изолирана бактериска DNA-полимераза која е модифицирана со цел да ја задржи исклучиво својата DNA-полимеразна (синтетска) способност, елиминирајќи ја 5'  $\rightarrow$  3' егзонуклеазната активност.

**клон** - во молекуларно-генетска смисла, клонот е група од генетски идентични индивидуи или клетки добиени со асексуално размножување на ист претходник.

**комплементарна DNA (*cDNA*)** - DNA-молекул добиен со реверзна транскрипција од RNA-урнек. Ензимската синтеза на cDNA се врши со RNA-зависна DNA-полимераза наречена и реверзна транскриптаза (RT).

**конгенитален** - вроден фенотип, најчесто некое заболување или патолошка малформација или слична карактеристика. Конгениталните заболувања најчесто се наследни, но, постојат и многу исклучоци кога причината за нивното настанување не е генетско, туку е резултат на негативни влијанија на определени тератогени агенси или други фактори во текот на бременоста. За споредба, видете *наследни*

**контиг** - два или повеќе линеарни DNA-фрагменти распоредени во континуирана низа врз основа на преклопување на секвенците од краевите на фрагментите.

**Козакова (*Kozak*) секвенца** - консензусна нуклеотидна секвенца во геномите на вишите еукариоти, особено кај цицачите, непосредно пред иницијациониот кодон. Се смета дека Козаковата секвенца во зрелите mRNA-молекули има улога на место за врзување на рибозомот.

**локус** - хромозомска локација на некој ген. Диплоидните организми имаат по две адели за секој генски локус сместени на двата хомоложни хромозома. Исклучок се хаплоидните полови хромозоми (на машките единки кај цицачите) кои имаат само по еден алел од определен локус.

**мали нуклеарни RNA-молекули (*snRNA, small nuclear RNA*)** - се наоѓаат во јадрото и не учествуваат директно во синтезата на протеините, но, се инволвирани во сплајсингот на mRNA. Имаат должина од 90 до 300 нуклеотиди.

**мали нуклеоларни RNA-молекули (*snoRNA, small nucleolar RNA*)** - лоцирани се во регионот на нуклеолусот и учествуваат во процесирањето и хемиското модифицирање на прекурзорите на рибозомските RNA-молекули.

**маркер за селекција** - ген за резистенција кон антибиотици присутен во плазмидите со кој се врши селекција на рекомбинираниите бактериски клетки во кои се размножуваат овие плазмиди.

**матична DNA (или RNA)** - полинуклеотидна верига која има улога на урнек врз кој се врши синтеза на комплементарни, антипаралелни молекули на DNA (или RNA).

**митохондриска DNA (mtDNA)** - циркуларни двоверижни DNA-молекули присутни во  $10^3$  до  $10^4$  копии во секоја митохондрија. Митохондрискиот геном кај цицачите е со должина од 16,5 илјади базни пара и кодира 13 полипептиди, две рибозомски и 22 транспортни RNA-молекули.

**молекуларно клонирање** - процес на *in vivo* амплификација преку создавање на голем број идентични копии на некој ген, негов дел или друга DNA-секвенца. Клонирањето се врши со инсерција на DNA-фрагментот во соодветен вектор (плазмид, бактериофаг, космид, вирус или вештачки хромозом).

**mRNA** - *видетѝе* гласничка RNA

**мутација** - генските мутации се промени (варијации) во нуклеотидната секвенца кои можат да предизвикаат разни заболувања и фенотипски промени, а настануваат спонтано или се индуцирани од надворешни фактори-мутагени. Обично мутациите се присутни во помалку од 1% кај индивидуите од определена популација, по што се разликуваат од полиморфизмите.

**несинонимни (*missense*) мутации** - нуклеотидни супституции кај кои мутираниот кодон резултира со различен аминокиселински остаток во однос на дивниот тип при што обично се губи или се менува функцијата и структурата на протеинот кодиран од мутираниот ген.

**неутрални или синонимни мутации** - нуклеотидни супституции кај кои мутираниот кодон резултира со различна, но, функционално еквивалентна аминокиселина при што обично не се менува функцијата или структурата на протеинот кодиран од мутираниот ген.

***northern blotting*** - техника при која RNA-молекулите се раздвојуваат електрофоретски, се пренесуваат врз најлонска или нитроцелулозна мембрана и се визуализираат со обележана комплементарна DNA или RNA-сонда.

**нуклеаза** - ензим кој катализира разградување на фосфодиестерските врски на нуклеинските киселини. Според дејството врз полинуклеотидот, се означуваат како ендо- или егзонуклеази. Имаат исклучително важна улога во генетскиот инженеринг и во молекуларната биологија.

**нуклеотид** - основен градбен блок во DNA и во RNA-молекулите. Нуклеотидот е составен од ковалентно поврзана азотна база (пуринска или пиримидинска), шеќер (деоксирибоза кај DNA, рибоза кај RNA) и фосфатна група.

**нуклеозид** - азотна база (пуринска или пиримидинска), ковалентно врзана со шеќер

(деоксирибоза кај DNA, рибоза кај RNA).

**пиримидин** - тип на азотна база. Во DNA-молекулите пиримидински бази се тимин и цитозин. Кај RNA-молекулите, наместо тимин се наоѓа урацил.

**полиаденилација** - процес на додавање на 50 до 300 аденински нуклеотиди кои формираат полиаденинска „опашка“ на 3'-крајот од примарниот RNA-транскрипт.

**полиморфизам** - варијација во нуклеотидната секвенца која може, но, и не мора да предизвика фено-типски промени, но, која е присутна кај повеќе од 1% кај индивидуите во определена популација.

**полилинкери** - низи специфични рестрикциски позиции (места) кои се повторуваат едно по друго во определен регион на плазмидите и се подобно место за инсерција на егзогената (туѓа) DNA при молекуларното клонирање.

**прајмер (иницирачки олигонуклеотид, *primer*)** - едноверижен олионуклеотид со должина од 18 до 30 нуклеотиди кој може да анилира со комплементарната секвенца од матичната DNA при репликацијата. Прајмерите се неопходни за иницирање на активноста на DNA-полимеразите кои вршат синтеза почнувајќи од 3'-крајот на анилираниот прајмер. Во лабораториски цели, прајмерите се користат кај полимеразната верижна реакција (PCR).

**примарен транскрипциски продукт (примарен, иницијален, непроцесиран транскрипт)** RNA-молекулот непосредно по транскрипцијата од DNA урнекот. Покрај кодирачките секвенци за полипептидна синтеза, во примарниот транскрипциски продукт се препишани и секвенците од интроните, од бочните и од непрводливите региони.

**примарна структура** - кај нуклеинските киселини се однесува на нуклеотидната секвенца (линеарниот редослед на нуклеотиди) во DNA или RNA-веригата, додека кај протеините на аминокиселинската секвенца (редоследот на аминокиселинските остатоци) во полипептидната верига.

**продолжувачки (*sense*) мутации** - нуклеотидни супституции со промена на терминацискиот кодон во кодирачки. Поради тоа транслацијата продолжува сè до следниот терминациски кодон, па, настанува абнормално долга полипептидна верига.

**промотор** - регион од DNA-молекулот за која се врзува RNA-полимеразата при генската транскрипција.

**протеазом** - молекуласка машина составена од поголем број протеински молекули чија основна функција е деградација на протеините кои се обележани со убиквитин.

**протеом** - целокупниот збир на протеини синтетизирани од клетката, од организмот или од клеточна популација.

**протеомика** - научна дисциплина во која се проучува целокупниот збир на протеини синтетизирани од клетката, од организмот или од клеточна популација.

**пурин** - тип на азотна база. Во DNA и RNA-молекулите, пурински бази се аденинот и гуанинот.

**PFGE (*Pulse Field Gel Electrophoresis*, гел-електрофореза во пулсно поле)** - техника на електрофореза на DNA-молекули при која насоката на електричното поле периодично (пулсно) се менува. Се користи за раздвојување на големи DNA-фрагменти и на цели хромозоми, со должина од 1, па, сè до 10 милиони базни парови (1 до 10 Mbp).

**рамка на читање** (англ. *reading frame*) - DNA-секвенца која е определена со редоследот на триплетите на бази (кодони), почнувајќи од иницијациониот (старт) кодон и завршувајќи со терминациониот (стоп) кодон.

**реверзна транскриптаза (RT)** - ензим кој врши синтеза на DNA според RNA-урнек и е карактеристичен за некои вируси (ретровируси) а во лабораториски цели се користи при реверзно-транскриптазната полимеразна верижна реакција (RT-PCR).

**рекомбинација** - кај молекуларното клонирање тоа е процес на инсерција на егзоген (туѓ) DNA-молекул во автономно реплицирачки вектор. Во поширока генетска смисла, рекомбинацијата се одвива кај диплоидните или делумно диплоидните организми и резултира со нови гени или хромозомски комбинации кои не се присутни во клетката или во нејзините прогенитори. Рекомбинацијата се однесува и на процесот на размена на генетски материјал (*crossing-over*) меѓу хомологните хромозоми во текот на мејозата.

**репетитивна DNA** - геномите на вишите организми содржат повеќе од 50% репетитивни секвенци без позната функција. Меѓу нив се репетитивните секвенци во центромерниот хроматин и репетитивните тандем-секвенци со различна должина (VNTR), но, најголем дел (повеќе од 45%) се однесува на транспозоните и ретро-транспозоните. Во потесна молекуларно-генетска смисла, во репетитивната DNA се класифицирани и функционални секвенци, како што се фамилиите на гени дисперзирани по геномот (за актин, хистони и други), гените присутни во тандем (за rRNA), како и функционалните, но, некодирачки секвенци (теломерни репетиции).

**рецесивен алел** - чијшто фенотипски ефект не се манифестира во хетерозиготна состојба.

**рибонуклеаза (RN-аза)** - ензим кој дејствува хидролитички врз RNA-молекулите и со тоа ги разградува.

**рибонуклеинска киселина (RNA)** - едноверижен, многу ретко двоверижен полинуклеотид граден слично како DNA. За разлика од деоксирибозата кај DNA, во RNA-молекулите е присутен шеќерот рибоза, а наместо тимин, во RNA е присутен урацил.

**рибозомска RNA (rRNA)** - RNA-молекули кои учествуваат во структурата и во функцијата на рибозомите, а со тоа и во клеточната транслаторна машинерија. Од



сите RNA-молекули во еукариотските клетки, класата на rRNA е присутна во највисока концентрација. Кај прокариотите се наоѓаат три типа на rRNA молекули, означени според Сведберговиот коефициент на седиментација: 16S, 5S и 23S. Кај еукариотите има четири типа rRNA: 18S, 5,8S, 28S и 5S. Гените за rRNA кај еукариотските организми се наоѓаат во DNA-регионите означени како нуклеоларни организатори.

**RNA-интерференција** - молекуларен механизам за потиснување на генската експресија на посттранскрипциско ниво кој е широко распространет низ биолошките организми. Се означува и како **PTGS** (од англ. *posttranscriptional gene silencing*).

**RNA-полимераза** - ензим кој ја катализира синтезата на RNA-веригата од DNA-урнек, односно ја врши транскрипцијата (препишувањето). Прокариотите имаат само еден тип на RNA-полимераза. Кај еукариотите, транскрипцијата на структурните гени кои кодираат протеини ја врши RNA-полимеразата II, додека RNA-полимеразата I е задолжена за транскрипција на рибозомските RNA-молекули (18S, 5,8S и 28S rRNA). RNA-полимеразата III врши синтеза на 5S рибозомската и на некои други мали RNA-молекули.

**RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism, полиморфизам на должината на рестрикциските фрагменти)** - акроним со кој се означуваат разликите во должината на фрагментите при рестрикциска дигестија на геномската DNA од две различни индивидуи. Причина за тоа се малите разлики во нуклеотидната секвенца меѓу, речиси, идентичните геноми на индивидуите кои се споредуваат. Тоа резултира со појава или отсуство на рестрикциски позиции (места), па, при дигестија со една или повеќе рестрикциски ендонуклеази, настануваат DNA фрагменти со различна должина.

**Сатерн блотинг (Southern blotting)** - техника при која DNA-молекулите се раздвојуваат со гел-електрофореза, се пренесуваат од гелот врз најлонска или нитроцелулозна мембрана и се визуализираат со соодветно обележана комплементарна DNA сонда.

**SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis, електирофореза во њолиакриламиден гел со њприсуство на најтриум додецил сулфат)** - електрофоретска техника која исклучително често се користи за раздвојување на протеински молекули според молекулската маса. Покрај аналитичката и препаративната електрофореза на протеини, оваа техника е неопходен чекор во вестерн блотинг имунодетекциската анализа.

**секвенционирање** - определување на редоследот на нуклеотидите по должина на линеарниот или циркуларен DNA-молекул или на редоследот на аминокиселините во полипептидниот молекул.

**секундарна структура** - создавање на двоверижна DNA преку воспоставување водородни врски меѓу комплементарните нуклеотиди. Кај RNA-молекулите подразбира создавање структури преку интра- и интермолекуларни водородни врски меѓу комплементарните рибонуклеотиди. Кај протеините, секундарната структу-

ра подразбира просторно организирање на полипептидната верига во регуларни структури какви што се на  $\alpha$ -хеликсот,  $\beta$ -планарната структура и на  $\beta$ -завојот.

**сингеничност** - термин за две генетски идентични единки од ист вид, какви што се монозиготните (еднојајчани) близнаци.

**синонимни (тивки, *silent*) мутации** - нуклеотидни супституции кај кои промената на триплетот (кодонот) не резултира со промена на аминокиселината во протеинскиот продукт на генот.

**синтенија** - конзервираност на редоследот на гени во DNA-молекулот, односно во хромозомските сегменти од два различни биолошки вида.

**сонда (DNA, RNA или олигонуклеотидна)** - едноверижниот DNA или RNA-молекул со различна должина, ковалентно обележан со радиоизотоп, флуоресцентен или друг маркер. Врзувањето (хибридизацијата) на обележаната сонда со испитуваната денатурирана DNA или RNA може да се визуализира преку маркерот со кој е обележана сондата.

**сплајсинг (*splicing*)** - процес на преспојување на примарниот RNA-транскрипт (незрел mRNA-молекул) кај еукариотите со кој се отстрануваат нуклеотидните секвенци на интроните.

**SSCP (*Single-Strand Conformation Polymorphism*, полиморфизам на конформацијата на еднинечните вериги)** - електрофоретски метод за детекција на мутации и полиморфизми во амплифицирана DNA преку разликите во подвижноста при електрофорезата.

**стивнувач (*silencer*)** - *cis*-регулаторна DNA-секвенца која го намалува нивото на транскрипција на генот врз кого влијае. Стивнувачите, слично како и засилувачите, се наоѓаат во 5'-, 3'-насока или, пак, во самиот ген и дејствуваат од големи растојанија (десетици илјади базни парови) врз гените.

**супклонирање** - молекуларно клонирање на DNA-фрагмент претходно амплифициран со клонирање или со PCR. Означува и трансфер на DNA-фрагмент од еден вектор во друг.

**Taq полимераза** - DNA-полимераза изолирана од термофилната бактерија *Thermus aquaticus*. Поради изразената термостабилност, оваа полимераза екстензивно се користи за амплификација во полимеразната верижна реакција (PCR).

**TATA секвенца (*TATA box*, *Goldberg-Hogness box*)** - куса нуклеотидна секвенца најчесто лоцирана во близина на иницијациониот кодон од генот.

**терциерна структура** - кај нуклеинските киселини подразбира организирање на циркуларната двоверижна DNA во хеликална и суперспирална структура или на едноверижните RNA-молекули во сложени тридимензионални структури со помош на водородните врски. Кај протеините, терциерната структура се однесува на просторно организирање на секундарните структури во тридимензионалната

конфигурација со помош на слабите хемиски сили и интеракции.

**терминирачки мутации (*nonsense*)** - нуклеотидни супституции кои резултираат со мутиран кодон (триплет) за кого не постои tRNA молекул, па, кодира терминациски сигнал. Последователната транслација на протеинскиот продукт запира со што полипептидната верига е покуса.

**тимидин** - нуклеозид чија азотна база е тимин.

**тимин (Т)** - пиримидинска база во DNA-молекулот; се спарува со аденин.

**trans-активен ген** - кој дејствува или кооперира со друг ген сместен на различна хроматида.

**трансдукција** - пренос на гени од бактеријата-донатор во бактеријата-рецептор преку фаг (бактериофаг).

**трансфекција** - процес при кој егзогена (туѓа) DNA се внесува во клетките со помош на вектор.

**трансформација** - процес при кој егзогената (туѓа) DNA директно се внесува во клетките без вектор.

**трансгенски организам** - биолошки ентитет чиј геном е модифициран со експериментално воведување на модифициран DNA-молекул.

**транскриптом** - целокупниот сет на RNA-транскрипти и mRNA-молекули синтетизирани од популација на клетки или во култура на клетки.

**транскрипција** - синтеза на RNA верига од DNA урнек при што настанува примарен RNA-транскрипциски продукт. Кај еукариотите, со процесирање на примарниот транскрипт настанува mRNA.

**транскрипциски фактор** - протеин инволвиран во регулација на RNA-транскрипцијата.

**транспортна RNA (*tRNA*, трансфер RNA)** - класа на функционални, мали RNA-молекули со специфична секундарна структура чија улога е пренос на аминокиселините до рибозомите во тек на транслацијата. Постојат 20 типа tRNA-молекули, за секоја аминокиселина по една. На едниот крај од tRNA-молекулот се наоѓа антикодон, т.е. триплет на бази кој го препознава кодонот од mRNA-молекулот. На другиот крај од tRNA се наоѓа адаптер со ковалентно врзаната аминокиселина која се вметнува во рибозомот во полипептидната верига чија синтеза е во тек.

**транспозон** - мобилен генски елемент со репетитивни секвенци на двата краја. Транспозоните се присутни во геномите на повеќето еукариоти и можат да „скокаат“ менувајќи ја својата позиција во геномот.

**трансверзии** - супституции на пуринска нуклеотидна база од DNA-секвенцата со пи-

римидинска и обратно (аденин со тимин или цитозин со гуанин, на пример).

**транзиции** - супституции на пиримидински нуклеотид (тимин или цитозин) од DNA-секвенцата со различен, но, исто така пиримидински, нуклеотид (тимин со цитозин, или цитозин со тимин).

**убиквитин** - еволутивно високо конзервиран протеин кој ковалентно се врзува со други протеински молекули и го насочува кон деградација во протеазом.

**уридин** - нуклеозид чија азотна база е урацил.

**урацил (У, U)** - пиримидинска база која се наоѓа во RNA-молекулите наместо тимин во DNA-молекулите. Урацилот се спарува со аденин.

**фаг (бактериофаг)** - вирус кој инфицира бактериски клетки. Екстензивно се користи како вектор во генетскиот инженеринг и рекомбинантната DNA-технологија.

**мутации со промена на рамката на читање (*frame-shift*)** - кај кои адицијата (инсерција) или делецијата на еден или повеќе нуклеотидни пара доведува до поместување на рамката за читање на кодоните. *Frame-shift* мутациите не се јавуваат кога бројот на инсертираните или делетираните нуклеотидни парови е 3 или производ од 3, бидејќи во тие случаи не се менува рамката на читање.

**Фугу (*Fugu rubripes*, *Pisces: Tetraodontidae*; **риба-балон; pufferfish**)** - важен вертебрален модел во геномиката и во молекуларната генетика. Иако содржи, речиси, ист број на гени како кај цицачите, геномот на оваа риба е околу 9 пати помал (365 Mb) и содржи околу 6 пати помалку репетитивна DNA, со што значително ја олеснува компаративната геномска анализа со хуманиот геном.

**хаплотип** - група гени кои кодираат различни протеини, но, на хромозомот се лоцирани меѓусебно блиску, па, се наследуваат „врзани“ како една наследна единица.

***Caenorhabditis elegans*** - почвена валчеста нематода помала од 1 mm, еден од најекстензивно користените анимални модели во генетиката. Во 1998 година е завршено секвенционирањето на геномот на оваа нематода, што е и прв целосно секвенциониран геном на некој анимален организам.

***cis*-активен ген** - кој дејствува или кооперира со друг ген сместен на истата хроматида.

***CpG* островчиња** - секвенци во кои едноподруго се повторува динуклеотидот *CG* (5'-цитозин-гуанин-3'). Обично се наоѓаат спротиводно (во 5'-насока) од иницијациониот кодон во гените кај кои нема *TATA*-секвенца. Цитозинот од *CpG*-островчињата најчесто е метилиран, а степенот на метилација е негативна корелација со транскрипциската активност на генот. Динуклеотидот *CpG* релативно често е подложен на точкести мутации (мутациски „*hot-spot*“).

**цитидин** - нуклеозид чија азотна база е цитозин.

**цитозин (Ц, C)** - пиримидинска база, една од четирите азотни бази од кои се изградени DNA и RNA-молекулите. Цитозинот влегува во составот на нуклеотидот цитидин каде што е врзан со шеќерот деоксирибоза (кај DNA) или рибоза (кај RNA) и фосфатна група. Цитидинот се спарува со гуанидинот од комплементарната верига.

**Шајн-Делгарнова (*Shine-Dalgarno*) секвенца** - консензусна нуклеотидна секвенца во промоторите на гените кај бактериите лоцирана непосредно пред (спротиводно, во 5'-насока од) иницијациониот кодон. Се смета дека Шајн-Делгарновата секвенца во бактериските mRNA-молекули е место за врзување со рибозомот.

# ТАБЕЛИ СО КОРИСНИ ИНФОРМАЦИИ

## Прилог

### Г

Табела ПГ-1: Кратенки за аминокиселините		
аминокиселина	кратенка со три букви	кратенка со една буква
аланин	Ala	A
аргинин	Arg	R
аспарагинска киселина	Asp	D
аспарагин	Asn	N
валин	Val	V
глутаминска киселина	Glu	E
глутамин	Gln	Q
глицин	Gly	G
изолеуцин	Ile	I
леуцин	Leu	L
лизин	Lys	K
метионин	Met	M
пролин	Pro	P
серин	Ser	S
тирозин	Tyr	Y
треонин	Thr	T
триптофан	Trp	W
фенилаланин	Phe	F
хистидин	His	H
цистеин	Cys	C

**Табела ПГ-2: Специјални симболи за нуклеотидите**

<b>симбол</b>	<b>значење</b>
<b>A</b>	аденин
<b>G</b>	гуанин
<b>C</b>	цитозин
<b>T</b>	тимин
<b>R</b>	<b>G</b> или <b>A</b>
<b>Y</b>	<b>T</b> или <b>C</b>
<b>M</b>	<b>A</b> или <b>C</b>
<b>K</b>	<b>G</b> или <b>T</b>
<b>S</b>	<b>G</b> или <b>C</b>
<b>W</b>	<b>A</b> или <b>T</b>
<b>H</b>	<b>A</b> или <b>C</b> или <b>T</b>
<b>B</b>	<b>G</b> или <b>T</b> или <b>C</b>
<b>V</b>	<b>G</b> или <b>C</b> или <b>A</b>
<b>D</b>	<b>G</b> или <b>A</b> или <b>T</b>
<b>N</b>	<b>G</b> или <b>A</b> или <b>T</b> или <b>C</b>



<b>Табела ПГ-3: Означување на броевите во научната литература</b>				
<b>10<sup>n</sup></b>	<b>префикс</b>	<b>симбол</b>	<b>текстуален опис</b>	<b>децимален еквивалент</b>
10 <sup>24</sup>	<b>јота</b>	<b>Y</b>	септилион	1 000 000 000 000 000 000 000 000
10 <sup>21</sup>	<b>зета</b>	<b>Z</b>	секстилион	1 000 000 000 000 000 000 000
10 <sup>18</sup>	<b>екса</b>	<b>E</b>	квинтилион	1 000 000 000 000 000 000
10 <sup>15</sup>	<b>пета</b>	<b>P</b>	квадрилион	1 000 000 000 000 000
10 <sup>12</sup>	<b>тера</b>	<b>T</b>	трилион	1 000 000 000 000
10 <sup>9</sup>	<b>гига</b>	<b>G</b>	милијарда	1 000 000 000
10 <sup>6</sup>	<b>мега</b>	<b>M</b>	милион	1 000 000
10 <sup>3</sup>	<b>кило</b>	<b>k</b>	илјада	1 000
10 <sup>2</sup>	<b>хекто</b>	<b>h</b>	сто	100
10 <sup>1</sup>	<b>дека</b>	<b>da</b>	десет	10
10 <sup>0</sup>	<b>нема</b>	<b>нема</b>	еден	1
10 <sup>-1</sup>	<b>деци</b>	<b>d</b>	десетинка	0,1
10 <sup>-2</sup>	<b>центи</b>	<b>c</b>	стотинка	0,01
10 <sup>-3</sup>	<b>мили</b>	<b>m</b>	илјадити дел	0,001
10 <sup>-6</sup>	<b>микро</b>	<b>μ</b>	милионити дел	0,000 001
10 <sup>-9</sup>	<b>нано</b>	<b>n</b>	милијардити дел	0,000 000 001
10 <sup>-12</sup>	<b>пико</b>	<b>p</b>	трилионити дел	0,000 000 000 001
10 <sup>-15</sup>	<b>фемто</b>	<b>f</b>	квадрилионити дел	0,000 000 000 000 001
10 <sup>-18</sup>	<b>ато</b>	<b>a</b>	квинтилионити дел	0,000 000 000 000 000 001
10 <sup>-21</sup>	<b>zepto</b>	<b>z</b>	секстилионити дел	0,000 000 000 000 000 000 001
10 <sup>-24</sup>	<b>јокто</b>	<b>y</b>	септилионити дел	0,000 000 000 000 000 000 000 001

Табела ПГ-4: Старогрчки алфавет						
голема буква	мала буква	се чита	голема буква	мала буква		се чита
Α	α	алфа	Α	ν		ни
Β	β	бета	Ξ	ξ		кси
Γ	γ	гама	Ο	ο		омикрон
Δ	δ	делта	Π	π		пи
Ε	ε	епсилон	Ρ	ρ		ро
Ζ	ζ	зета	Σ	σ	ς	сигма*
Η	η	ета	Τ	τ		тау
Θ	θ	тета	Υ	υ		ипсилон
Ι	ι	јота	Φ	φ		фи
Κ	κ	капа	Χ	χ		хи
Λ	λ	ламбда	Ψ	ψ		пси
Μ	μ	ми	Ω	ω		омега

\* малата буква сигма се пишува σ секаде освен на крајот од зборот, каде се пишува ς

**Табела ПГ-5: Хронолошки список на доделени Нобелови награди поврзани со откриција и истражувања во молекуларната биологија и генетиката**

година	област*	истражувач(и)	открытие или поле на истражување
1910	Ф/М	Косел (Albrecht Kossel)	разни истражувања на протеините и нуклеинските киселини
1933	Ф/М	Морган (Thomas Morgan)	улога на хромозомите во наследувањето
1946	Ф/М	Милер (Hermann Muller)	влијание на радиоактивното зрачење врз појавата на генетските мутации
1948	Х	Тиселиус (Arne Tiselius)	електрофореза и проучување на серумските протеини
1958	Ф/М	Бидл (George Beadle) и Татум (Edward Tatum); Ледерберг (Joshua Lederberg)	Бидл и Татум за откривање на хемизмот на регулацијата на генската активност; Ледерберг за откривање на генетските рекомбинации и организација на гените кај бактериите
1958	Х	Sanger (Frederick Sanger)	структура на протеините (особено на инсулинот)
1959	Ф/М	Корнберг (Arthur Kornberg) и Охоа (Severo Ochoa)	биосинтеза на DNA и RNA
1962	Ф/М	Крик (Francis Crick), Вотсон (James Watson) и Вилкинс (Maurice Wilkins)	молекуларна структура на DNA и нејзина улога во преносот на генетските информации
1962	Х	Перуц (Max Perutz) и Кендрџ (John Kendrew)	структура на глобуларните протеини
1965	Ф/М	Жакоб (François Jacob), Лоф (André Lwoff) и Моно (Jacques Monod)	контрола на генската експресија кај вирусите и кај бактериите
1968	Ф/М	Холи (Robert Holley), Корана (Har Gobind Khorana) и Ниренберг (Marshall Nirenberg)	расветлување на генетскиот код
1969	Ф/М	Delbruk (Max Delbrück), Луриа (Salvador Luria) и Хиршеј (Alfred Hershey)	механизми на DNA-репликацијата и генската структура кај вирусите
1975	Ф/М	Балтимор (David Baltimore), Далбеко (Renato Dulbecco) и Тимајн (Howard Temin)	интеракции меѓу туморските вируси и клеточниот генетски материјал
1978	Ф/М	Арбер (Werner Arber), Натанс (Daniel Nathans) и Смит (Hamilton Smith)	рестрикциски ендонуклеази
1980	Х	Берг (Paul Berg), Џилберт (Walter Gilbert) и Сангер (Frederick Sanger)	Берг за рекомбинантната DNA-технологија; Џилберт и Сангер за DNA-секвенционирањето
1983	Ф/М	Барбара МекКлинток (Barbara McClintock)	мобилни генски елементи
1989	Ф/М	Бишоп (Michael Bishop) и Вармус (Harold Varmus)	клеточно потекло на ретровирусните онкогени
1989	Х	Алтман (Sidney Altman) и Чех (Thomas Cech)	каталитична активност на RNA (рибозими)

1993	Ф/М	Робертс (Richard Roberts) и Шарп (Phillip Sharp)	испрекинати гени (интрони во гените)
1993	Х	Мулис (Kary Mullis)	полимеразна верижна реакција (PCR)
1995	Ф/М	Нислајн-Волард (Christiane Nüsslein-Volhard) и Вишаус (Eric Wieschaus)	генетска контрола на ембриогенезата
1997	Ф/М	Прузинер (Stanley Prusiner)	инфективни протеини (приони)
2001	Ф/М	Хартвел (Leland Hartwell), Хунт (Tim Hunt) и сер Нурс (Ser Paul Nurse)	клучни регулатори на клеточниот циклус
2002	Ф/М	Бренер (Sydney Brenner), Хорвиц (Robert Horvitz) и Салстон (John Sulston)	генетска регулација на органогенезата и на апоптозата
2006	Ф/М	Фаер (Andrew Fire) и Мело (Craig Mello)	потиснување на генската активност со RNA-интерференција
2006	Х	Корнберг (Roger Kornberg)	молекуларни механизми на транскрипцијата кај еукариотите
2007	Ф/М	Капечи (Mario Capecchi), сер Еванс (Sir Martin Evans) и Смитис (Oliver Smithies)	индукција на специфични генетски модификации кај глумците со употреба на ембрионски матични клетки
2008	Ф/М	цур Хаусен (Harald zur Hausen); Баре-Синуси (Françoise Barré-Sinoussi) и Монтање (Luc Montagnier)	цур Хаусен за откривање на хуман-папилома вирусот (HPV) и неговата улога во развојот на цервикалниот карцином; Баре-Синуси и Монтање за откривање на вирусот на сидата (HIV)
2008	Х	Шимомура (Osamu Shimomura), Чалфи (Martin Chalfie) и Чин (Roger Tsien)	откривање, развој и примена на зелениот флуоресцентен протеин (GFP)
2009	Ф/М	Блакбурн (Elizabeth H. Blackburn), Грајдер (Carol W. Greider) и Зостак (Jack W. Szostak)	улога на теломеразата во одржување на теломерите на хромозомите
2009	Х	Рамакришнан (Venkatesan Ramakrishnan), Стајц (Thomas A. Steitz) и Јонат (Ada E. Yonath)	структура и функција на рибозомите
2012	Ф/М	Ser Gardon (Sir John B. Gurdon) и Јаманака (Shinya Yamanaka)	за откритието дека зрелите клетки можат да бидат генетски репрограмирани и да станат плурипотентни
2012	Х	Левковиц (Robert Lefkowitz) и Кобилка (Brian Kobilka)	за истражувањата на рецепторите спрегнати со G-протеини

\* кратенки за областа: **Ф/М** - физиологија или медицина; **Х** - хемија



## КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА

Adoga M.P. (Editor). **Molecular Virology**. *InTech*, 2012.

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. **Molecular Biology of the Cell**. *Garland Science*. 5<sup>th</sup> edition, 2007.

Allison L.A. **Fundamental Molecular Biology**. *Blackwell Publishing*. 2007.

Brooker R.J. **Genetics: Analysis & Principles**. *McGraw-Hill*. 4<sup>th</sup> edition, 2011.

Choudhuri S., Carlson D.B. (Editors). **Genomics: Fundamentals and Applications**. *Informa Healthcare USA*. 2009.

Clark D.P., Pazdernik N.J. **Biotechnology**. *Academic Cell Update, Elsevier*, 2012.

Dale J.W., von Schantz M. **From Genes to Genomes: Concepts and Applications of DNA Technology**. *Wiley-Blackwell*. 3<sup>rd</sup> edition, 2011.

Enger E.D., Ross F.C., Bailery D.B. **Concepts in Biology**. *McGraw-Hill*. 14<sup>th</sup> edition, 2012.

Garrett R.H., Grisham C.M.. **Biochemistry**. *Brooks Cole*. 4<sup>th</sup> edition, 2008.

Glick B.R., Pasternak J.J., Patten C.L. **Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA**. *American Society for Microbiology*. 4<sup>th</sup> edition, 2009.

Griffiths A.J.F., Wessler S.R., Lewontin R.C., Carroll S.B. **Introduction to Genetic Analysis**. *W.H. Freeman*. 9<sup>th</sup> edition, 2007.

Hartwell L.H., Hood L., Goldberg M.L., Reynolds A.E., Silver L.M. **Genetics: From Genes to Genomes**. *McGraw-Hill*. 4<sup>th</sup> edition, 2010.

Karp G. **Cell and Molecular Biology**. *John Wiley & Sons, Inc.* 6<sup>th</sup> edition, 2010.

Klug W.S., Michael R. Cummings M.R., Spencer C.A. Palladino M.A. **Concepts of genetics**, *Pearson*. 10<sup>th</sup> edition, 2012.

Le Vine H. **Genetic engineering: a reference handbook**. *ABC-CLIO, Inc.* 2<sup>nd</sup> edition, 2006.

Lewin B. **Genes IX**. *Prentice Hall*. 9<sup>th</sup> edition, 2007.

Lewin B. **Essential Genes**. *Pearson Education*. 2006.

Lewis R. **Human Genetics: Concepts and Applications**. *McGraw-Hill*. 8<sup>th</sup> edition, 2008.

Madigan M.T., Martinko J.M., Stahl D.A., Clark D.P. **Brock Biology of Microorganisms**. *Pearson Education*. 13<sup>th</sup> edition, 2012.

Mathews C.K., van Holde K.E., Ahern K.G. **Biochemistry**. *Benjamin Cummings*. 3<sup>rd</sup> edition, 1999.

Mendelsohn J., Howley P.M., Israel M.A., Gray J.E., Lindsten T. **The Molecular Basis of Cancer**. *Saunders Elsevier*. 3<sup>rd</sup> edition, 2008.

Moo-Young M. (Editor-in-chief). **Comprehensive Biotechnology**. *Elsevier*. 2011.

Murray RK, Bender D., Botham K.M., Kennelly P.J., Rodwell V., Weil P.A.. **Harper's Illustrated Biochemistry**. *Lange Basic Science*. 29<sup>th</sup> edition, 2012.

Mülhardt C . **Molecular Biology and Genomics**. *Academic Press-Elsevier*. 2007.

Nelson D.L., Cox M.M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. *W.H. Freeman*. 4<sup>th</sup> edition, 2004.

Панов С.З. **Основни методи во молекуларната биологија**. *Природно-математички факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Скопје*, 2003.

Pierce B.A. **Genetics: A Conceptual Approach**. *W.H. Freeman*. 4<sup>th</sup> edition, 2012.

Primrose S.B., Twyman R.M. **Principles of Genome Analysis and Genomics**. *Blackwell Science*. 3<sup>th</sup> edition, 2003.

Robinson R (Editor). **Genetics**. *MacMillan Reference Books*, 2002.

Scott M.P., Matsudaira P., Lodish H., Darnell J., Zipursky L., Kaiser C.A., Berk A., Krieger M. **Molecular Cell Biology**. *W. H. Freeman*. 5<sup>th</sup> edition, 2003.

Speicher M.R., Antonarakis S.E., Motulsky A.G. (Editors). **Vogel and Motulsky's Human Genetics: Problems and Approaches**. *Springer-Verlag*. 4<sup>th</sup> edition, 2010.

Strachan T., Read A. **Human Molecular Genetics**. *Garland Science*. 4<sup>th</sup> edition, 2010.

Suhai S. (Editor). **Genomics and Proteomics: Functional and Computational Aspects**. *Kluwer Academic Publishers*. 2002.

Suzuki D.T., Lewontin R.C., Wessler S.R., Gelbart W.M., Miller J.H., Griffiths A.J.F. **An Introduction to Genetic Analysis**. *W. H. Freeman*. 8<sup>th</sup> edition, 2004.

Watson J.D., Baker T.A., Bell S.P., Gann A., Levine M., Losick R. **Molecular Biology of the Gene**. *Benjamin Cummings*. 5<sup>th</sup> edition, 2003.

Watson J.D., Myers R.M., Caudy A.A., Witkowski J.A. **Recombinant DNA: Genes and Genomes: A Short Course**. *W. H. Freeman*. 3<sup>rd</sup> edition, 2007.

Weaver R F. **Molecular Biology**. *McGraw-Hill*. 5<sup>th</sup> edition, 2012.

Wilson k., Walker J. (Editors). **Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology**. *Cambridge University Press*. 7<sup>th</sup> edition, 2010.



## ЗА АВТОРОТ

Сашо Панов дипломирал на студиите по биологија, биохемиско-физиолошка насока, на Природно-математичкиот факултет со среден успех 9,32. Во текот, и по студиите, престојувал во повеќе реномирани институции во земјава и во странство. Од 1997 година е вработен на Институтот за биологија при Природно-математичкиот факултет во состав на Универзитетот „Св. Кирил и Методиј“.

Постдипломските студии ги завршил со просек 10 во 1999 година со одбрана на магистерскиот труд од областа на молекуларната туморска биологија под наслов „Детекција на специфични мутации на *H-ras* онкогенот кај уротелни неоплазми“.

Докторската дисертација под наслов „Ефекти од потиснувањето на *bcl-2* и *hTERT* гените со примена на RNA интерференција кај клеточни линии на белодробен карцином“ ја одбрал 2005 година. Истата година е избран е за доцент по група предмети од областа на молекуларната биологија на Институтот за биологија.

Д-р Панов е избран во наставно-научното звање доцент во 2005 година. Во 2010 година, избран е во звањето вонреден професор по група предмети од областа на молекуларната биологија, молекуларната генетика и генетскиот инженеринг на првиот, вториот и третиот циклус универзитетски студии (додипломските, постдипломски и докторски студии, соодветно) на Природно-математичкиот факултет. Раководител е на Одделението и Лабораторијата за молекуларна биологија при Институтот за биологија. Автор е на универзитетскиот учебник „Основни методи во молекуларната биологија“ издаден во 2003 година.

Научната преокупација на д-р Панов е молекуларната генетика на човечкиот канцер, потиснувањето на прекумерно експресираниите гени со помош на RNA интерференција, индукција на апоптоза кај малигните клетки во *in vitro* услови и други сродни теми. Во последните десет години, бил автор или коавтор на поголем број рецензирани трудови со импакт-фактор и конгресни презентации во земјава и во странство.

Бил раководител на еден меѓународен проект и субкоординатор на еден ТЕМ-ПУС проект. Досега учествувал како соработник-истражувач во поголем број научно-истражувачки проекти. Бил главен истражувач на проект спонзориран од Светската федерација на научници (World Federation of Scientists). По покана, одржал повеќе стручни и научни предавања во научни и во медицински институции. Избран член е на Европското здружение за хумана генетика (European Society of Human Genetics), избран член на меѓународната Организација за човековиот геном (Human Genome Organisation - HUGO), Друштвото на биолозите на Република Македонија и на други научни и стручни здруженија и асоцијации.

