

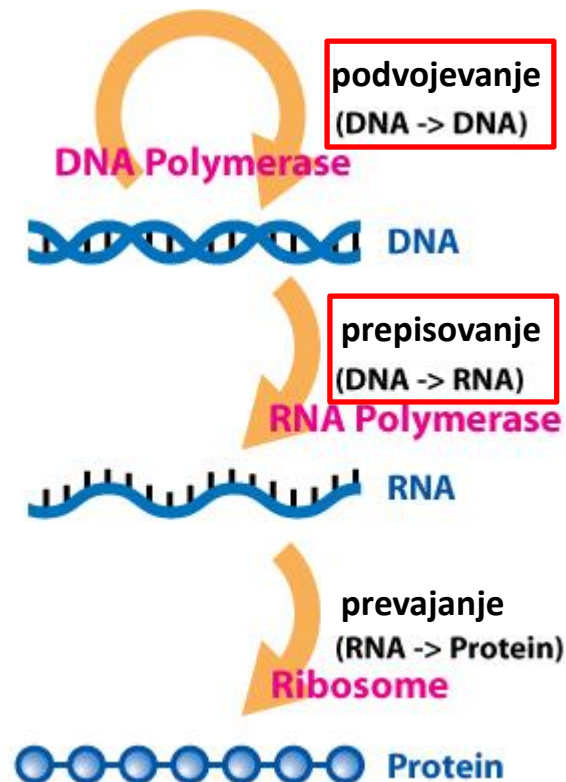
Biosinteza DNA in RNA: podvojevanje in prepisovanje DNA

Predavalnica M4, FKKT, 17. 4. 2014

Nukleinske kisline

- **Shranjevanje, prenašanje in izražanje** genetske informacije.
- Dve vrsti nukleinskih kisljin:
 - **deoksiribonukleinska kislina – DNA:** kromosomi v jedru, mitohondrijih in kloroplastih,
 - **ribonukleinska kislina – RNA:** rRNA, mRNA in tRNA.

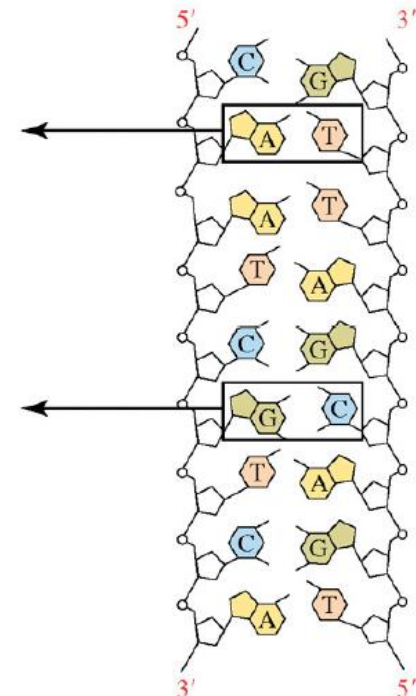
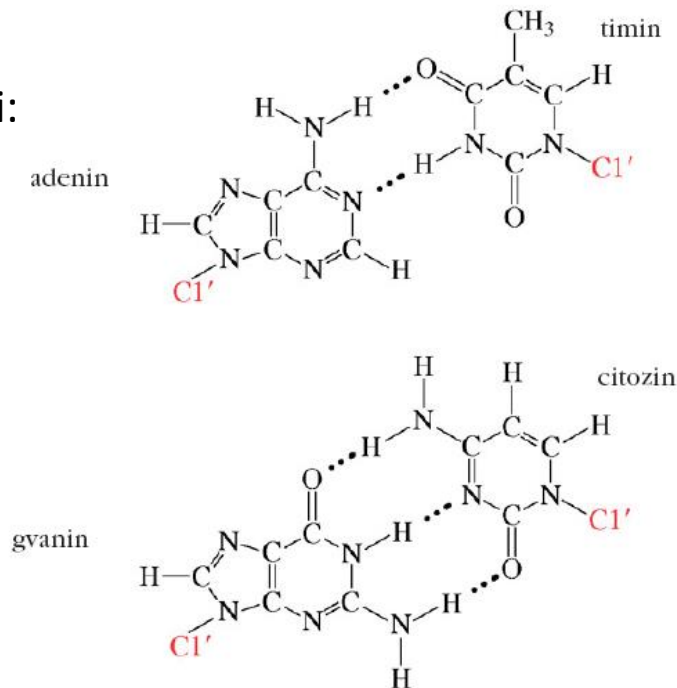
- **Prenos biološke informacije:**



Podvojevanje DNA ali replikacija

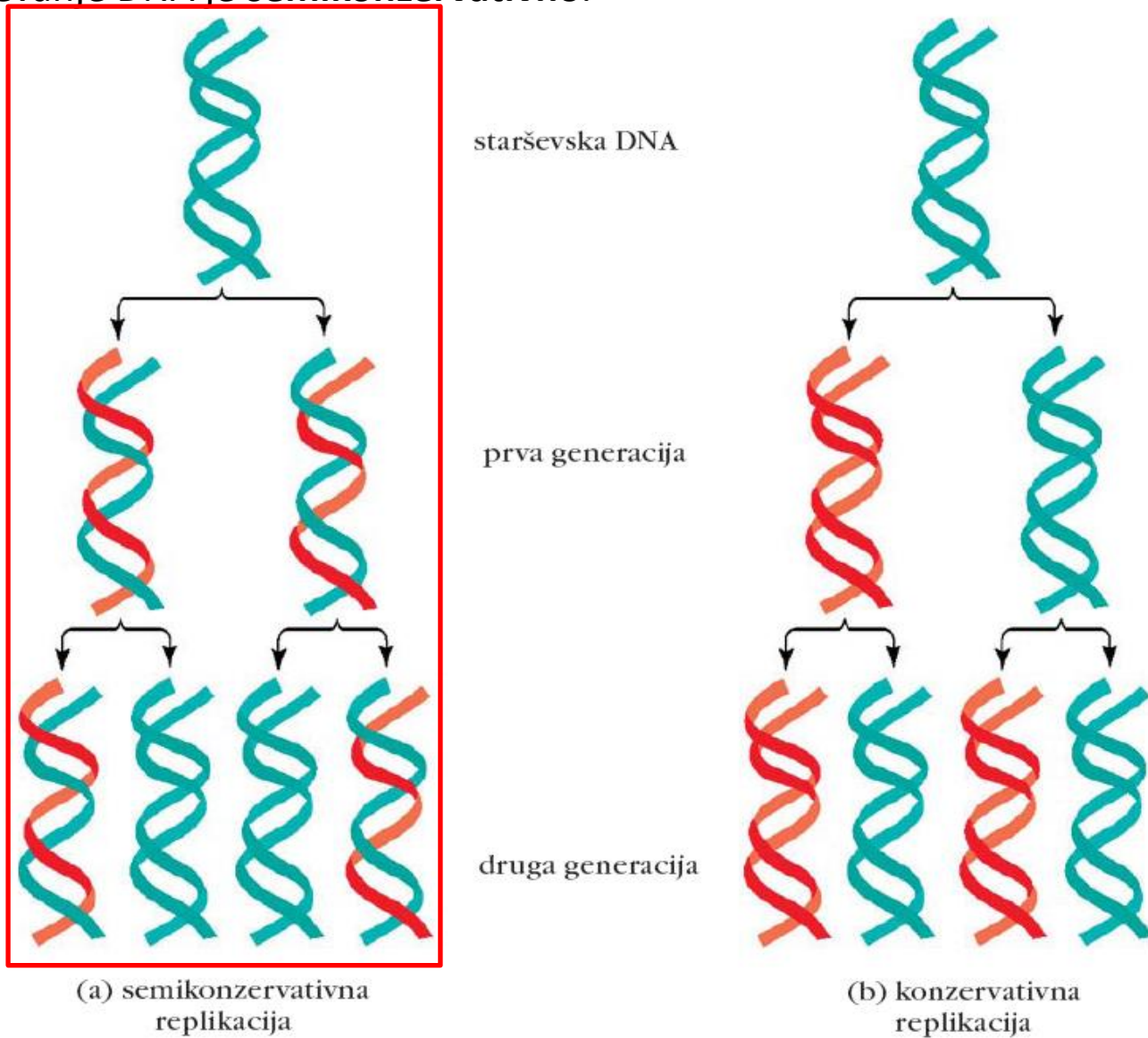
- Proces podvojevanja mora biti **zanesljiv, natančen, nežen** in **skrbno nadzorovan**.
- **Osnove podvojevanja** so **podobne** v prokarionstki in evkarionstski celici.
- Pri **razpiranju dvojne vijačnice** nastaneta dve enojni polinukleotidni verigi, ki delujeta kot **matrici** za kopiranje.
- Sinteza novih **komplementarnih verig**.
- **Kopija nove dvojne vijačnice DNA je popolnoma enaka starševski DNA.**

- Watson-Crickovi bazni pari:



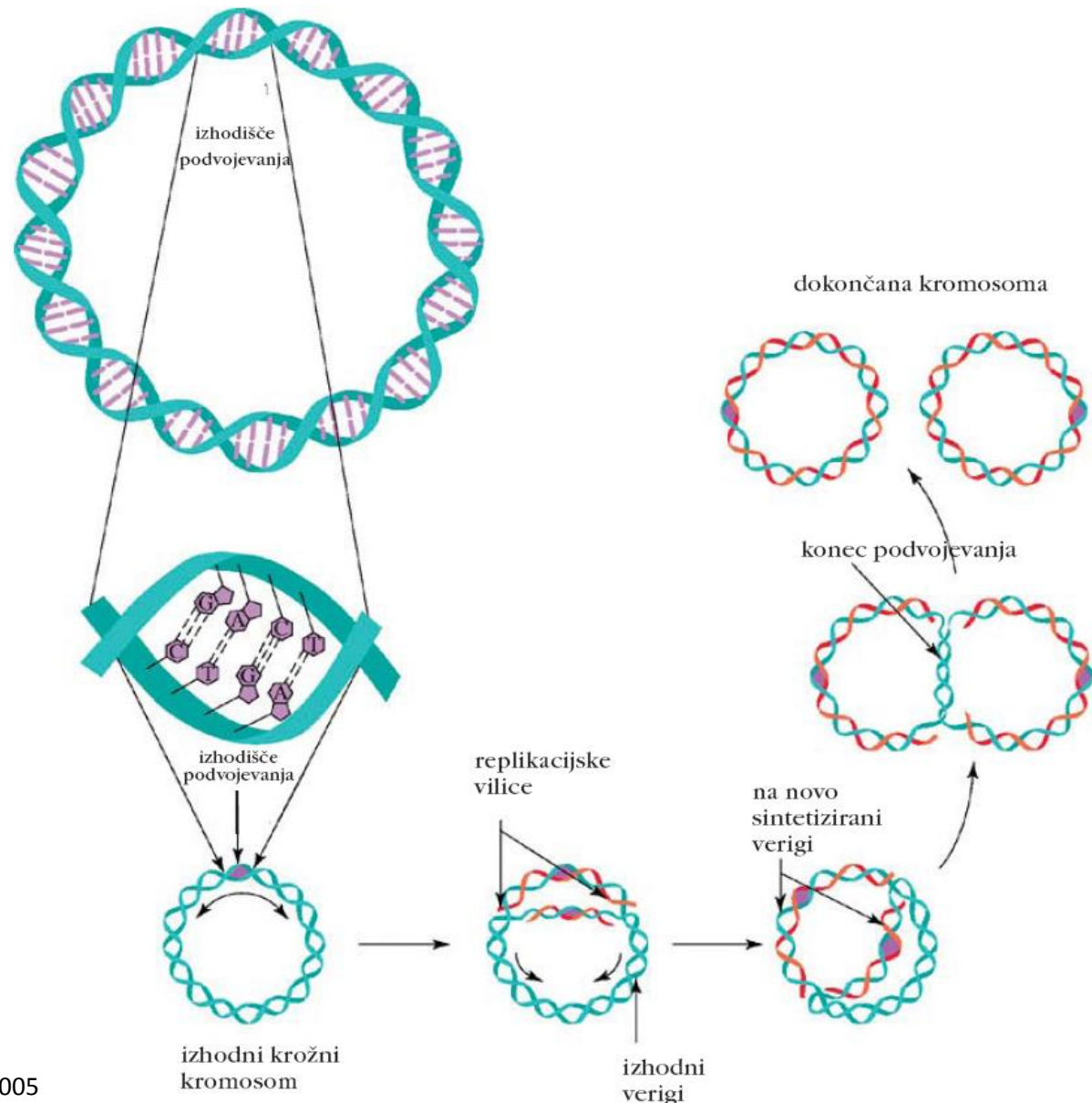
Podvojevanje DNA

- Podvojevanje DNA je **semikonzervativno**.



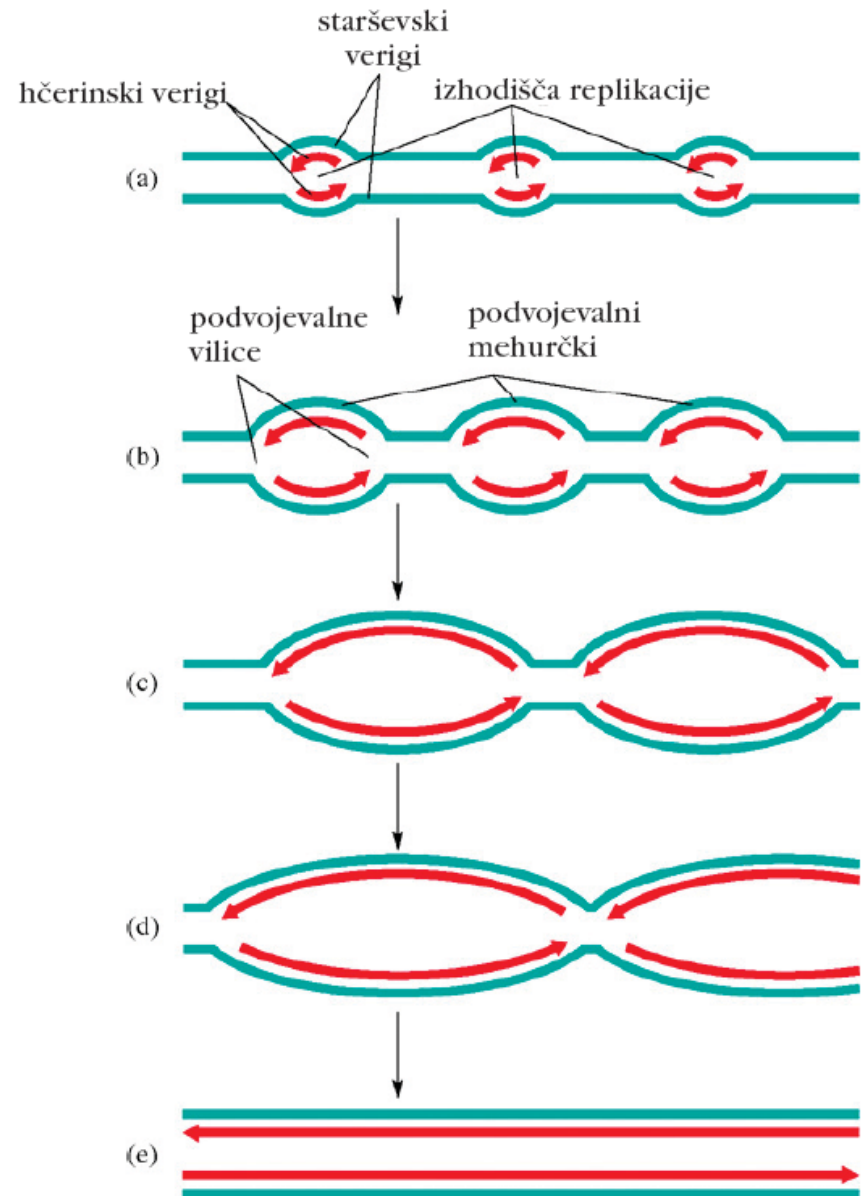
Podvojevanje DNA

- Mesto, kjer poteka podvojevanje DNA imenujemo **podvojevalne** ali **replikacijske vilice**.
- Podvojevanje krožne DNA bakterije *E. coli* se začne na **točno določenem mestu *ori*** in poteka hkrati v obe smeri s pomočjo dvojih replikacijskih vilic.
- Mehanizem imenujemo **replikacijski model theta, θ** .



Podvojevanje DNA

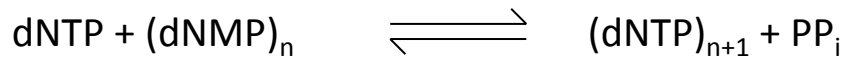
- Evkarionti se podvojujejo na podoben način kot prokarionti, le da je **iniciacijskih mest** in **podvojevalnih mehurčkov** več.
- Na koncu dobimo dve ločeni dvoverižni molekuli DNA.



DNA-polimeraze

- DNA-polimeraze katalizirajo sintezo DNA.

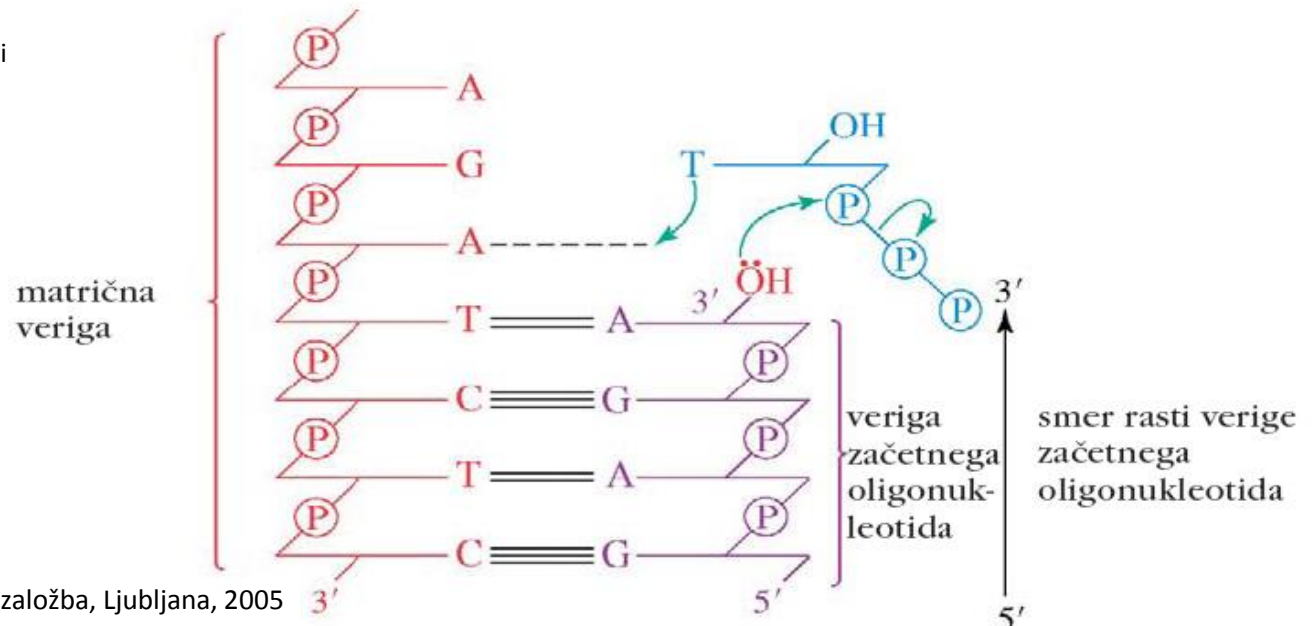
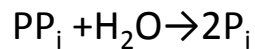
Splošna enačba reakcije:



- Skupne lastnosti vseh DNA-polimeraz:

- Potrebujejo DNA, ki služi kot **matrica**.
- Za začetek delovanja potrebujejo kratko verigo RNA, ki deluje kot **začetni oligonukleotid**. (DNA-polimeraza ne katalizira nove polinukleotidne verige, temveč le njeno podaljševanje.)
- **Podaljševanje** poteka v smeri od **5'→3'**, matrica pa se zato bere v smeri 3'→5' (verigi sta antiparalelni).

- **Energijo** za reakcijo daje sprostitvev molekule pirofosfata in njegova hidroliza do ortofosfata:



DNA-polimeraze

- Pri *E. coli* poznamo vsaj **pet** vrst. Glavni encim za **podvojevanje** naj bi bila **polimeraza III**; sestavljena je iz 10 podenot.
- **Polimerazi I in II** verjetno služita **kontrolnemu branju in popravljanju** ter s tem zagotavljata natančnost podvojevanja.
- Pri evkariontih je replikacija **uravnavana in koordinirana s celičnim cilkom** ter je zato bolj kompleksna. Poznamo več polimeraz: α (sinteza kratkih začetnikov za Okazakijeve fragmente), δ (glavni encim za podvojevanje), ϵ (popravlja je DNA) v jedru in γ v mitohondrijih.
- **Procesivnost polimeraze** = št. dodanih nukleotidov preden polimeraza oddisociira z matrice.

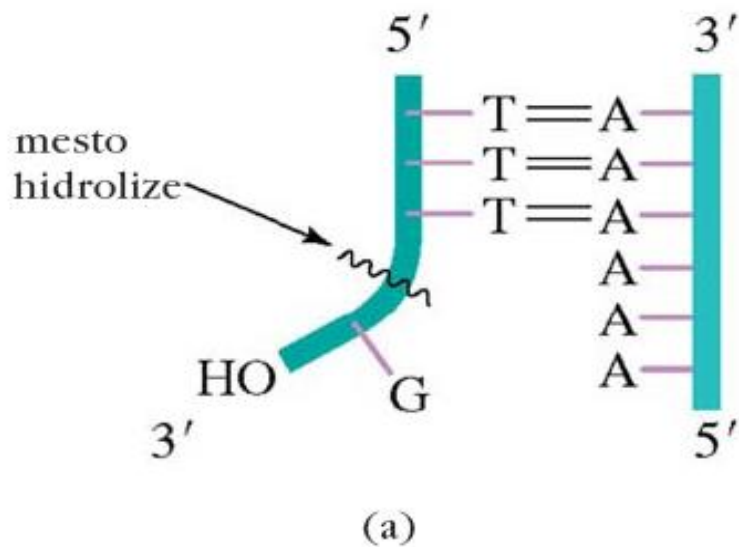
TABLE 25–1 Comparison of Three DNA Polymerases of *E. coli*

	DNA polymerase		
	I	II	III
Structural gene*	<i>polA</i>	<i>polB</i>	<i>polC (dnaE)</i>
Subunits (number of different types)	1	7	≥10
M_r	103,000	88,000 [†]	791,500
3'→5' Exonuclease (proofreading)	Yes	Yes	Yes
5'→3' Exonuclease	Yes	No	No
Polymerization rate (nucleotides/s)	16–20	40	250–1,000
Processivity (nucleotides added before polymerase dissociates)	3–200	1,500	≥500,000

DNA-polimeraze

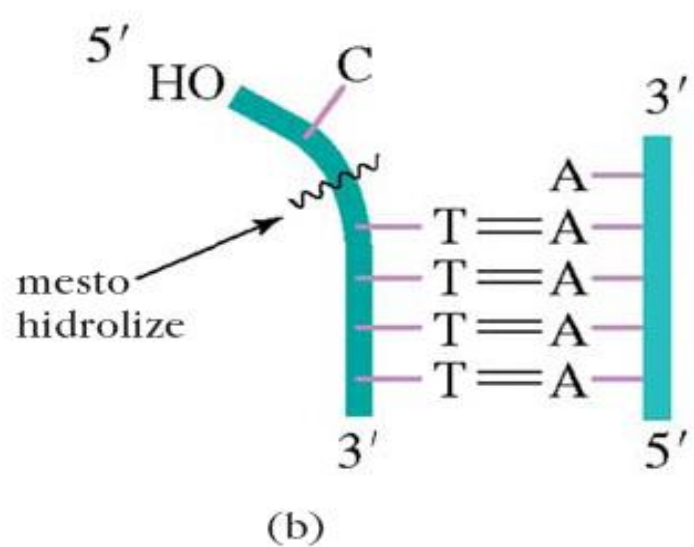
Eksonukleazna aktivnost $3' \rightarrow 5'$

Polimeraza I, II in III



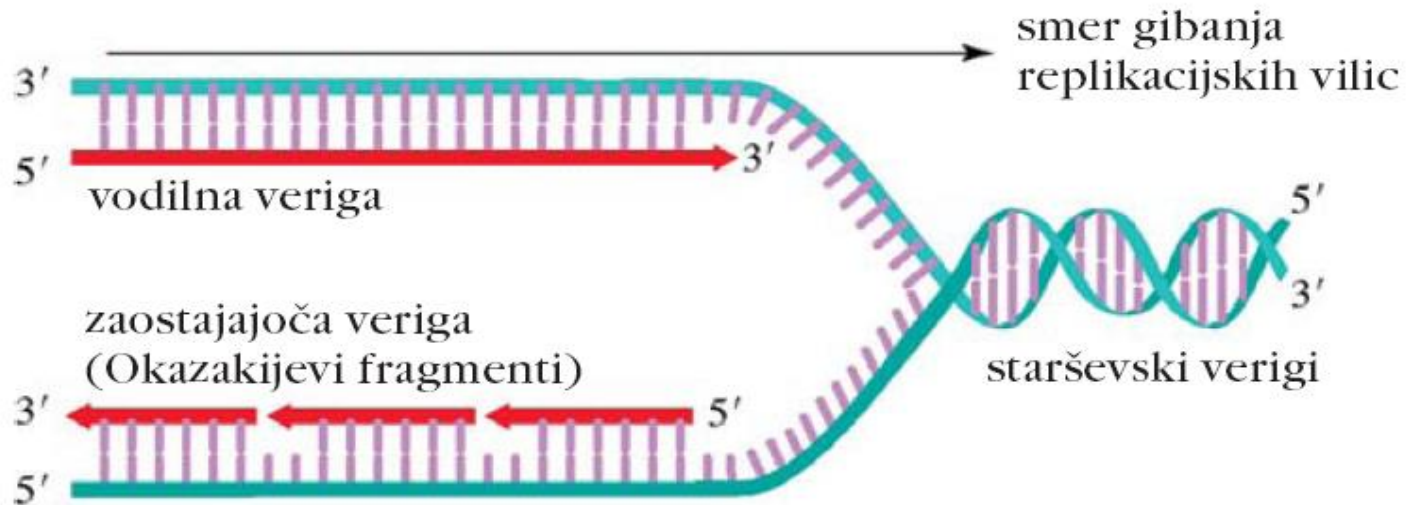
Eksonukleazna aktivnost $5' \rightarrow 3'$

Polimeraza I



Podvojevanje DNA - Okazakijevi fragmenti

- Sinteza **vodilne verige**: Ker starševski verigi DNA potekata antiparalelno, se neprekinjeno dodajanje nukleotidov v smeri gibanja replikacijskega mehurčka odvija le na verigi, ki jo beremo od 3'→5' (**podvojevanje 5'→3'**).
- Sinteza **zaostajajoče verige**: Starševska veriga, ki jo beremo od 5'→3', se mora sintetizirati v krajših, ločenih fragmentih – **Okazakijevih fragmentih**, ki se v kasnejših korakih replikacije kovalentno povežejo.



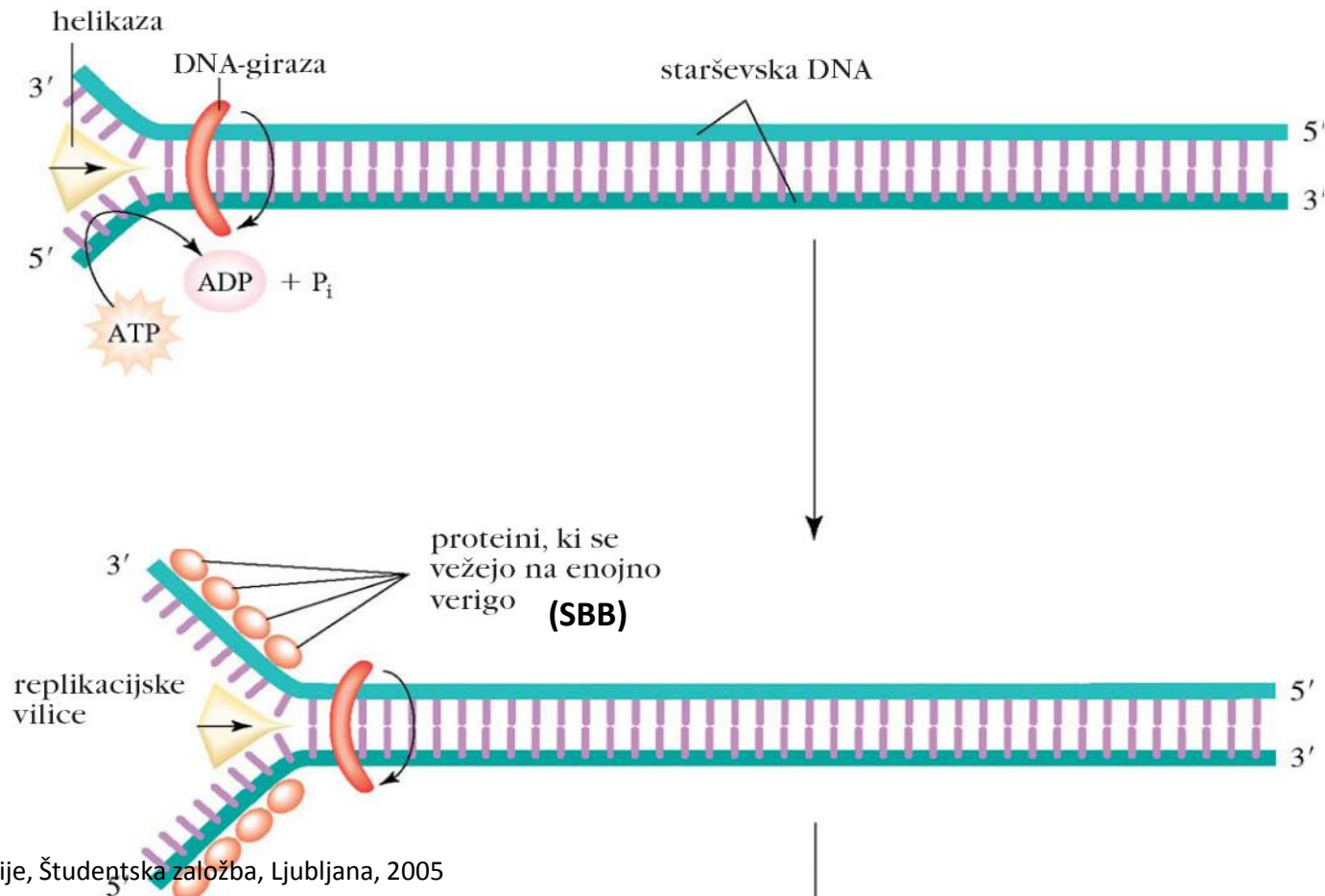
Podvojevanje DNA

- **Pri podvojevanju sodeluje več encimov.**
- Primer: encimi, ki sodelujejo pri podvojevanju *E. coli*.

protein	vloga
helikaza	Katalizira razpiranje dvojne vijačnice DNA.
DNA-giraza	Pomaga pri odvijanju dvojne vijačnice DNA.
proteini SSB	Stabilizirajo enojni verigi DNA.
primaza	Katalizira sintezo začetnega oligonukleotida RNA.
DNA-polimeraza III	Katalizira podaljševanje verige DNA.
DNA-polimeraza I	Katalizira zamenjavo ribonukleotidov v začetnem oligonukleotidu z deoksiribonukleotidi.
DNA-ligaza	Katalizira sintezo manjkajoče fosfoestrške vezi med Okazakijevimi fragmenti.

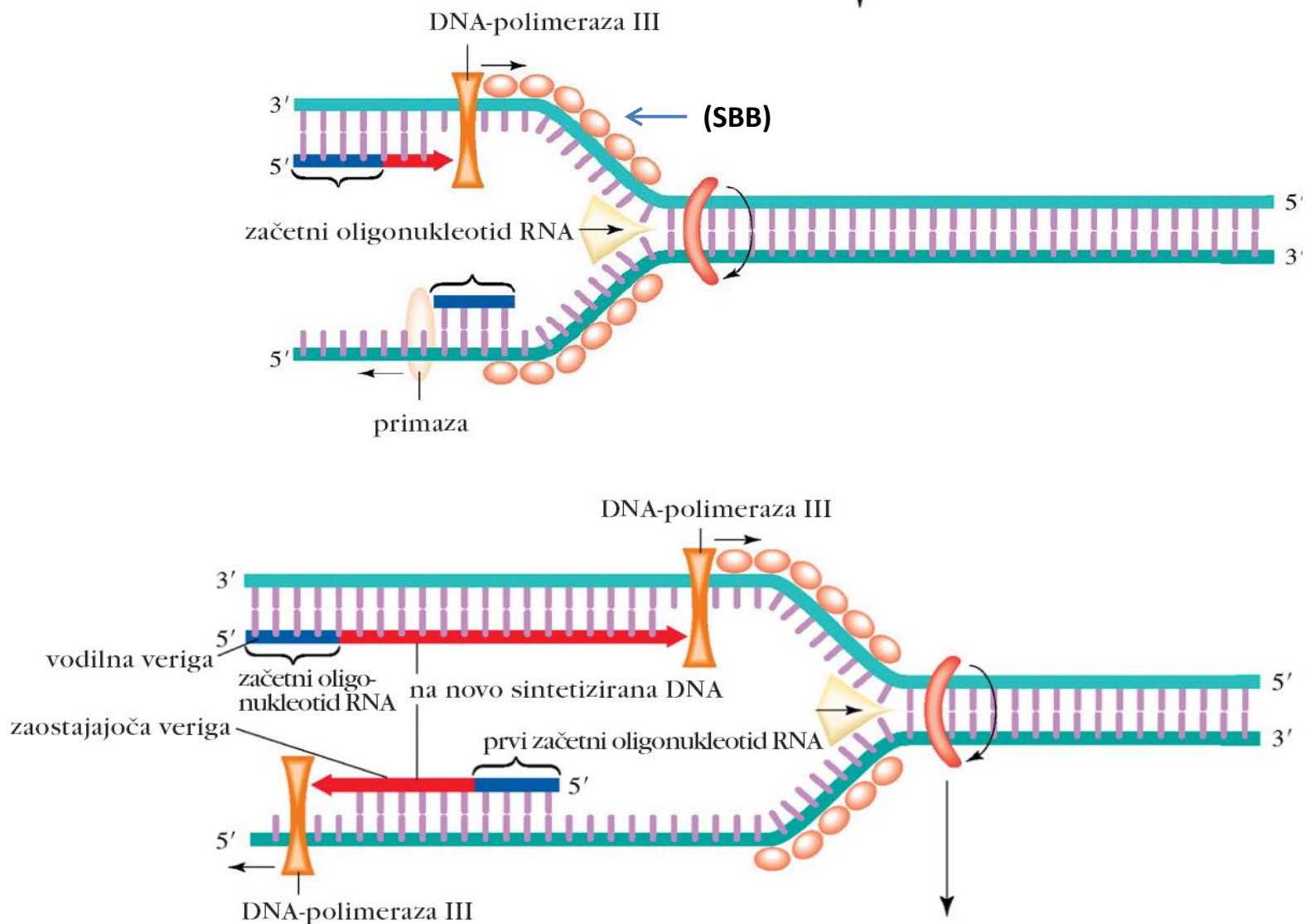
Podvojevanje DNA

- **Helikaza** prepozna in se veže na izhodišče replikacije ter katalizira ločevanje dveh verig DNA (prekine H-vezi).
- **Potrebna je energija hidrolize ATP do ADP.**
- **DNA-giraza** (topoizomeraza) katalizira uvajanje dodatnega zvitja in s tem pomaga pri odvijanju verig, saj zmanjša napetosti.
- **Oblikujejo se replikacijske vilice.**



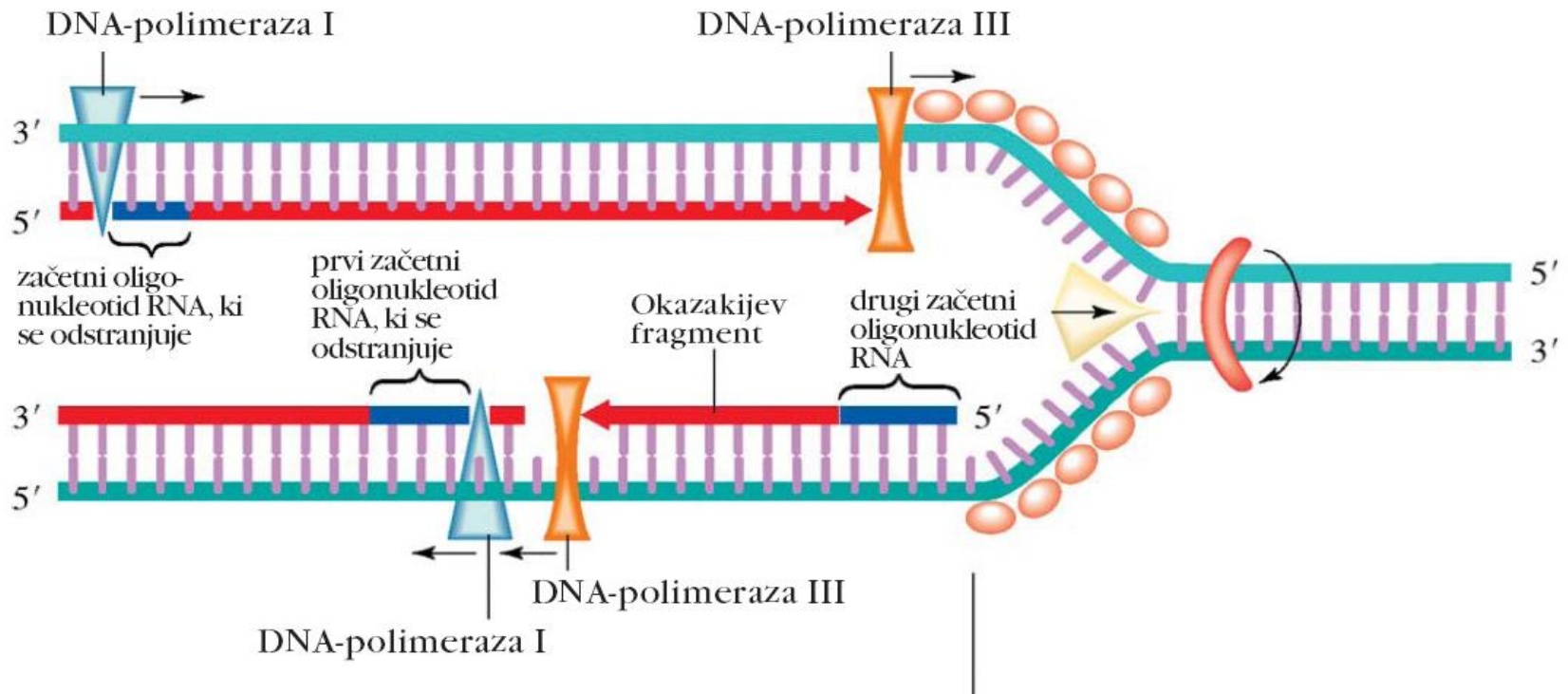
Podvojevanje DNA

- Na enojne verige DNA se vežejo **proteini SBB**, ki jih stabilizirajo.
- Začetni oligonukleotid s prosto hidroksilno skupino na 3'-koncu sintetizira encim **primaza**.

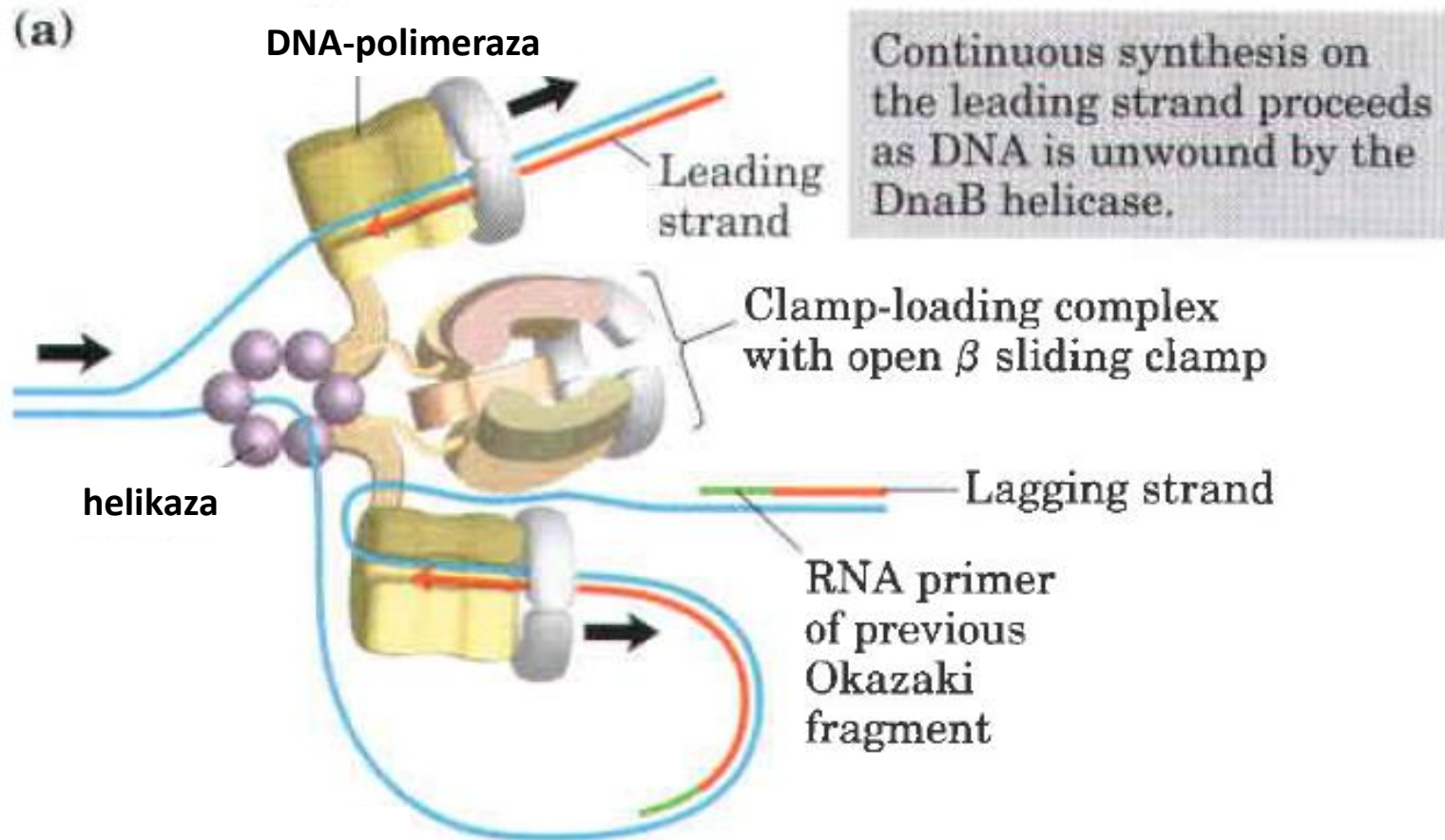


Podvojevanje DNA

- **DNA-polimeraza III** katalizira sintezo novih verig.
- Začetne RNA oligonukleotide odstrani **DNA-polimeraza I**, ki ima 5'→3' eksonukleazno aktivnost.

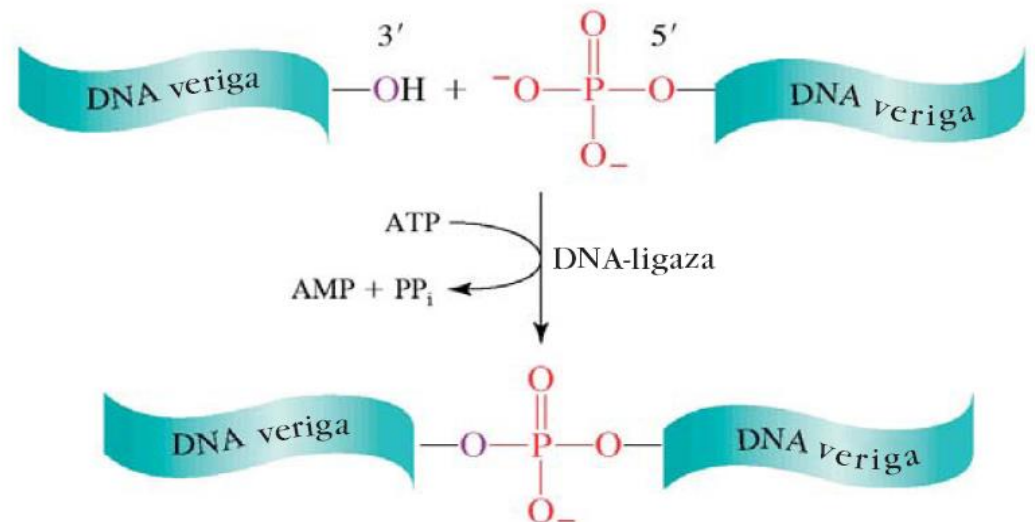
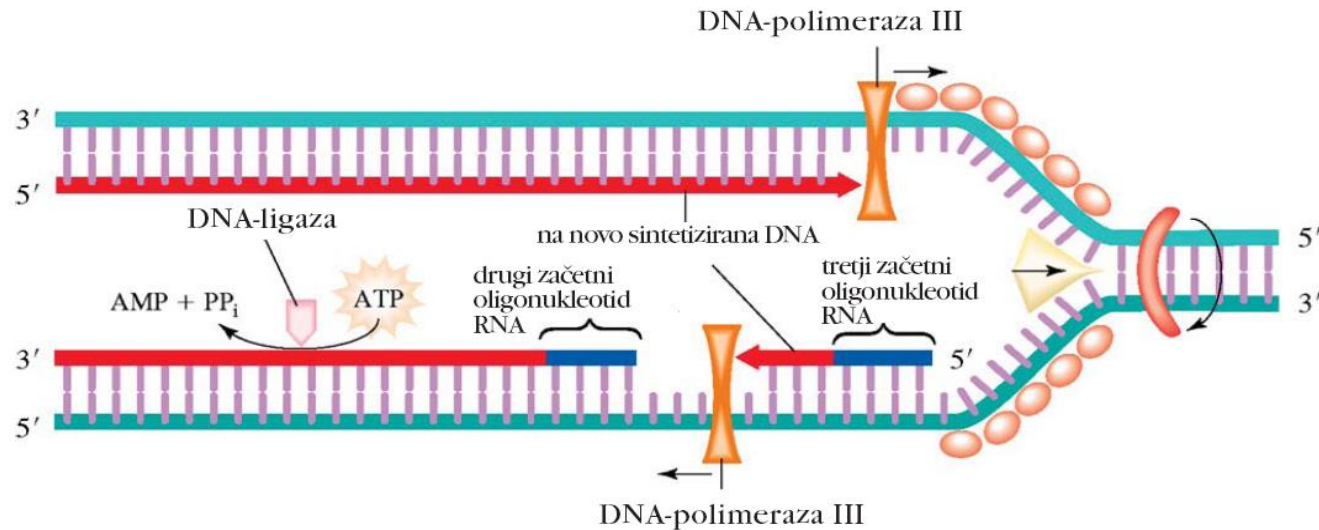


Podvojevanje DNA



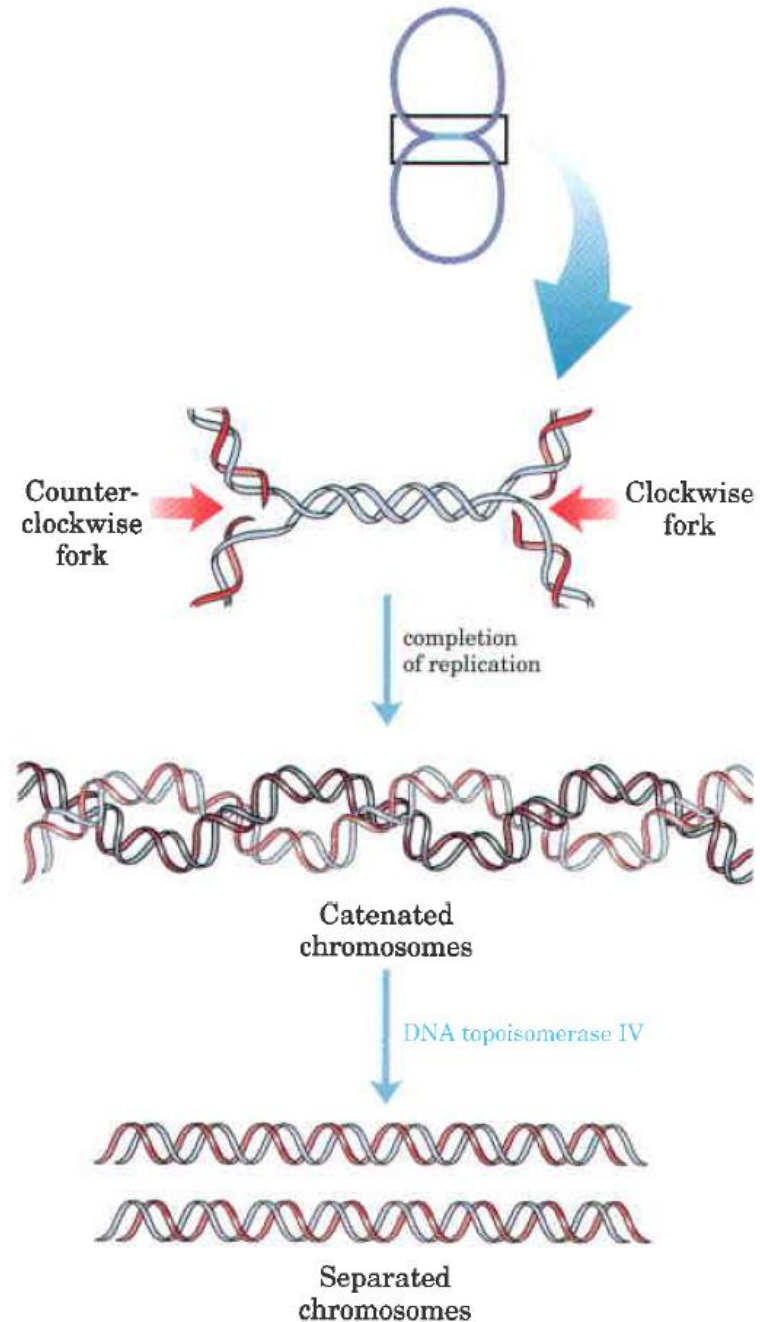
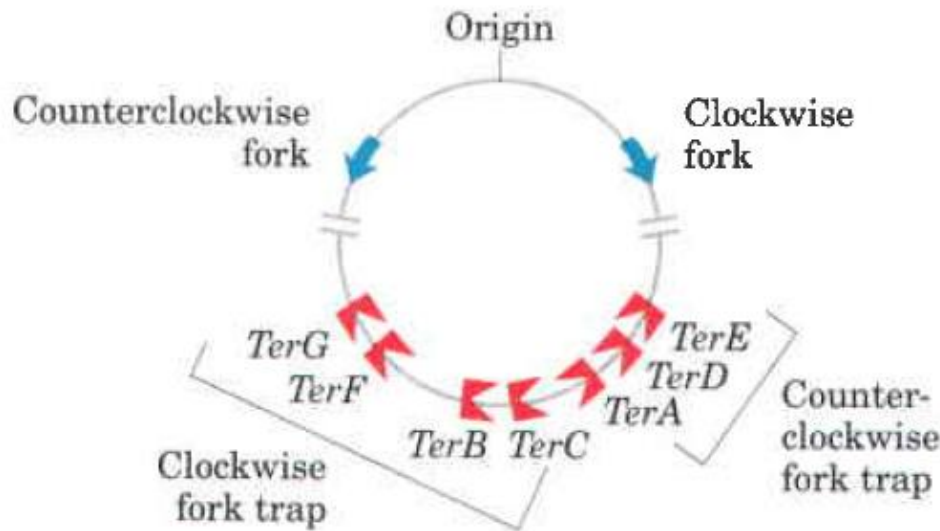
Podvojevanje DNA

- DNA-polimeraza I katalizira vezavo vseh potrebnih deoksiribonukleotidov za zapolnitev vrzeli. Končno zapolnitev, nastanek zadnje fosfoestrške vezi, pa katalizira **DNA-ligaza**.
- **Za to je potrebna energija ATP.**



Podvojevanje DNA

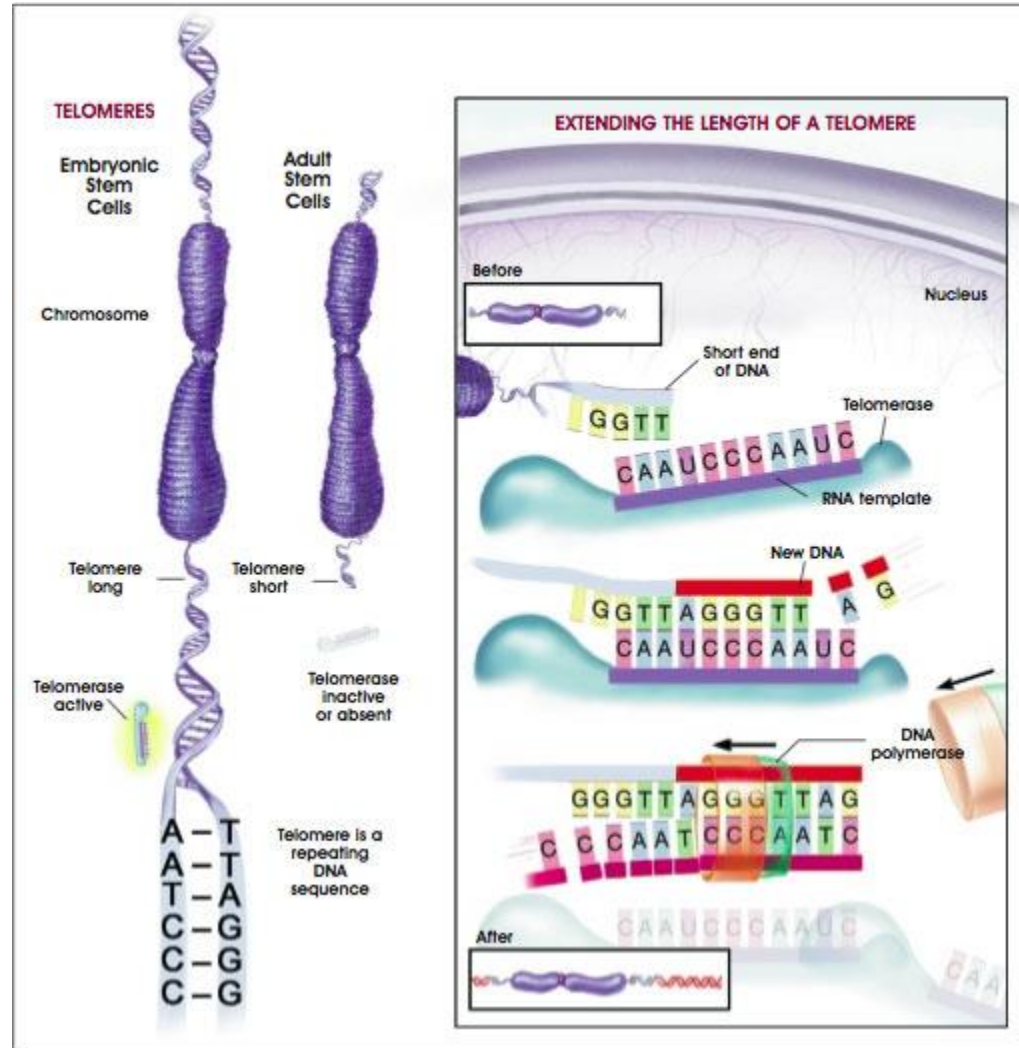
- Pri *E. coli* se podvojevanje konča, ko se na krožnem kromosomu sreča dvoje replikacijskih vilic.
- Ločitev verig katalizira topoizomeraza.



Telomeri

- Evkariontska DNA **linearna**.
- Proste konce teh linearnih molekul imenujemo **telomeri**.
- Telomeri so sestavljeni iz stotine heksanukleotidnih ponovitev **AGGGTT**.
- Sintezo koncev katalizira encim **telomeraza**, ki **vsebuje molekulo RNA**, ki ji služi kot matrica za dodajanje ustreznih nukleotidov.

- **Telomeri se med normalnim celičnim ciklom skrajšajo** in ko postanejo prekratki (telomeraza ni aktivna), je celična delitev zavrta zaradi nestabilnosti kromosomov.
- Krajšanje telomerov morda deluje kot biološka ura, ki omejuje število delitev posamezne celice.
- Telomerazno aktivnost so odkrili v visokem odstotku rakavih celic.



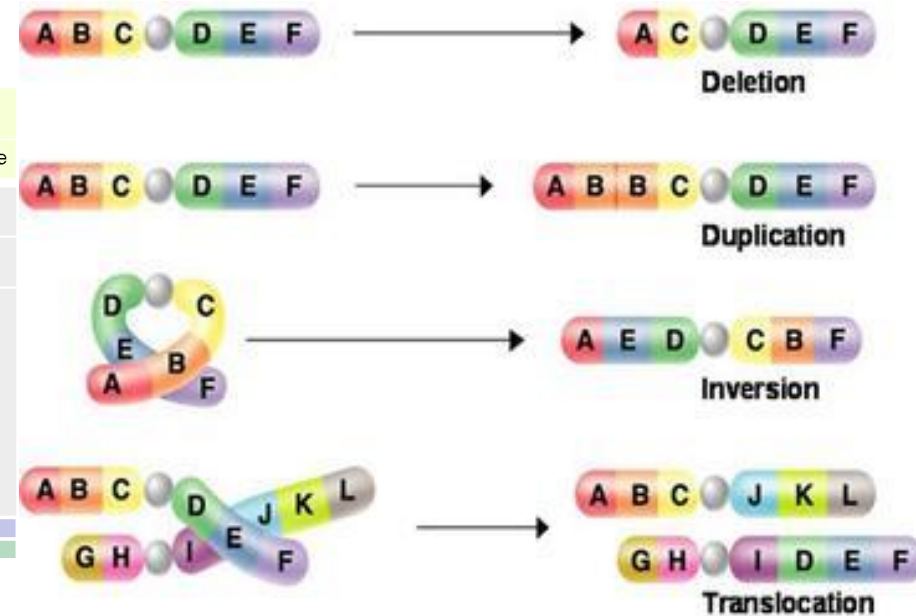
Mutacije

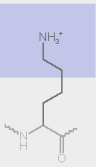
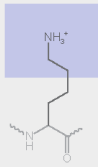
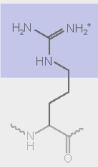
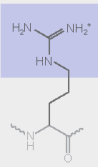
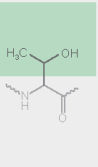
- Mutacije so dedne spremembe v zaporedju baz DNA.
- Večina mutacij je škodljiva.
- Občasno so mutacije ugodne, ker privedejo do naravne prednosti organizma.
- V celici obstajajo **sistemi za popravljanje** DNA.
- Mutacije ločimo glede na vzrok poškodbe:
 - **Spontane**: nastanejo med običajnimi genetskimi in metaboličnimi procesi v celici.
 - **Inducirane**: povzročijo jih dejavniki iz okolja – **mutageni** (ionizirajoče sevanje, nekatere kemikalije UV-svetloba).

Mutacije

- Mutacije lahko obsegajo le en sam bazni par ali pa tudi dele kromosomskih regij.
 - Točkovna mutacija: zamenjava baznega para z drugim.
 - Insercija: vrinjenje enega ali več baznih parov.
 - Delecija: izločitev enega ali več baznih parov.

Kromosomske mutacije:



	Point mutations				
	No mutation	Silent	Nonsense	Missense	
				conservative	non-conservative
DNA level	TTC	TTT	ATC	TCC	TGC
mRNA level	AAG	AAA	UAG	AGG	ACG
protein level	Lys	Lys	STOP	Arg	Thr
					

basic
polar

Spontane mutacije

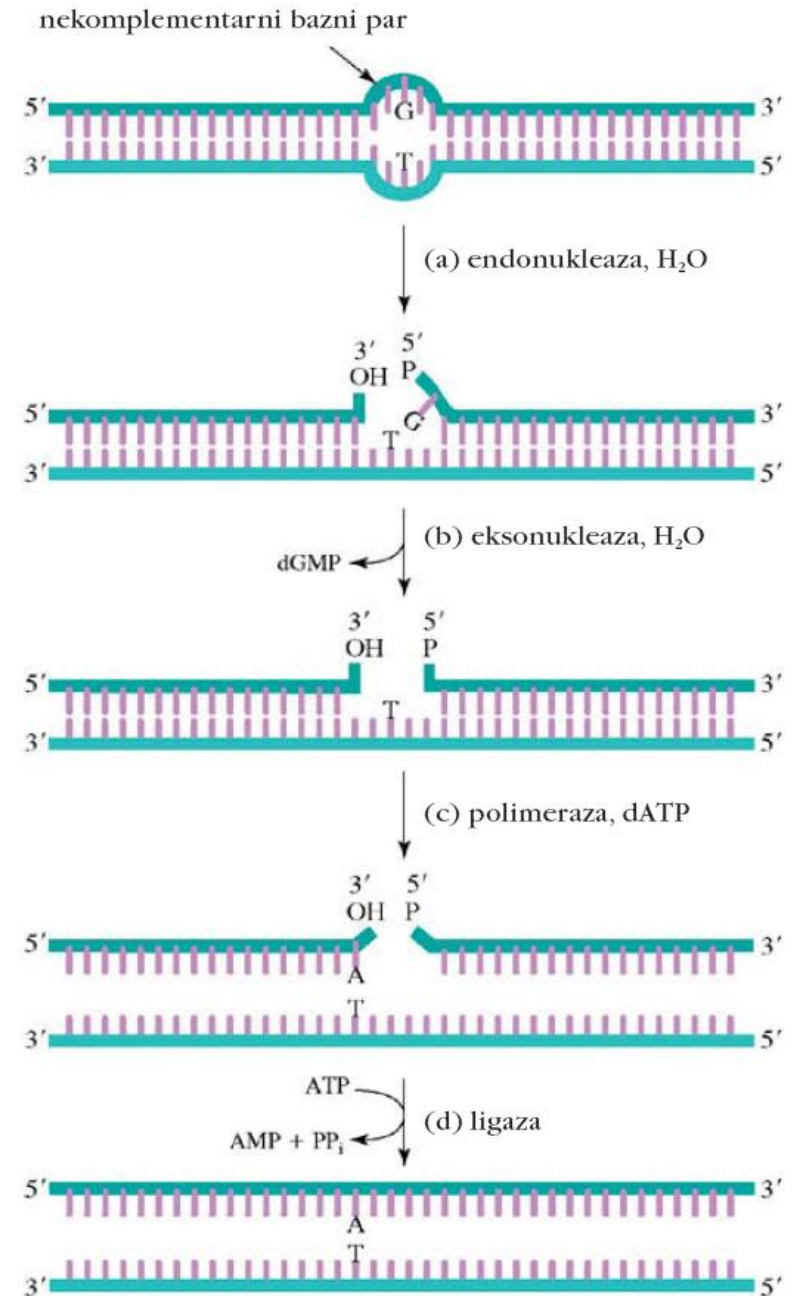
- Mutacije v celici popravijo **popravljalni mehanizmi**.
- **Spontane mutacije** nastanejo med običnimi metaboličnimi in genetskimi procesi v celici.
- Tipi spontanih mutacij:
 - **Napake** pri vključevanju deoksiribonukleotidov in nastanek nekomplementarnih baz **med podvojevanjem DNA**.
 - Spremembe baz, ki jih povzročijo **hidrolitične reakcije**.
- V celotnem procesu podvojevanja kromosoma *E. coli* pride do napake vsake 10^4 do 10^5 vgrajene baze. Ker popravljalni mehanizmi zamenjajo večino neustreznih baz, je napačna le vsaka 10^{10} baza.

Spontane mutacije

- Bakterija *E. coli* ima dokaj zapleten sistem za ugotavljanje in popravljanje nekomplementarnih baznih parov.

- Splošni popravljalni mehanizem:

1. **Endonukleaze** katalizirajo cepitev ene fosfoestrne vezi, kjer se nahaja napačen nukleotid.
2. **Eksonukleaza** odstrani napačen nukleotid.
3. **DNA-polimeraza I ali III** vstavi pravilen nukleotid.
4. **DNA-ligaza** zapolni vrzel.



Spontane mutacije

Najpogostejši tip spontane mutageneze je zamenjava, ki jo pogosto povzroči **tautomerija dušikovih baz** (pride do neustreznega parjenja baz).

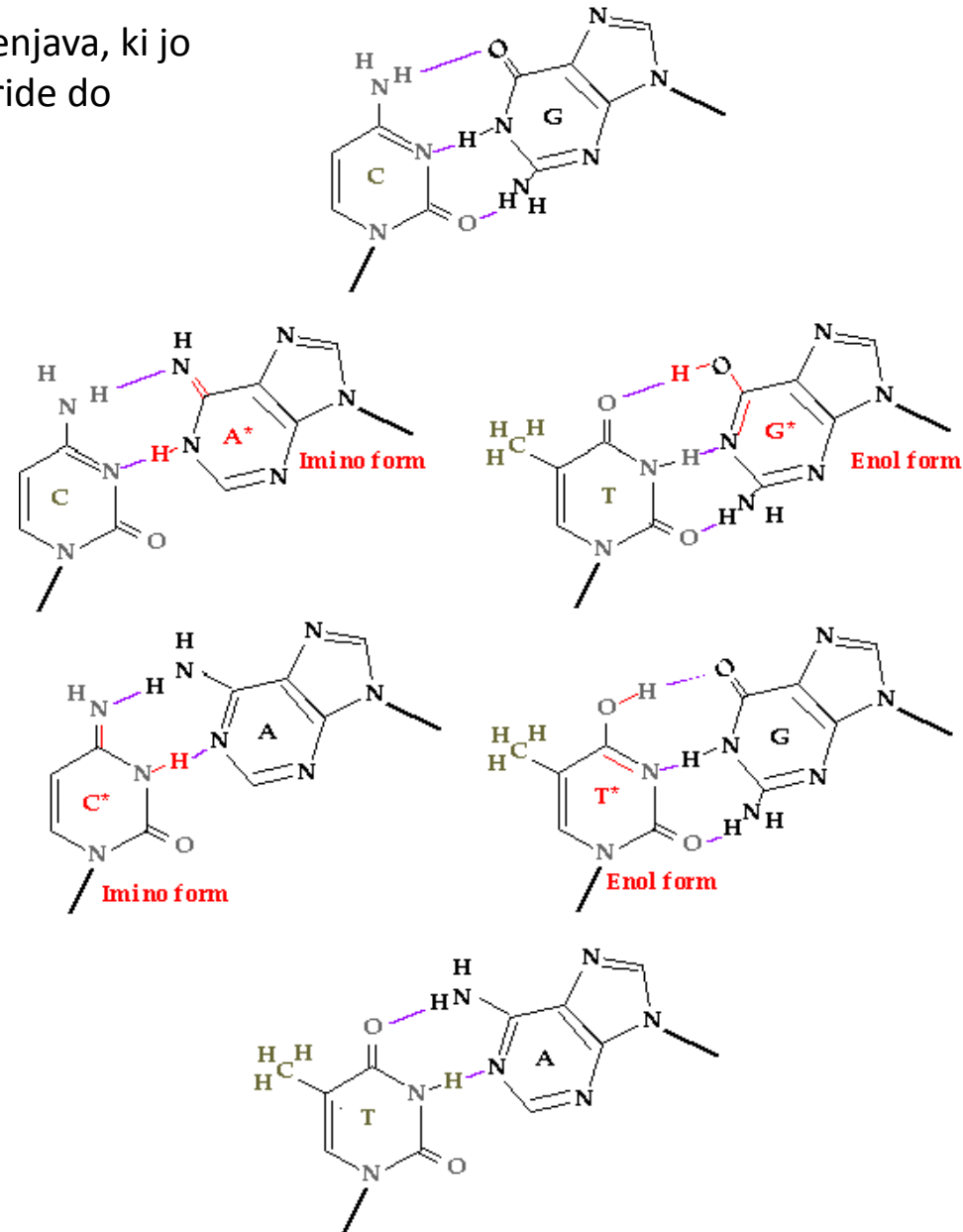
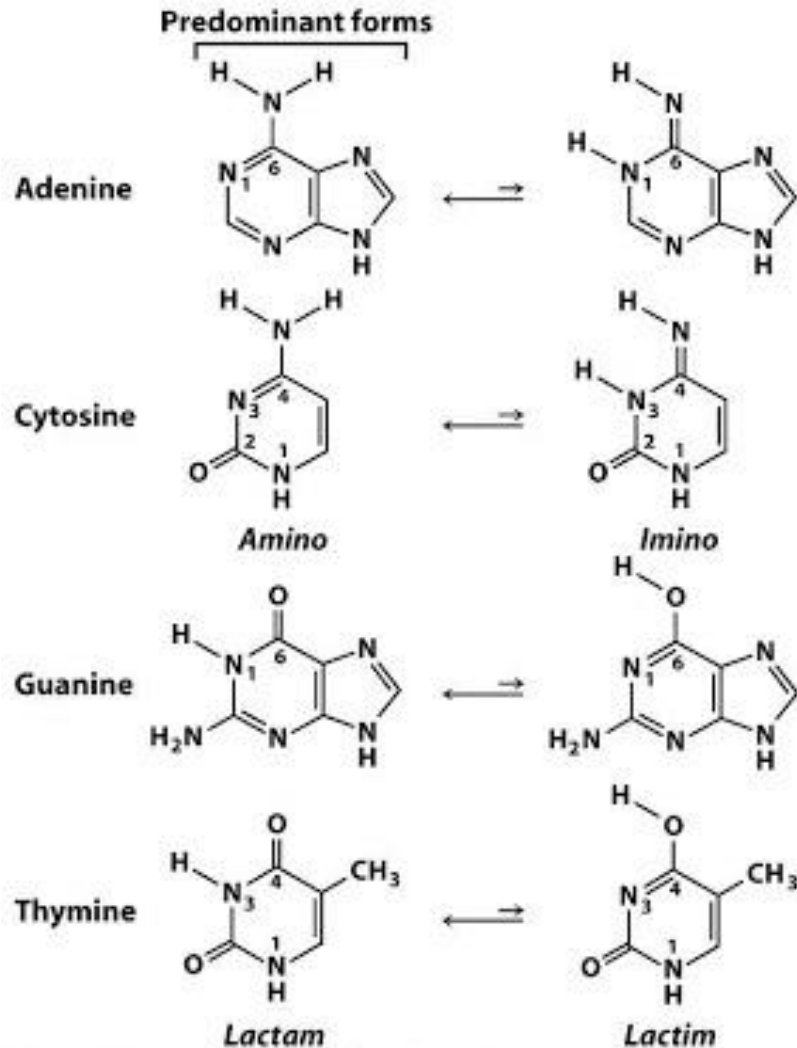
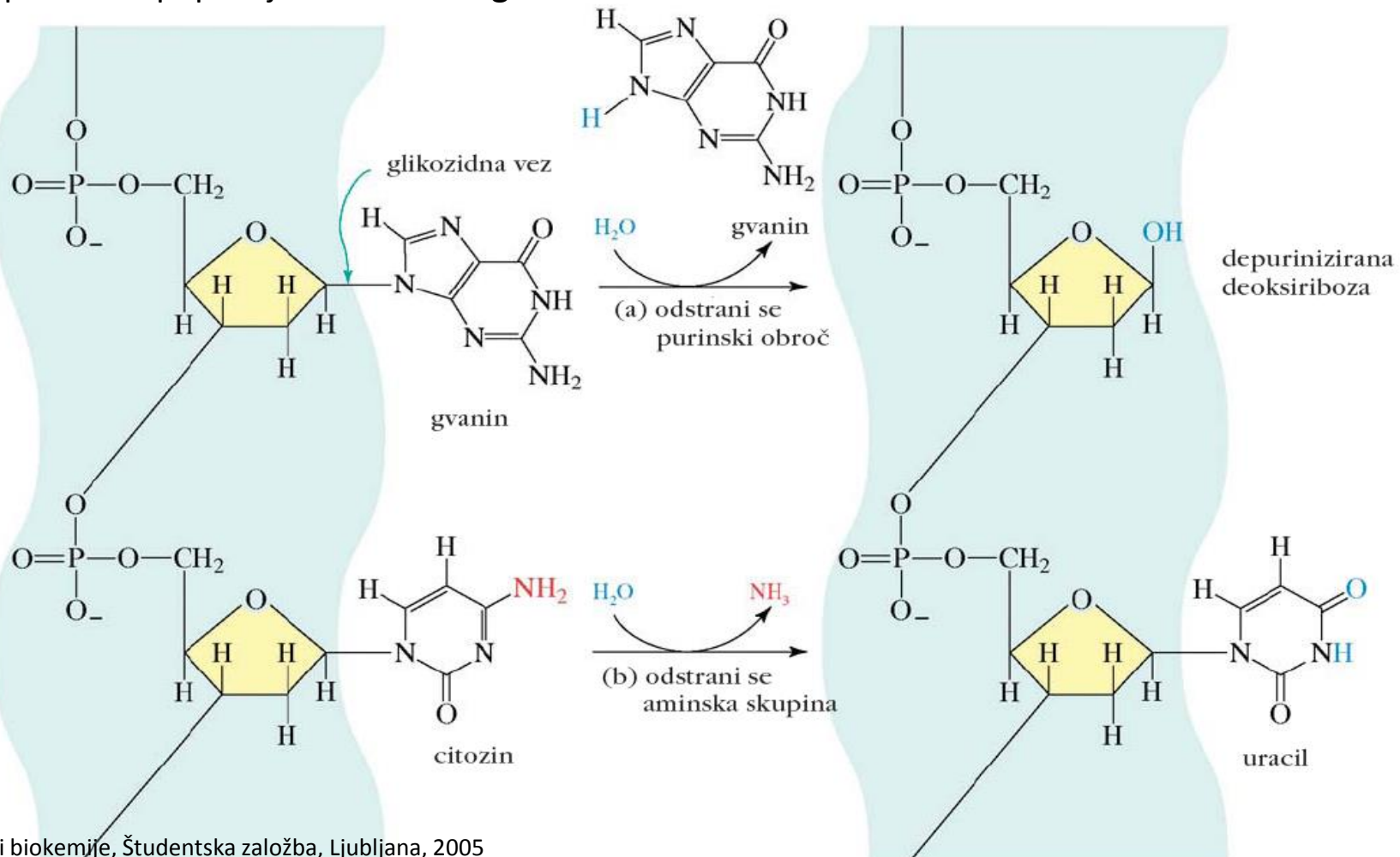


Figure 19-5 Principles of Biochemistry, 4/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

Spontane mutacije

- Druga najpogostejša vrsta spontanih poškodb DNA je posledica **hidrolize**.
- **Purinske baze** se pogosto **spontano hidrolizirajo** ob N-glikozidni vezi, tako da se odstrani purinski obroč (10^4 /celico/dan).
- Pogoste so tudi **deaminacije** heterocikličnih baz (najpogosteje C v U) (100 /celico/dan). Te poškodbe popravijo encimi **DNA-glikozidaze**.



Inducirane mutacije

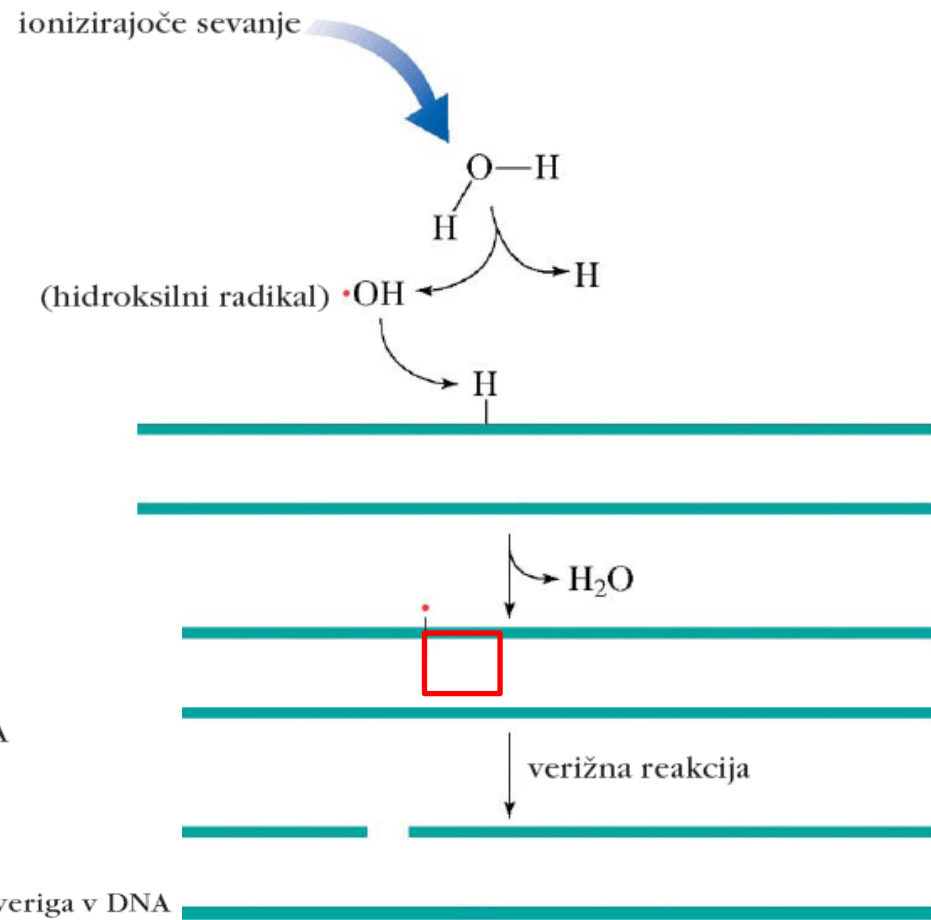
- **Dejavniki iz okolja**, ki povzročajo **inducirane mutacije** so **mutageni**.
- Pogosti mutageni: ionizirajoče sevanje, nekatere kemikalije, ultravijolična svetloba.

Ionizirajoče sevanje:

Verjetno je igralo pomembno vlogo v evoluciji.

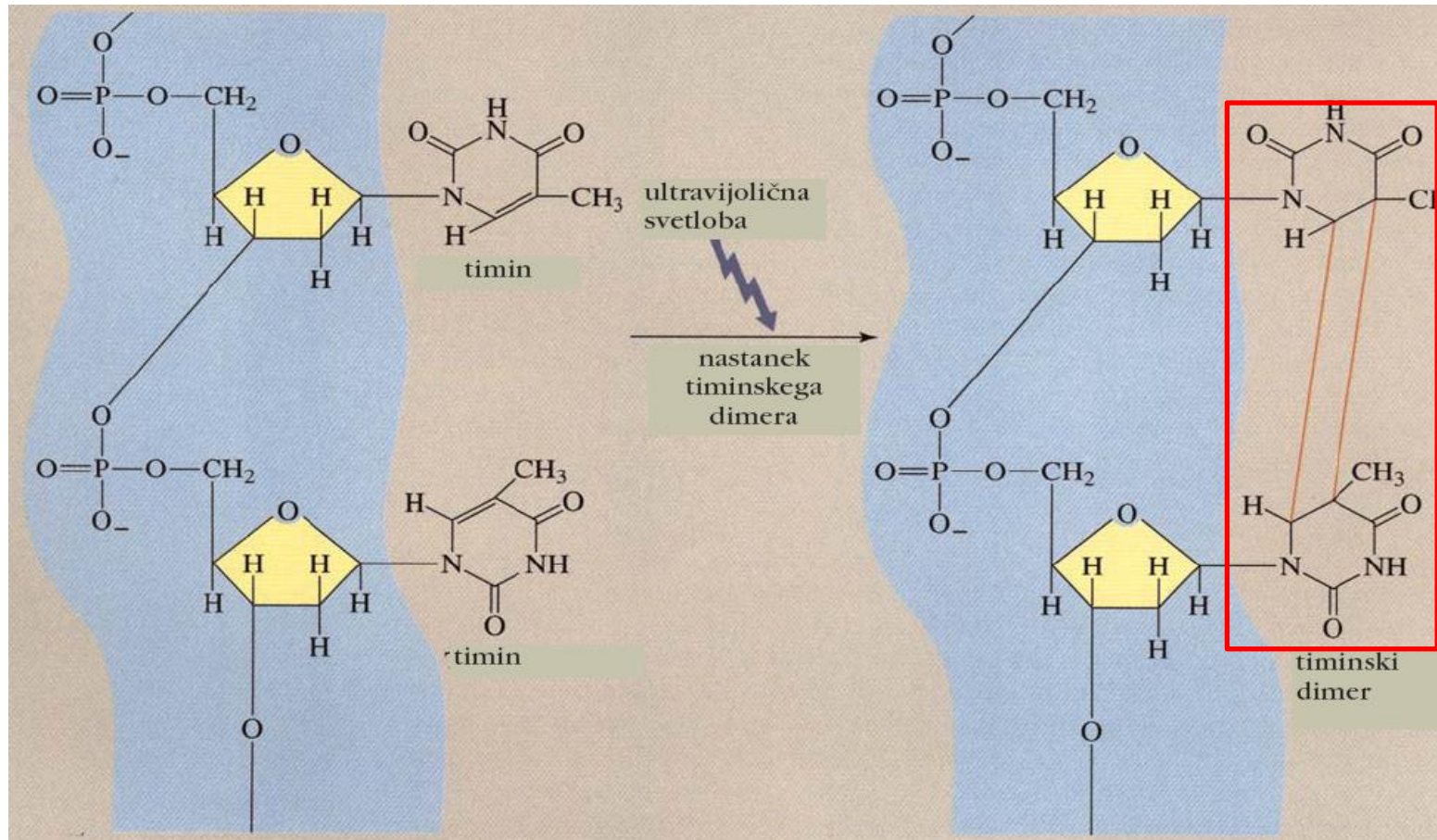
Pod vplivom sevanja molekule (npr. voda) razpadejo in nastanejo ioni ter visoko reaktivni **prosti radikali**, ki napadejo DNA. Sproži se verižna reakcija.

Dodatno zvita DNA je verjetno bolj **zavarovana**.



Inducirane mutacije

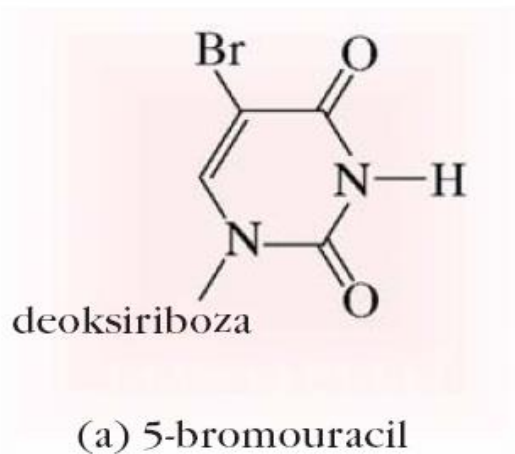
- **Ultravijolična svetloba:** kovalentna povezava sosednjih pirimidinskih baz.
- Dimeri povzročijo neobičajen upogib DNA, kar povzroči, da se pri podvojevanju veže napačen nukleotid (nastane mutacija).
- Pri *E. coli* tovrstne napake odpravlja encim **DNA-fotoliza**.
- Pri človeku obstajajo drugi popravilni mehanizmi. Nedelovanje le-teh vodi v nastanek kožnega raka.



Inducirane mutacije

- **Kemijski mutageni** – **analogi heterocikličnih baz**: se lahko vključijo v DNA, ki se podvojuje, in povzročijo vezavo napačnega nukleotida.

Analog timina, enolni tautomer se povezuje z G, keto pa z A. Pride do zamenjave baz AT za GC.



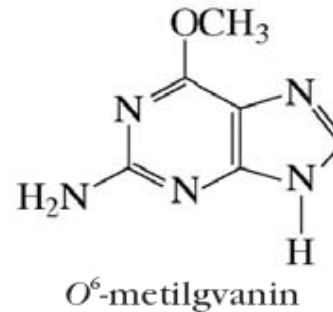
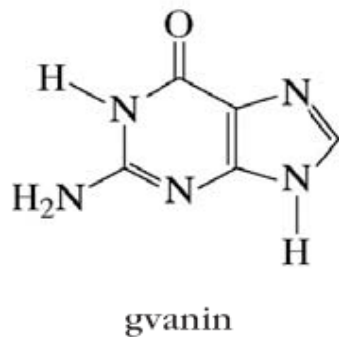
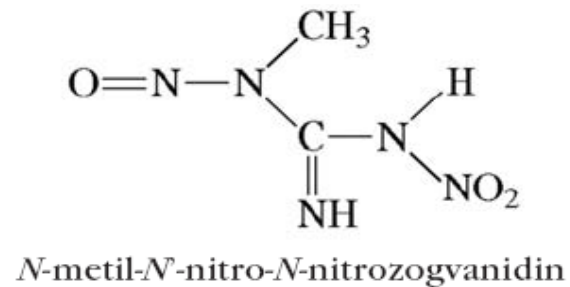
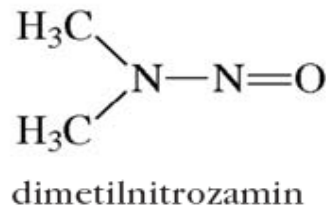
Analog adenina, pari se s T ali C. Pride do zamenjave baz AT za GC.



Inducirane mutacije

- **Kemijski mutageni – alkilirajoča sredstva**: reaktivni kemijski mutageni kemično spremenijo funkcionalne skupine na bazah DNA.

Metilirajoča sredstva pozročajo pretvorbo gvanina v O⁶-metilgvanin, ki se pari s T.



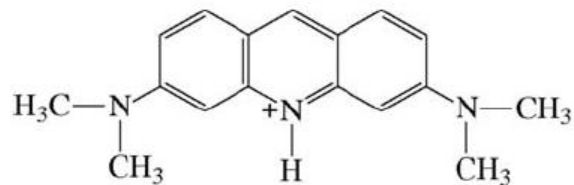
Inducirane mutacije

- **Kemijski mutageni – interkalirajoča sredstva**: so ploščate, hidrofobne, običajno aromatske molekule, ki se vrinejo med naložene bazne pare v DNA.
- Interakcija povzroči povečano razdaljo med bazami, ki vodi v mutacije z vrivanjem ali izločanjem baz (insercije/delecije).

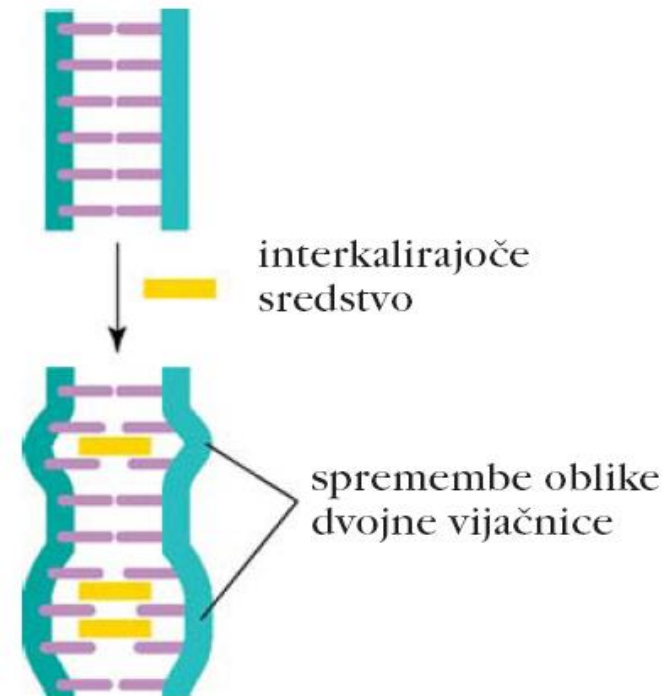
Pogosto ga uporabljamo za detekcijo DNA.



(a) etidijev bromid

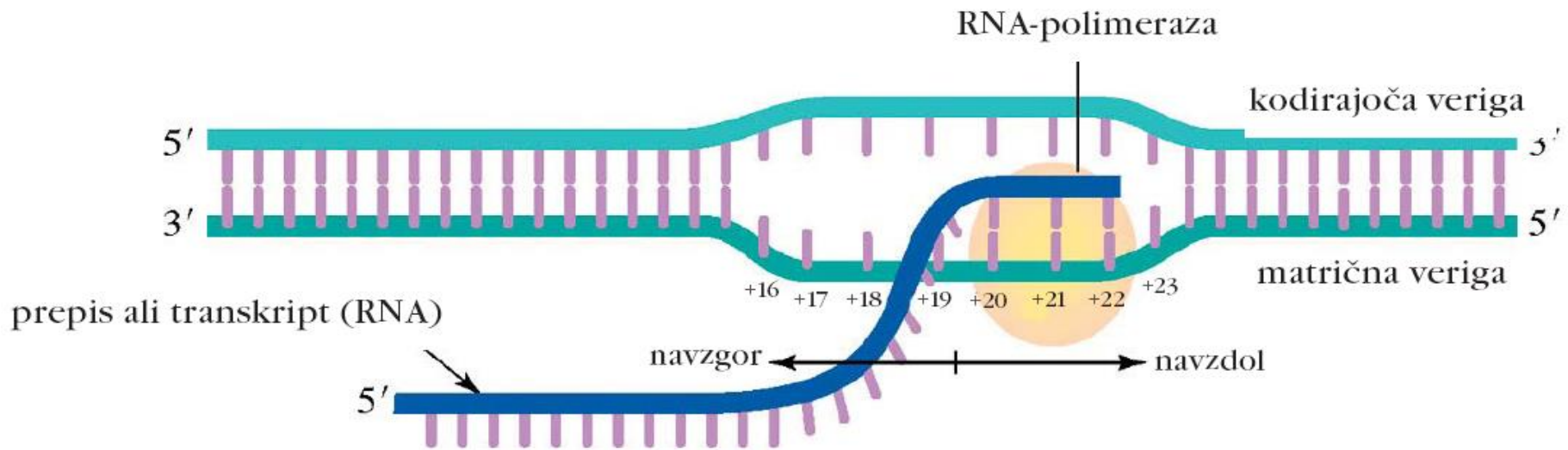


(b) akridin-oranžno



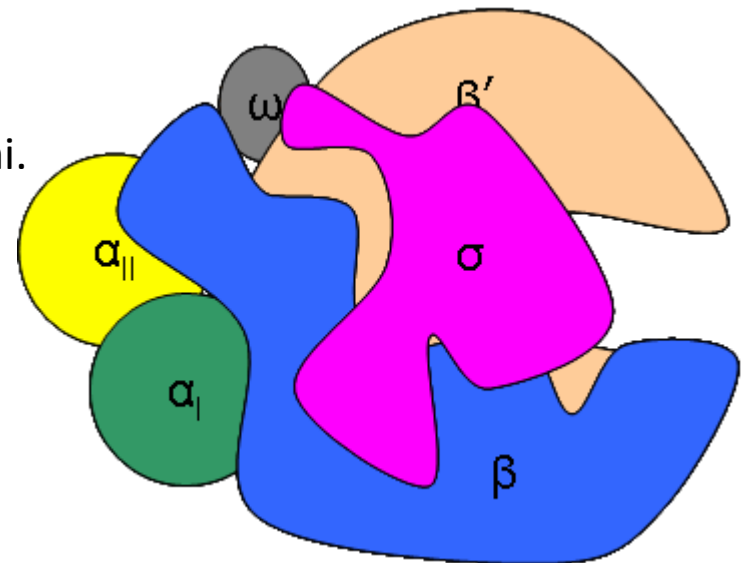
Sinteza RNA ali transkripcija

- Sinteza RNA poteka v smeri od 5' proti 3'.
- Nastali produkt se imenuje **transkript** ali **prepis**.
- Transkript je komplementaren **matrični verigi DNA**, enak pa **kodirajoči verigi** (njeno zaporedje je enako transkriptu, zamenjana sta le T in U).
- Pri **evkariontih transkripcija poteka v jedru**, pri prokariontih pa v citoplazmi.



Prokariontska RNA-polimeraza

- Encim, ki katalizira prepisovanje RNA in ga usmerja DNA, se imenuje **RNA-polimeraza**.
- **RNA-polimeraza nadzoruje in katalizira vse korake transkripcije.**
- RNA-polimeraza nima kontrolnega branja 3' proti 5'.
- Pri *E. coli* je **RNA-polimeraza velik in zapleten encimski sistem. Jedro encima je sestavljeno iz štirih vrst podenot: $\alpha_2\beta\beta'\omega$.**
- Osrednji encim ($\alpha_2\beta\beta'\omega$) vsebuje **katalitična mesta in mesta za vezavo substratov.**
- **σ -podenota** (obstaja v različnih velikostih) je potrebna za **usmerjanje encima na specifično mesto na DNA** in se po iniciaciji sinteze odstrani.
- Poznamo različne σ -podenote, ki se vežejo na različne promotorje.
- Vseh šest podenot sestavlja **holoencim** .



Evkariontska RNA-polimeraza

- **Osnovni mehanizem delovanja je pri pro- in evkariontih podoben**, kljub temu pa je pri evkariontih proces mnogo bolj kompleksen in reguliran.
- Pri evkariontih poznamo tri vrste RNA-polimeraz:
 - **RNA-polimeraza I** prepisuje dolge gene ribosomskih RNA.
 - **RNA-polimeraza II** prepisuje gene, ki kodirajo proteine.
 - **RNA-polimeraza III** prepisuje kratke RNA, vključno s tRNA in 5s rRNA.

TABLE 26-2 Proteins Required for Initiation of Transcription at the RNA Polymerase II (Pol II) Promoters of Eukaryotes			
Transcription protein	Number of subunits	Subunit(s) M_r	Function(s)
Initiation			
Pol II	12	10,000–220,000	Catalyzes RNA synthesis
TBP (TATA-binding protein)	1	38,000	Specifically recognizes the TATA box
TFIIA	3	12,000, 19,000, 35,000	Stabilizes binding of TFIIB and TBP to the promoter
TFIIB	1	35,000	Binds to TBP; recruits Pol II–TFIIF complex
TFIIE	2	34,000, 57,000	Recruits TFIIH; has ATPase and helicase activities
TFIIF	2	30,000, 74,000	Binds tightly to Pol II; binds to TFIIB and prevents binding of Pol II to nonspecific DNA sequences
TFIIH	12	35,000–89,000	Unwinds DNA at promoter (helicase activity); phosphorylates Pol II (within the CTD); recruits nucleotide-excision repair proteins
Elongation*			
ELL [†]	1	80,000	
pTEFb	2	43,000, 124,000	Phosphorylates Pol II (within the CTD)
SII (TFIIS)	1	38,000	
Elongin (SIII)	3	15,000, 18,000, 110,000	

*The function of all elongation factors is to suppress the pausing or arrest of transcription by the Pol II–TFIIF complex.

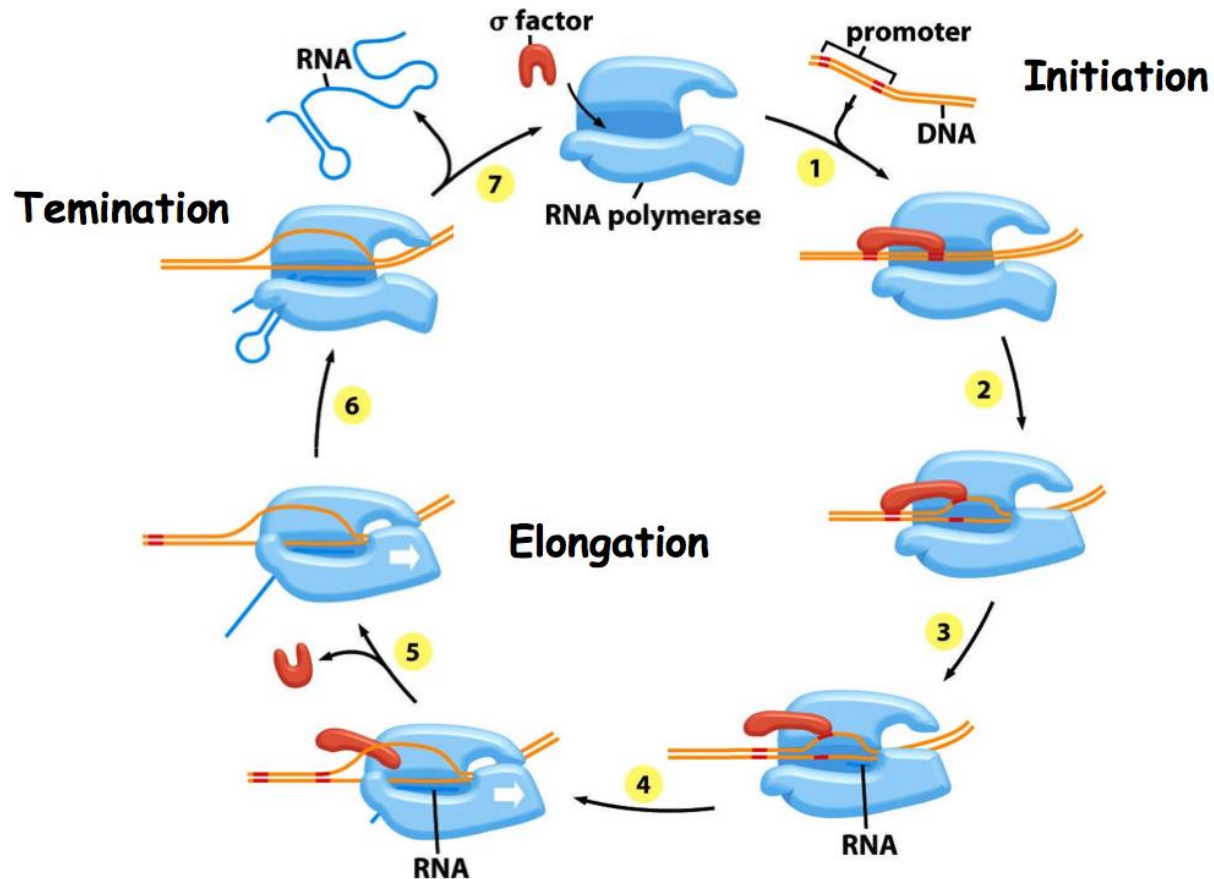
Sinteza RNA

Sinteza RNA poteka v treh korakih:

1. začetek ali **iniciacija**,
2. podaljševanje ali **elongacija**,
3. zaključek ali **terminacija**.

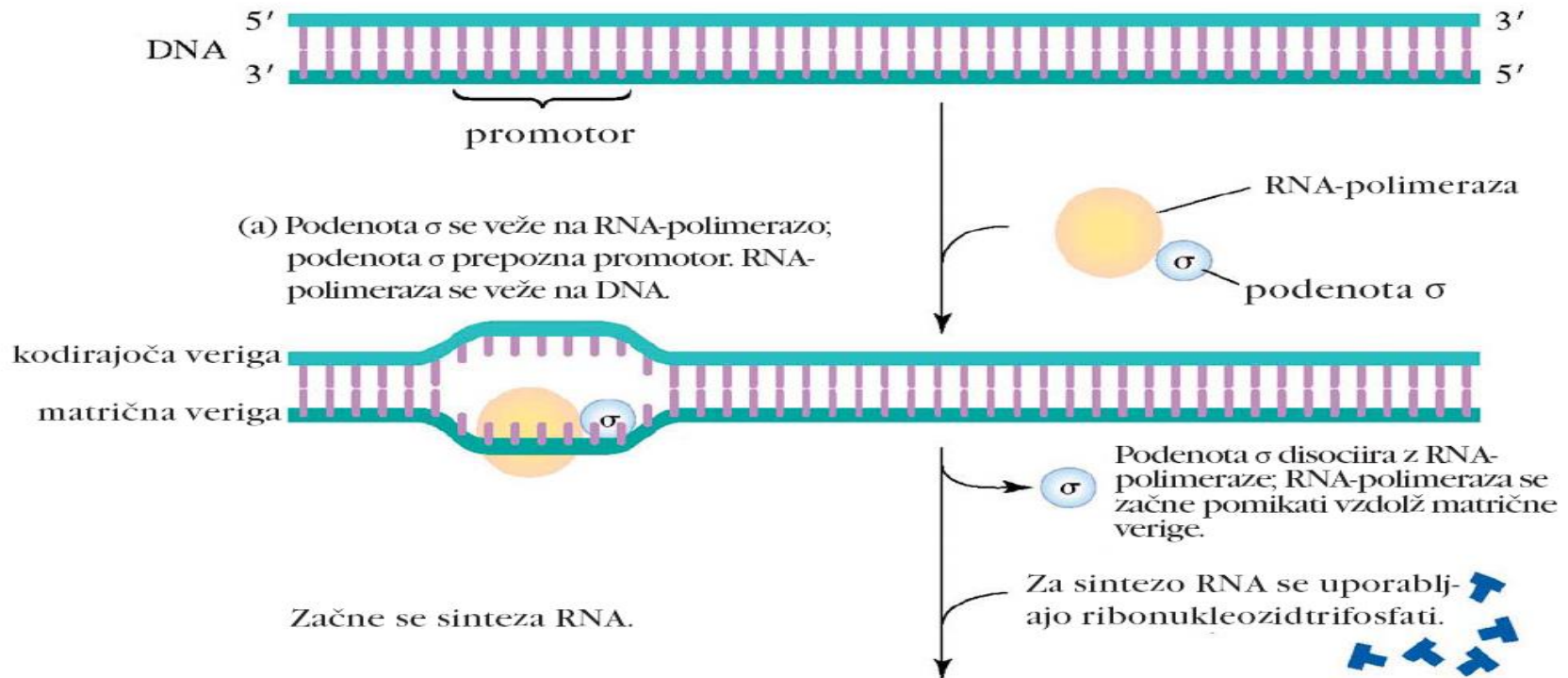
Za reakcijo so potrebni:

1. štiri vrste **ribonukleozidtrifosfatov**,
2. **matrica DNA**,
3. **Mg²⁺ ioni**.



Iniciacija transkripcije

- Prepisovanje se začne s prepoznavanjem **promotorske regije** in začetkom sinteze RNA.
- **Močnejša vezava** na promotorsko zaporedje (še posebej regija -10) upočasni napredovanje RNA-polimeraze in povzroči razprtje dvojne vijačnice DNA.
- **Odpre se regija dolga od 12 do 15 bp** in nastane prepisovalni mehurček.
- RNA-polimeraza katalizira nastanek fosfoestrške vezi med prvima dvema nukleotidoma.
- **RNA-polimeraza ne potrebuje začetnega ribonukleotida.**



Promotorji

- Promotorji so od 20 do 200 bp dolgi odseki DNA pred mestom začetka prepisovanja.

- Promotorji pri *E. coli*:

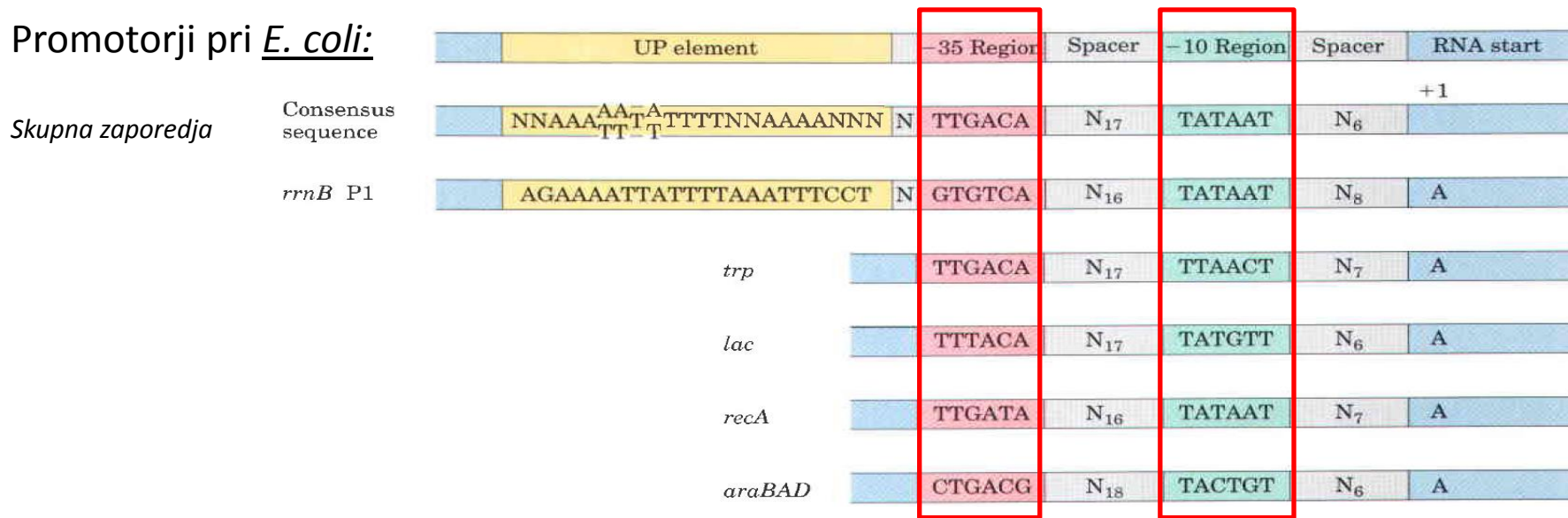
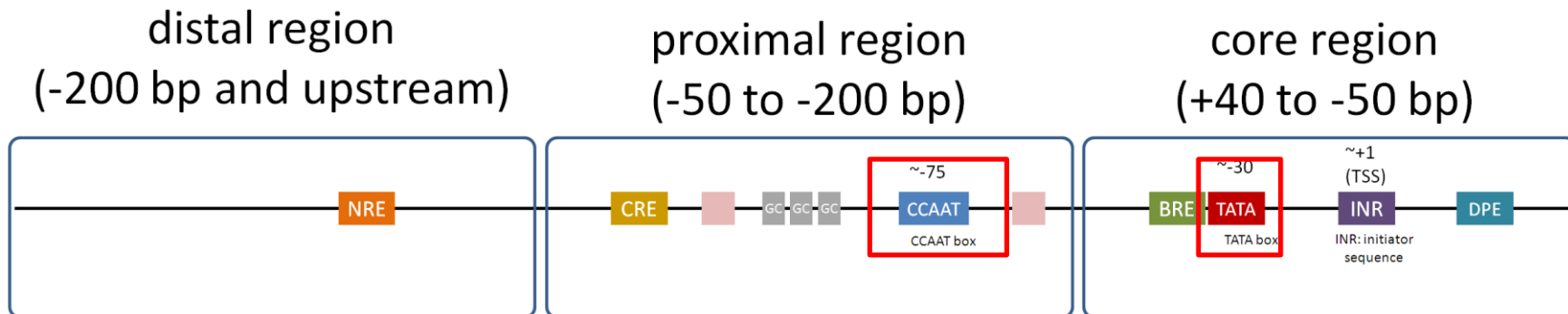


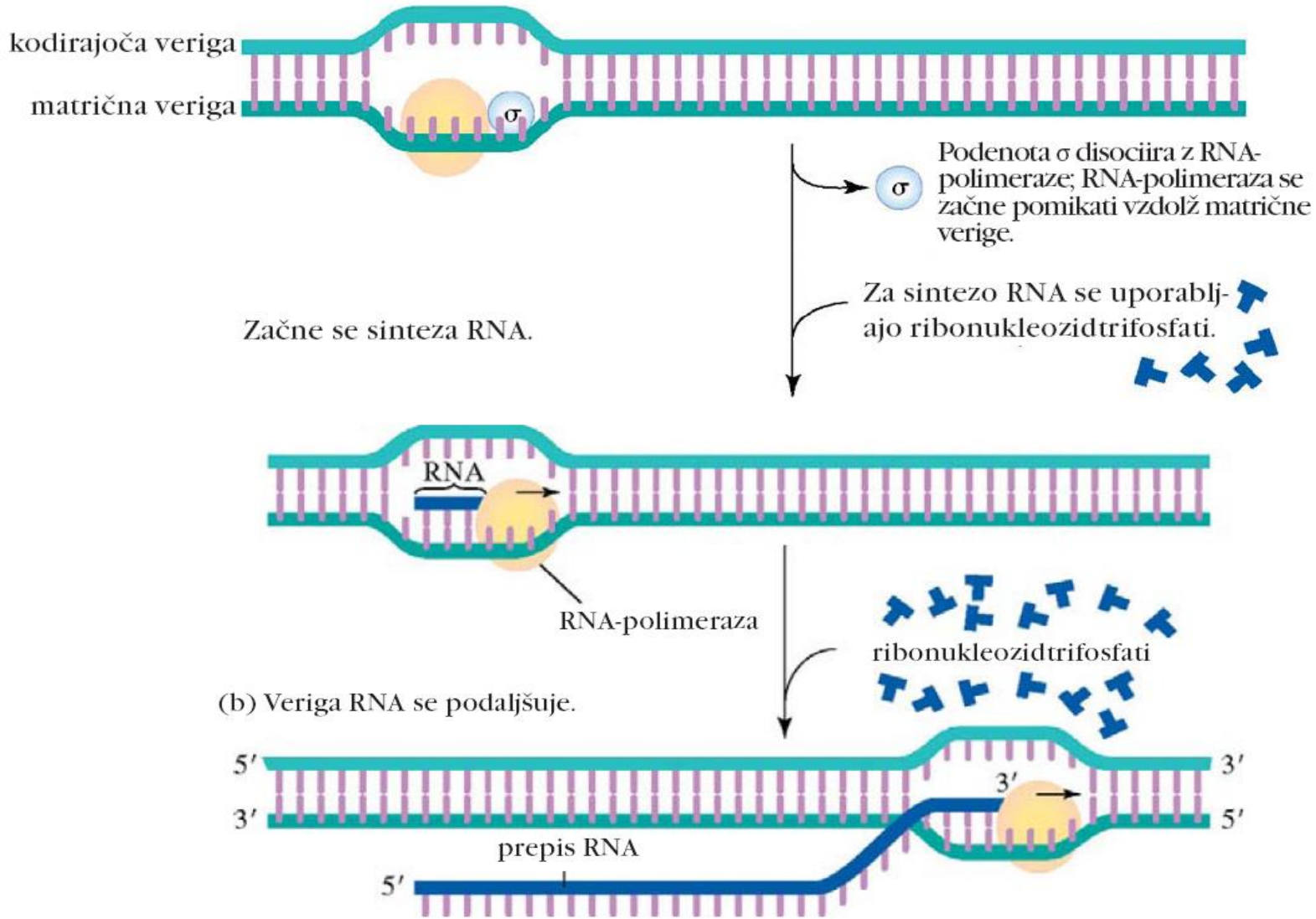
Fig. 26-5, Lehninger, 5th ed., 2008

Pribnowo zaporedje

- Evkariontski promotor (gen za inzulin):

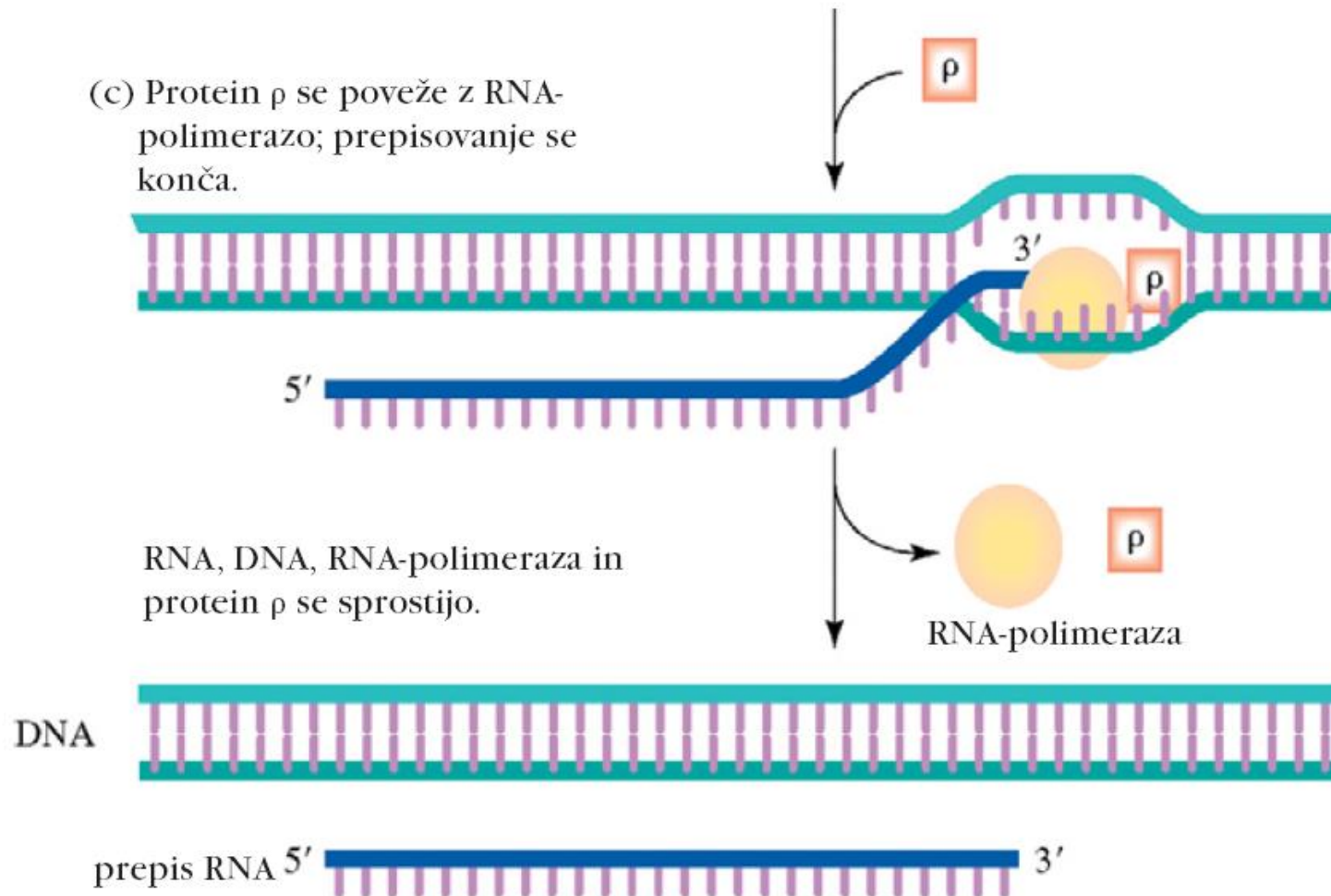


Elongacija



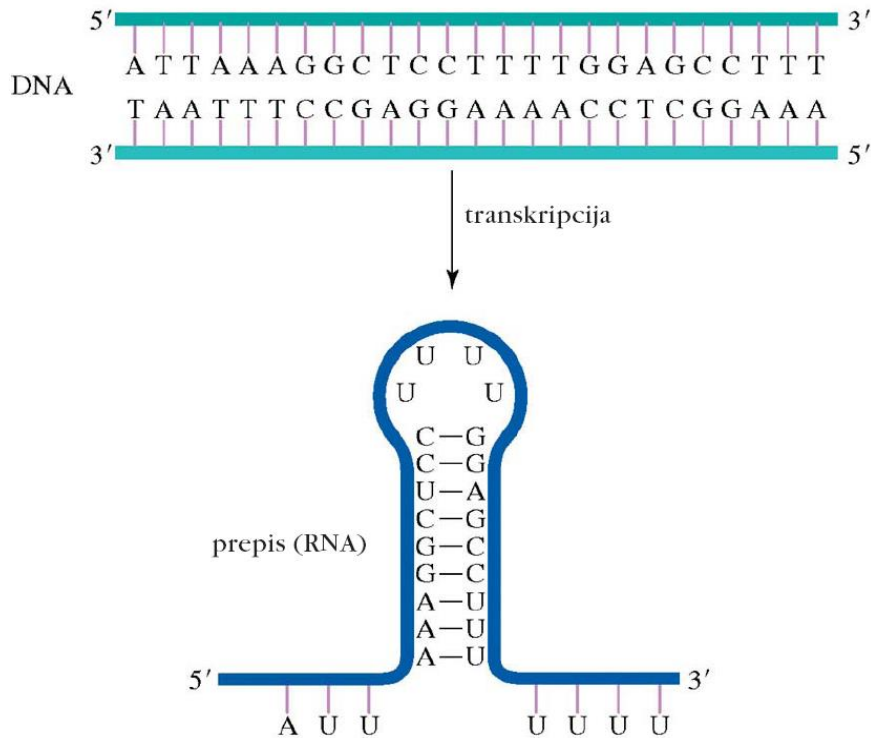
Terminacija transkripcije

- Prepisovanje se konča na določenem zaporedju DNA, ki označuje konec.
- Pri *E. coli* poznamo dva načina terminacije: s **pomožnim terminacijskim dejavnikom ρ** in s tvorbo stabilne lasnične zanke v RNA.

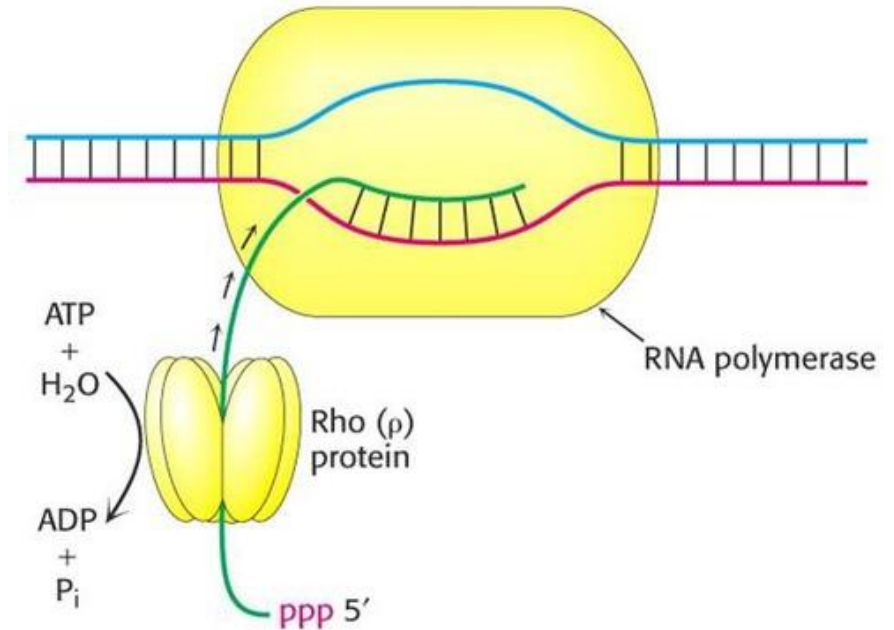


Terminacija transkripcije

terminacija z lasnično zanko

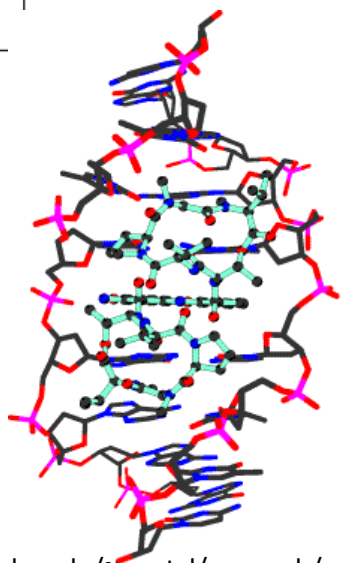
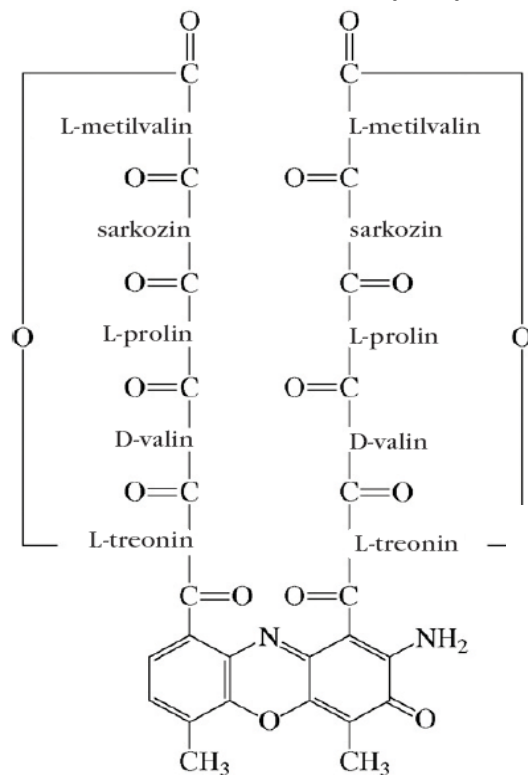


terminacija s proteinom ρ (ro)

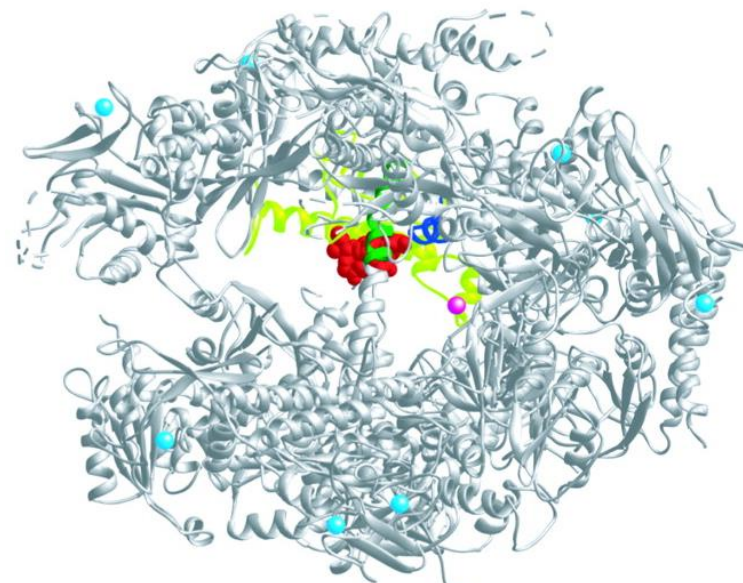
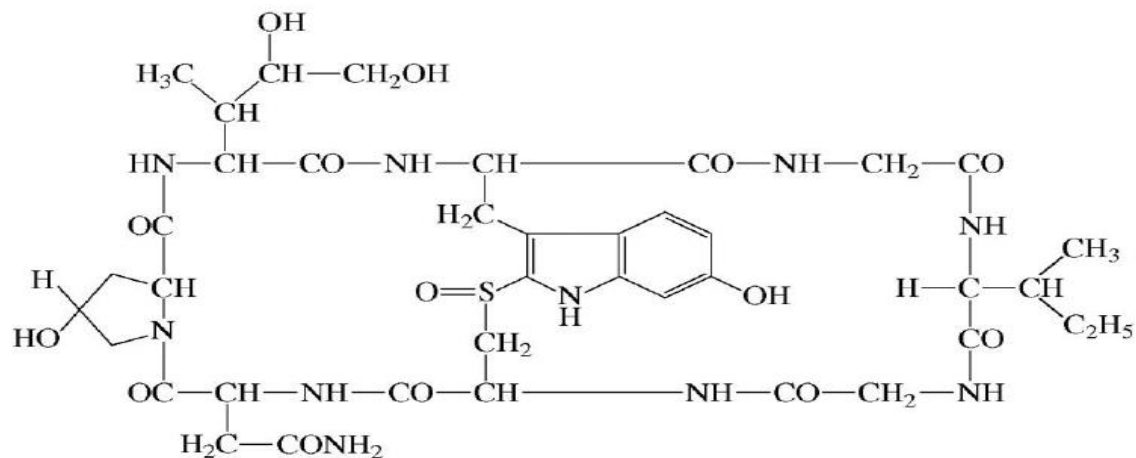


Inhibitorji transkripcije

Aktinomycin D (antibiotik) se interkalira v matrico DNA in zaustavi prepisovanje.

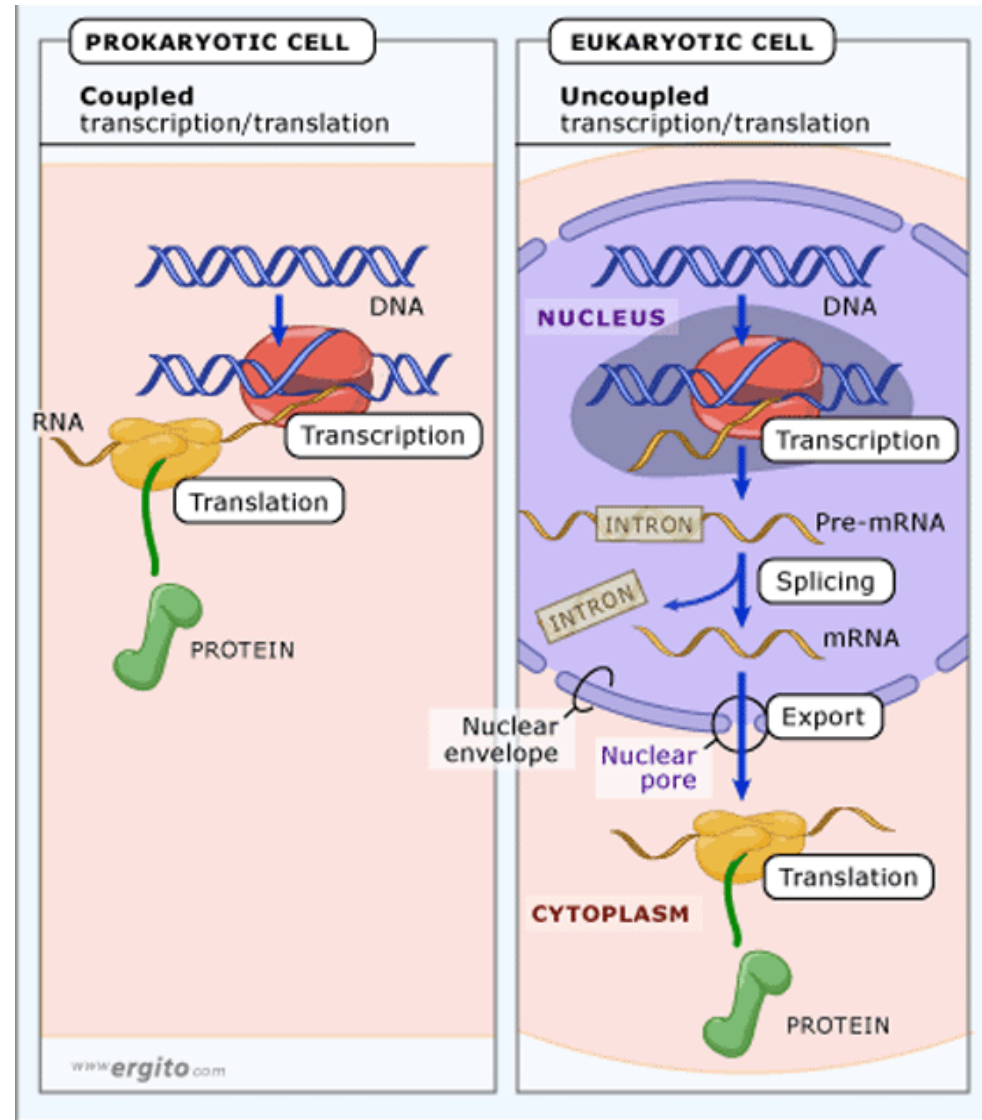


α -amanitin (zelena mušnica) pri živalih se veže na RNA-pol. II in prepreči nastajanje mRNA.



Zorenje mRNA

- Večina **prokariontskih** mRNA potrebuje le malo ali pa nič modifikacij.
- Prevajajo se lahko že med prepisovanjem.
- Zaporedje DNA je **kolinearno** aminokislinski sekvenci.
- Ena sama molekula mRNA lahko vsebuje zapis za več genov hkrati – je **policistronska**.
- **Evkariontske** mRNA se po translaciji kemijsko modificirajo.
- Prevajajo se v citosolu.
- Evkariontske mRNA vsebujejo **intorne**-nekaodirajoče dele DNA in **eksone**-kodirajoče dele DNA.
- mRNA kodirajo zapis za en sam protein – so **monocistronske**.



Zorenje mRNA

- **Evkarionstke mRNA se v jedru kemijsko modificirajo.**
- Sledi prenos iz jedra in prevajanje na ribosomih.
- Pri večini evkariontskih mRNA prepisih potekajo trije biokemijski procesi:

1. **Pokrivanje 5'-konca.**
2. Sinteza **poli-A repa** na 3'-koncu.
3. **Izrezovanje intronov.**

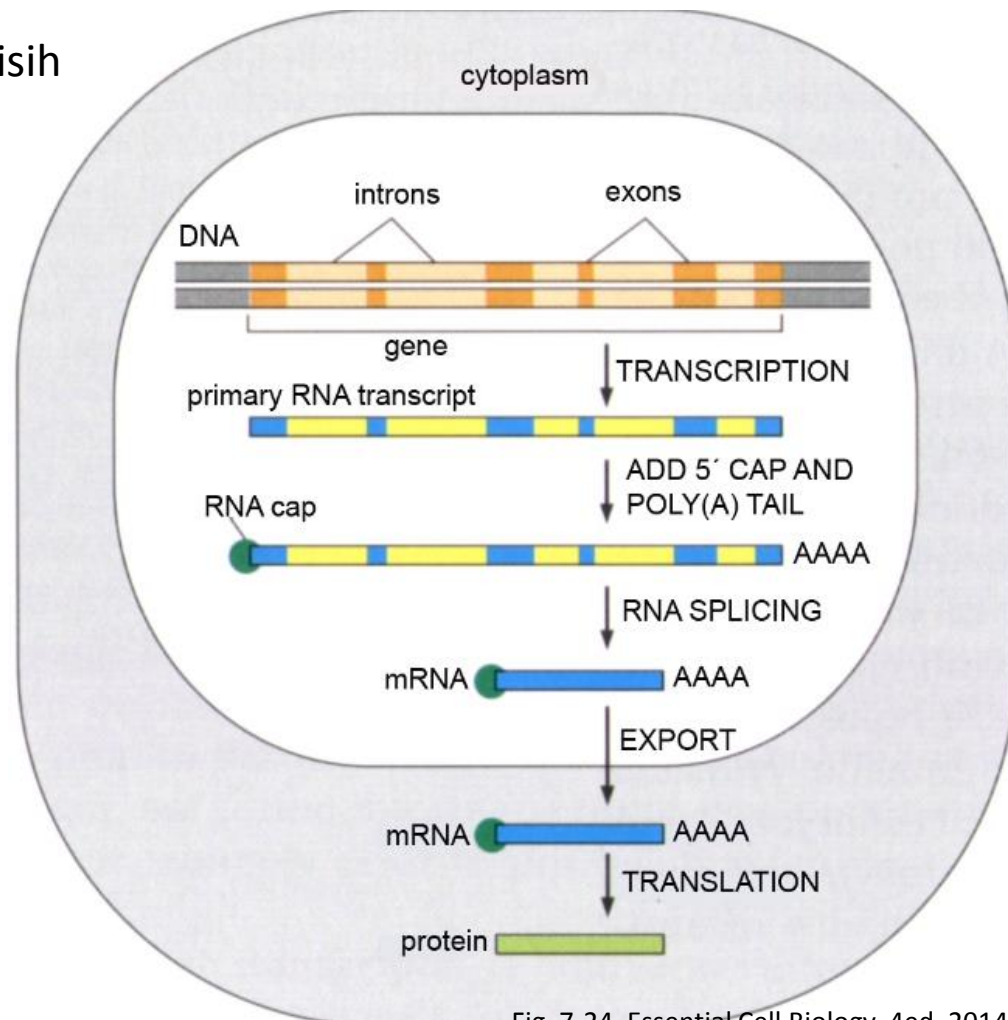
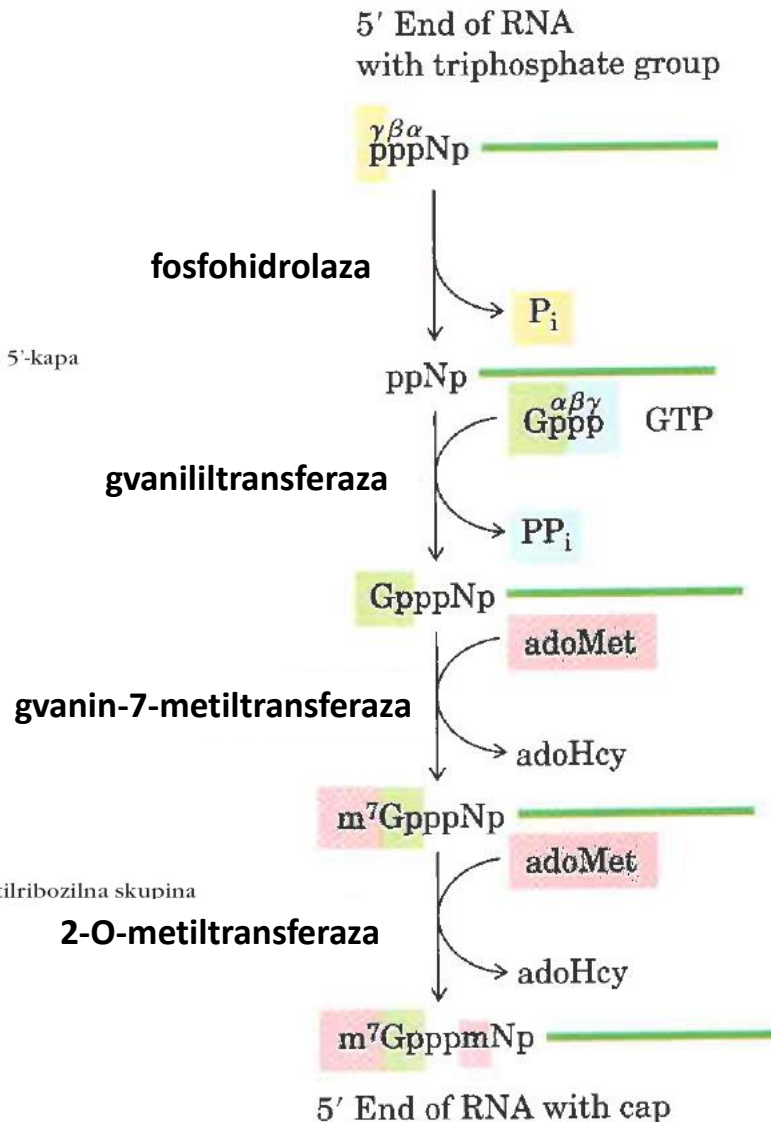
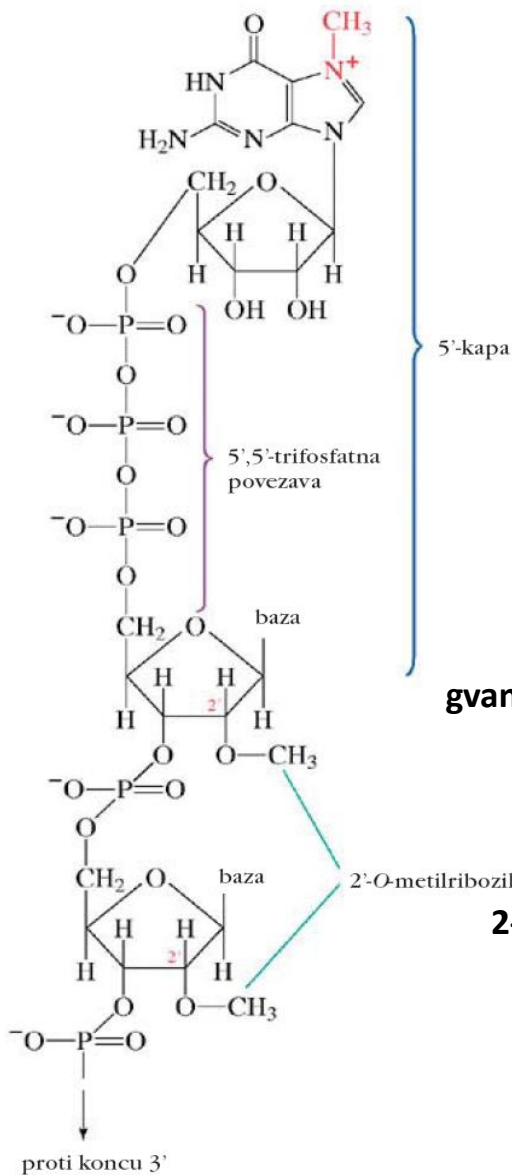


Fig. 7-24, Essential Cell Biology, 4ed, 2014

Zorenje mRNA – dodajanje 5' kape

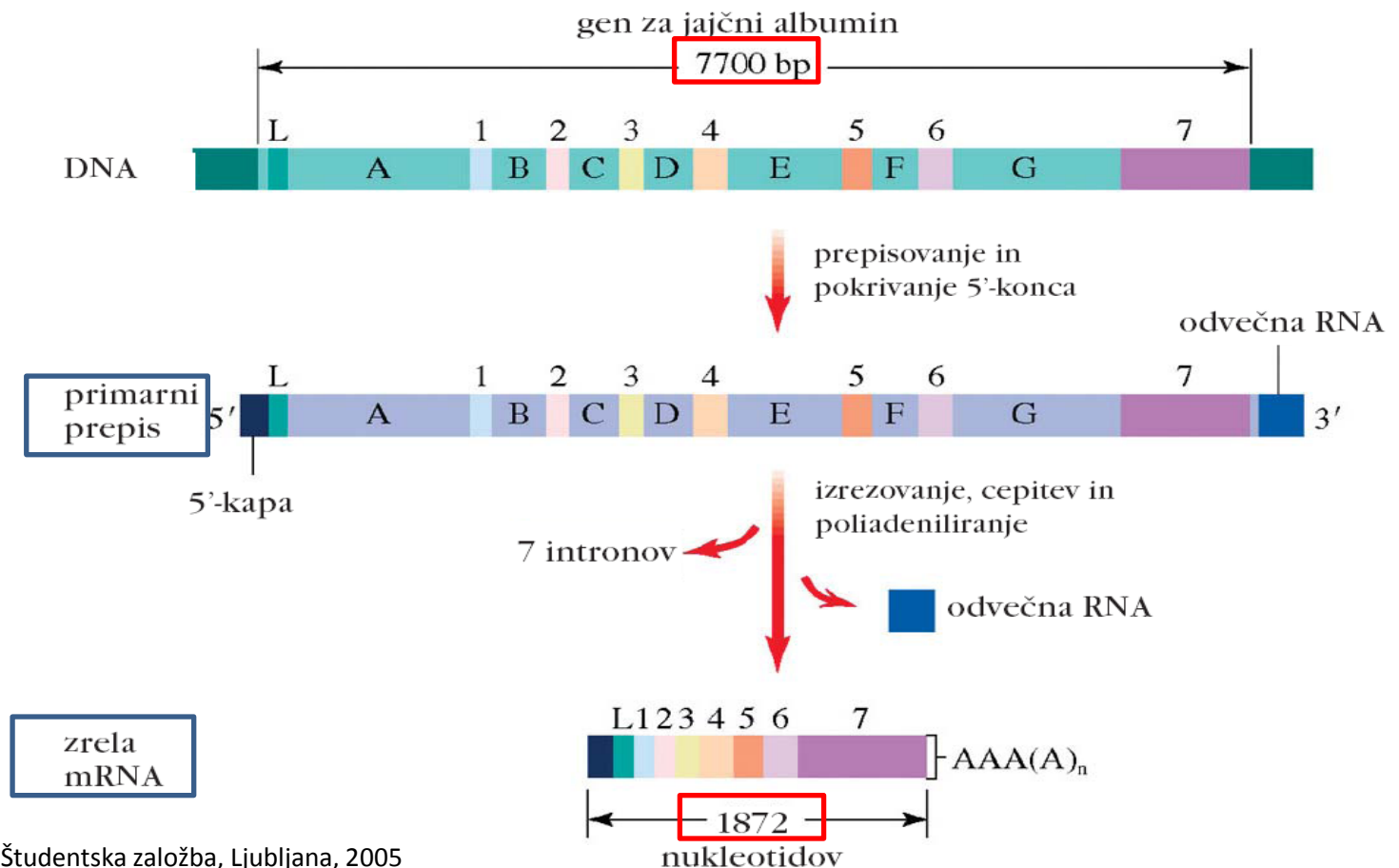


Pokrivanje zrelih mRNA je verjetno potrebno za **označevanje zrelih mRNA** in za **zaščito pred razgradnjo z ribonukleazami**.

Pokrivanje poteče že zgodaj v sintezi mRNA, ko je prepisanih prvih 20 do 30 nukleotidov.

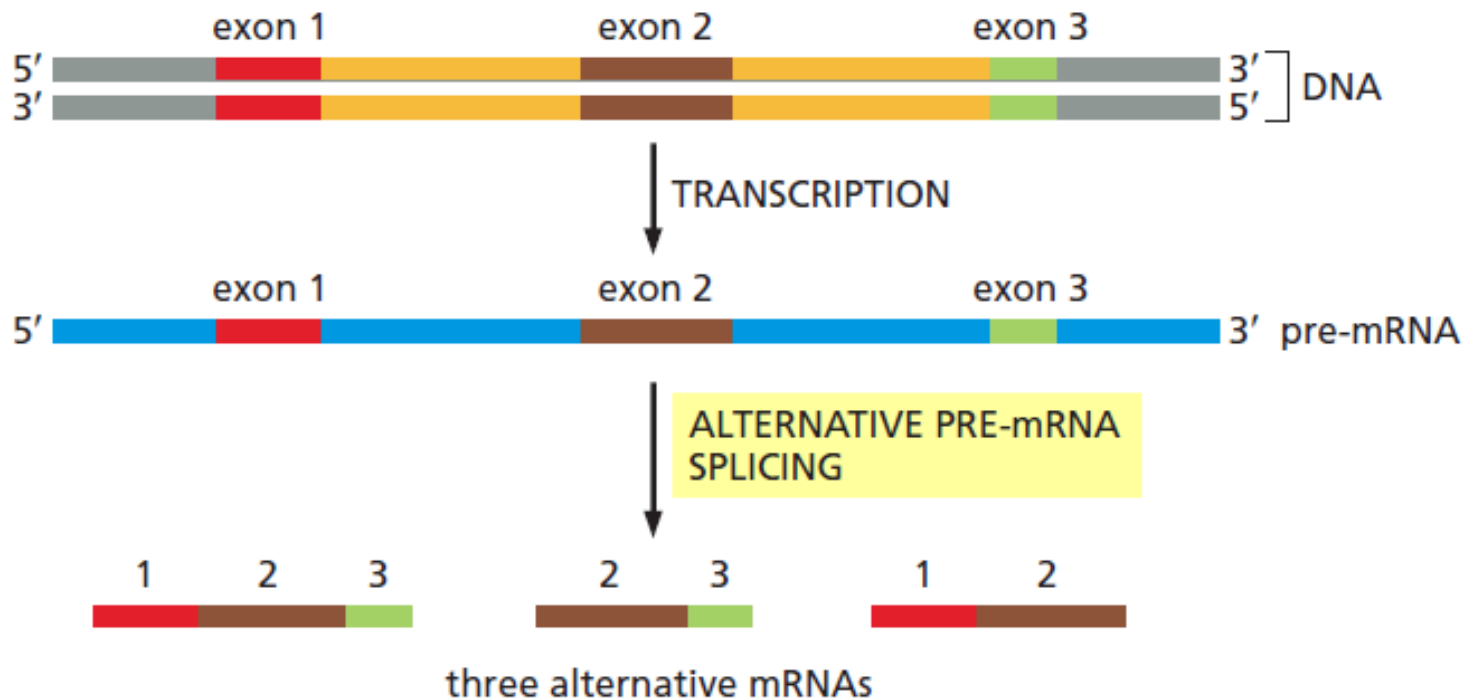
Zorenje mRNA – spajanje eksonov

- **Spajanje eksonov** ali izrezovanje intronov ali **splicing**.
- Spajanje eksonov poteka s cepitvijo in preoblikovanjem fosfodiestrskih vezi – reakcija **transesterifikacije**.
- Pri evkariontih je večina eksonov krajša od 1000 bp, introni pa variirajo od 50 do 20 000 bp.



Zorenje mRNA – spajanje eksonov

- 95 % evkarionstkih genov se izrezuje z **alternativnim izrezovanjem (alternative splicing)**, katerega posledica je večje število različnih proteinov.



Zorenje mRNA – spajanje eksonov

- Poznamo več različnih načinov izrezovanja intronov.
- Nekateri se lahko izrezujejo avtokatalitično.

Reakcija transesterifikacije: nukleofilni napad 3' –OH skupine G

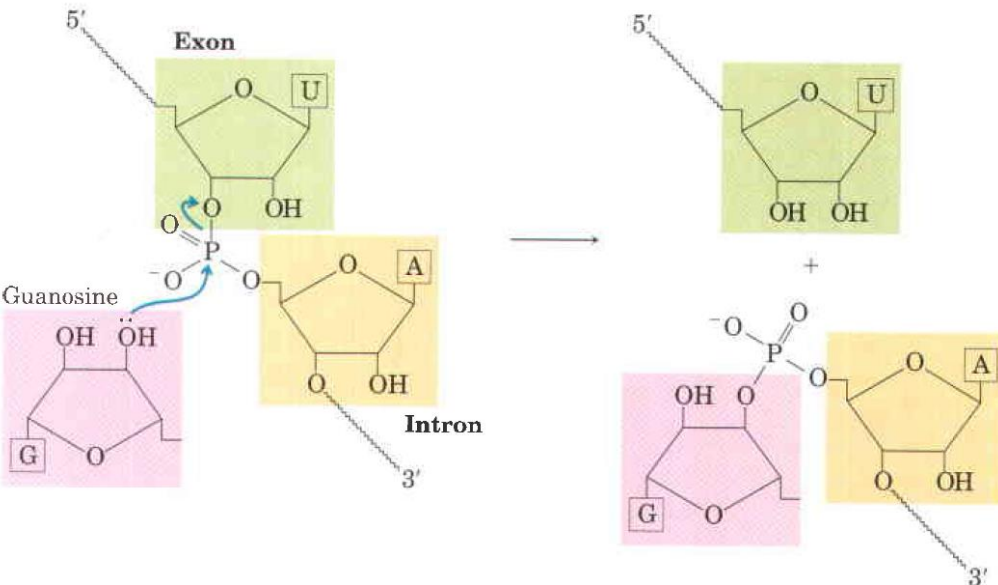


Fig. 26-14, Lehninger, 5th ed., 2008

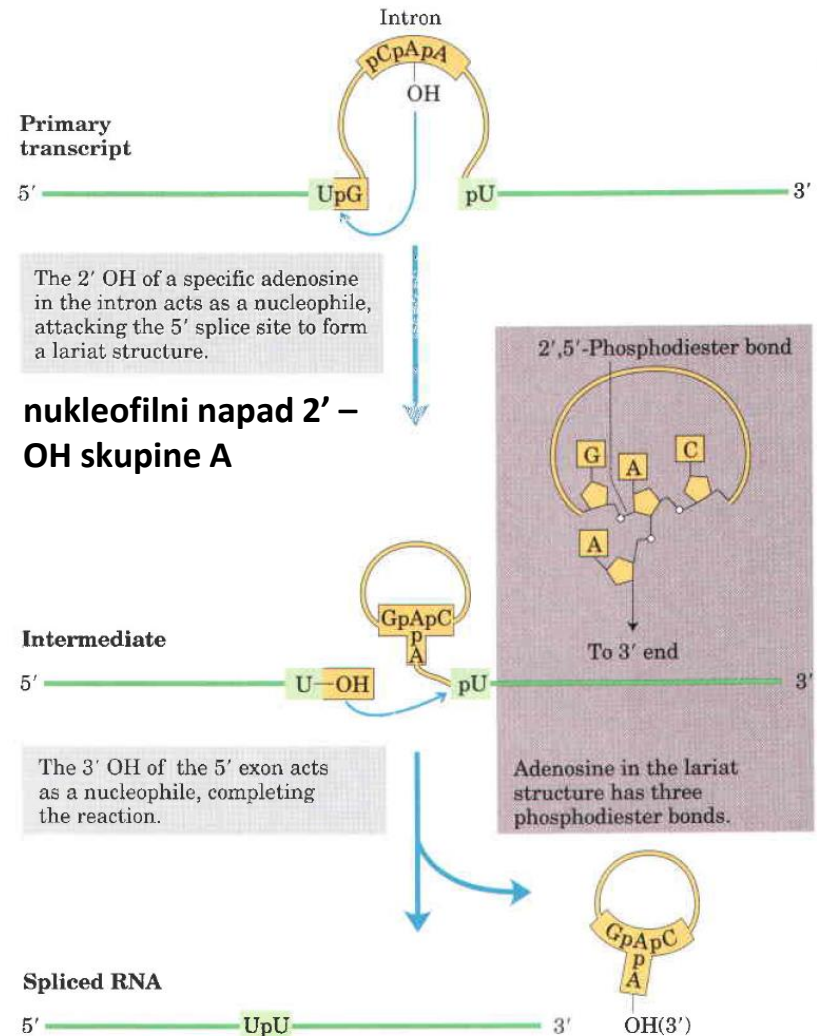


Fig. 26-16, Lehninger, 5th ed., 2008

Zorenje mRNA – spajanje eksonov

Izrezovanje intronov poteka na točno določenih mestih v mRNA.

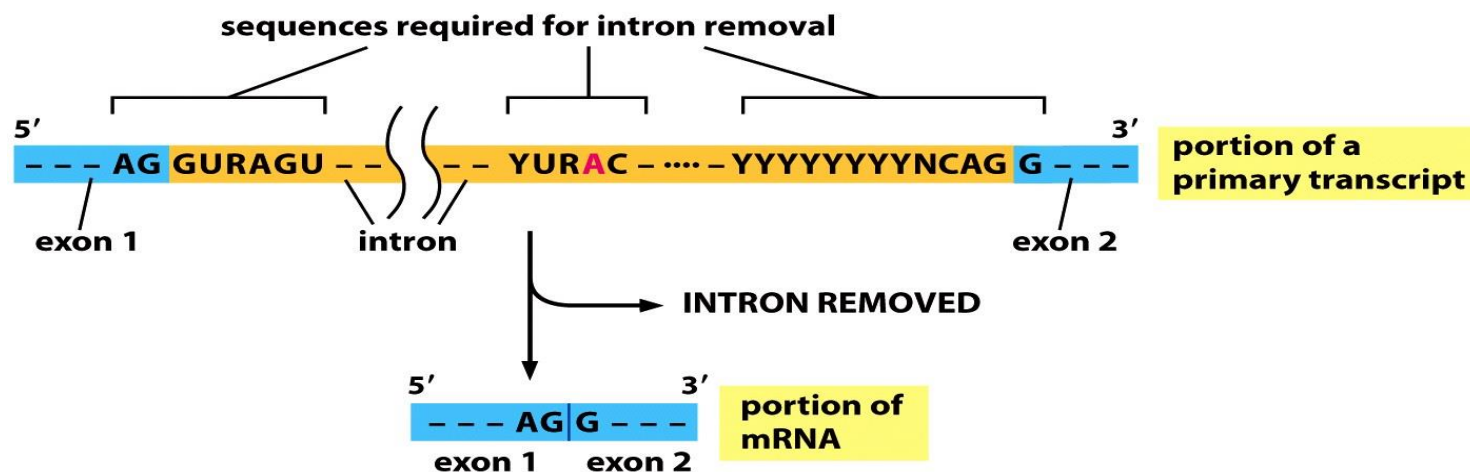


Figure 7-19 Essential Cell Biology 3/e (© Garland Science 2010)

R = A ali G

Y = C ali U

N = katerikoli nukleotid

Zorenje mRNA – spajanje eksonov

- Pri evkariontih izrezovanje intronov iz **mRNA** katalizira proteinski kompleks **splicesom**, ki vsebuje komplekse snRNA in proteinov ali **snRNP** (small nuclear ribonucleoproteins). Najpogostejše snRNA: U1, U2, U4, U5 in U6.
- **Energija ATP** je potrebna za sestavljenje splicesoma.

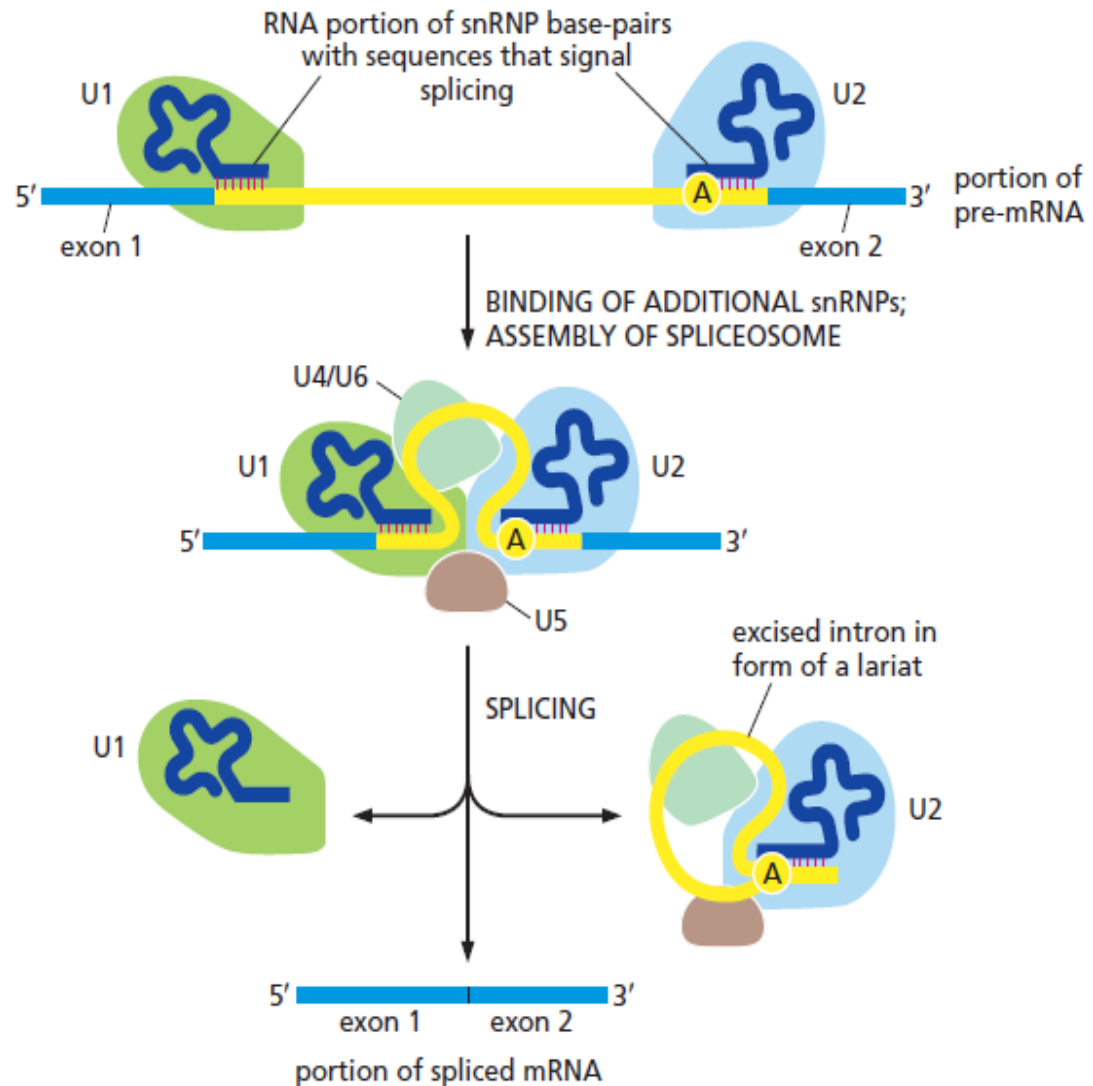
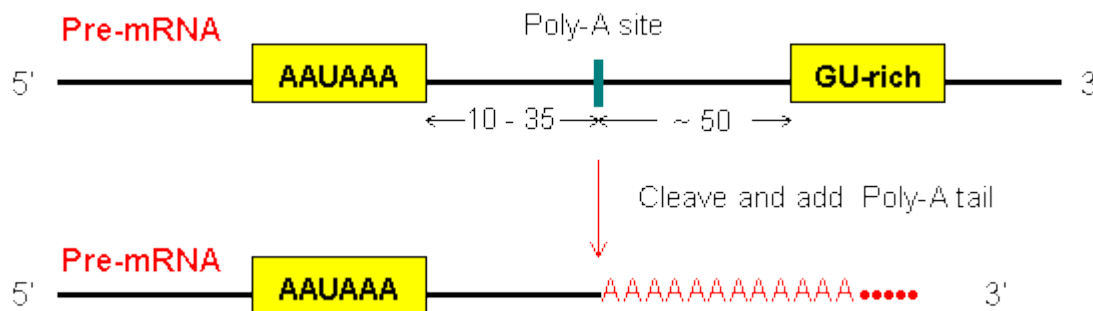


Fig. 7-21. Essential Cell Biology, 3ed

Zorenje mRNA – dodajanje poli-A repa

- 3'-konec se modificira z dodajanjem poliadenilatnega repa (**poli-A rep**).
- Dolg je od **20 do 250 nukleotidov**.
- Dodajanje poli-A katalizira **poliadenilat-polimeraza**.
- Pri **evkariontih poli-A verjetno stabilizira molekulo mRNA** in poveča njeno odpornost proti nukleazam.
- Pri prokariontih poli-A rep stimulira razgradnjo mRNA.



<http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch5A.htm>

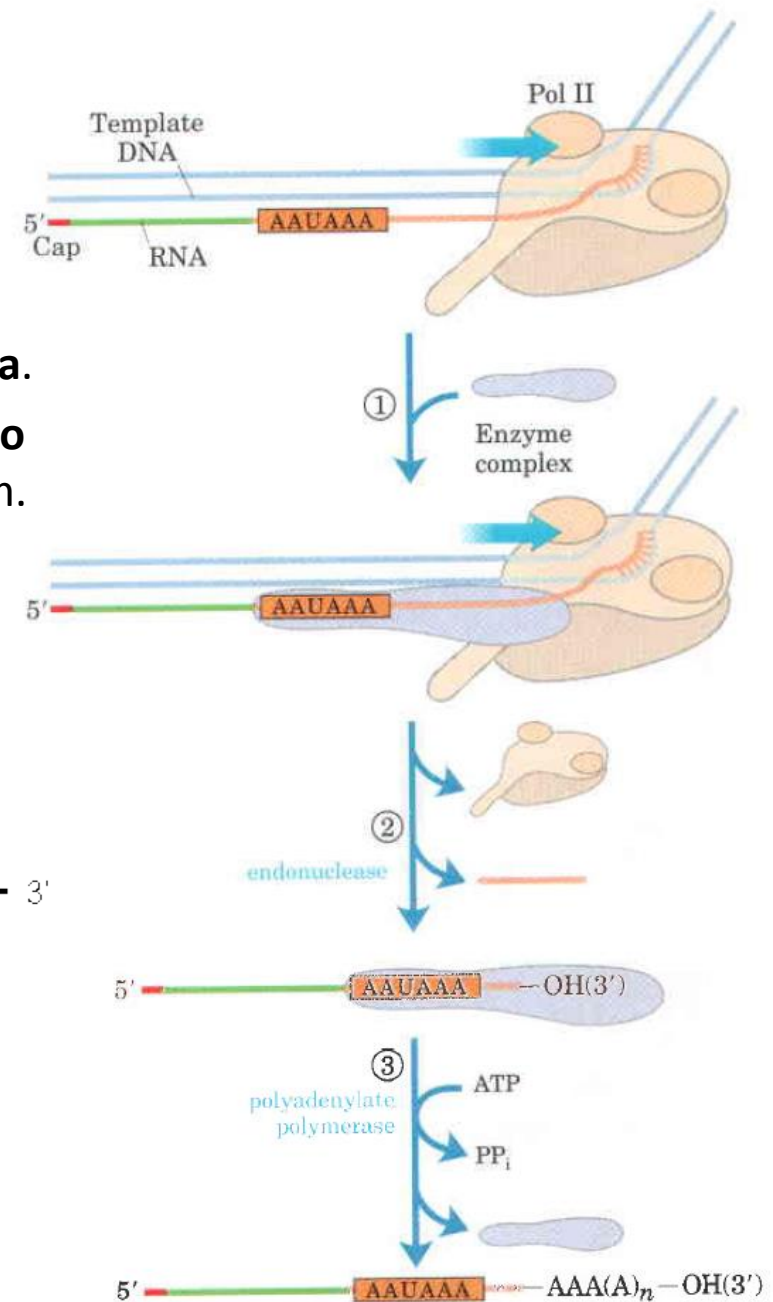
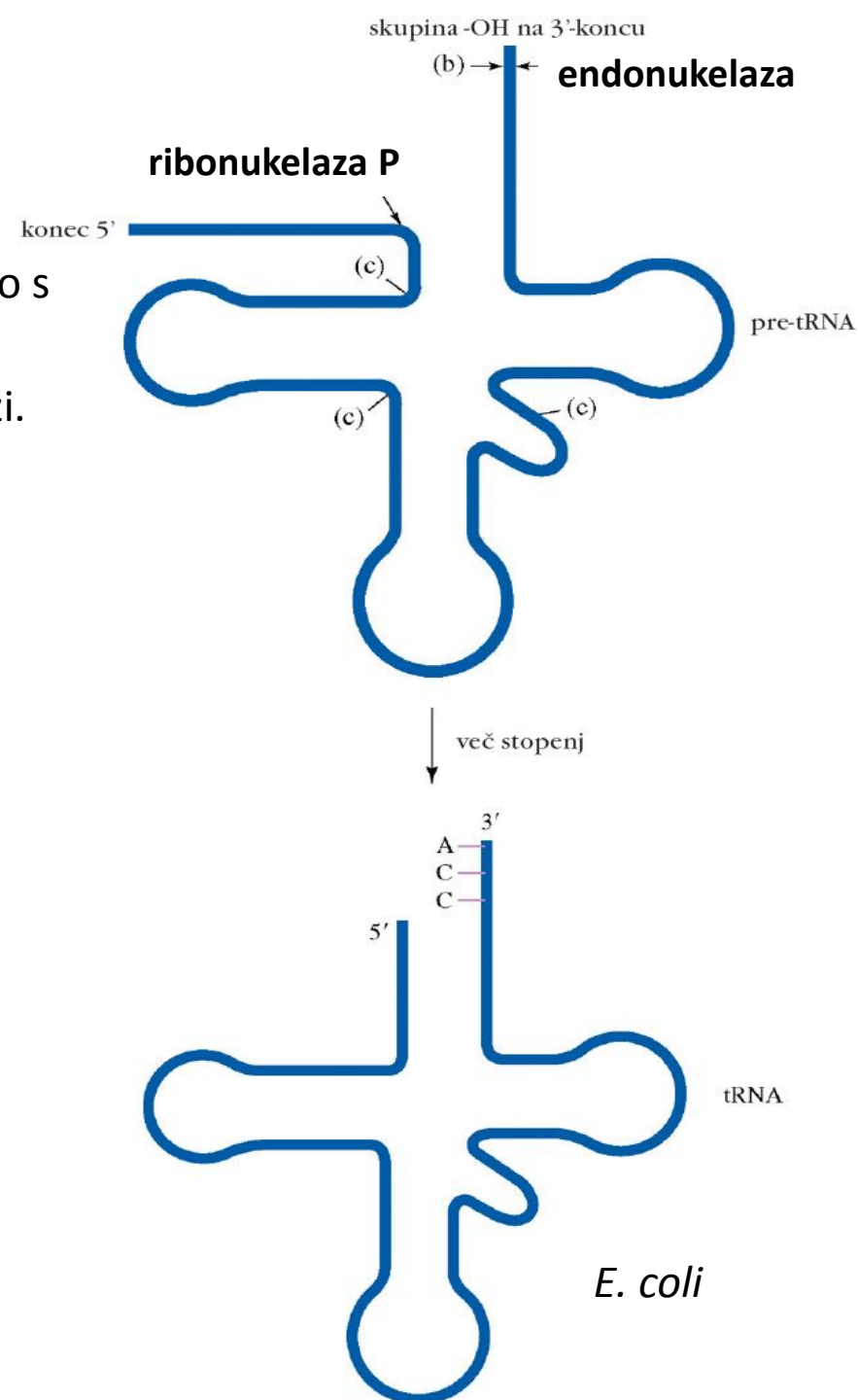


Fig. 26-18, Lehninger, 5th ed., 2008

Zorenje tRNA

- Evkariontske tRNA se biokemijsko spremenijo s štirimi procesi:
 1. Krajšanje koncev s cepitvijo fosfoestrskih vezi.
 2. Izrezovanje introna.
 3. Dodajanje končnih zaporedij.
 4. Spreminjanje heterocikličnih baz.
- Pri prokariontih je modifikacij tRNA manj.



Zorenje rRNA

- rRNA pri pro- in evkariontih zorijo z rezanjem prekursorja na ustrezno velikost in z metiliranjem baz.

