

Molekularne osnove ved o življenju

Izbrana poglavja

za 1. letnik študijskih programov Kemija in Kemijsko inženirstvo
Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani

doc. dr. Marko Dolinar

ver. 1.3, oktober 2011

Predgovor

Pred vami je prva verzija učnih gradiv, ki vam bodo pomagala razumeti tista poglavja pri predmetu Molekularne osnove ved o življenju, ki jih osnovni učbenik, Boyerjevi Temelji biokemije, ne vsebuje. Temelji biokemije so točno to, kar pove naslov: osnova, ki zagotavlja lažje spremljanje predavanj iz biokemije, biološke kemije, molekularne biologije, molekulskega kloniranja in podobnih predmetov, da pa bi razumeli različne vplive, ki jih imajo molekule na živi svet, okolje, človeka,... pa si je treba razjasniti še nekatere druge pojme, povezane z življenjem, na ravni molekul.

Gradiva obsegajo procese in sisteme, ki so zelo raznoliki: celice bakterij, rastlin in živali, komuniciranje med celicami in njihovo organizacijo v tkiva in organe. Živa bitja so se razvila v širok spekter organizmov v evoluciji, filogenija pa obravnava evolucijsko sorodnost med organizmi različnih vrst in populacij. Umestitev organizmov v okolje in interakcija z okoljem je za kemike prav tako pomembna kot za druge naravoslovce. Da bi razumeli odgovore, ki jih različne snovi sprožijo v organizmu in v celici, je treba razumeti tudi, kako poteka celični cikel, kaj je oksidativni stres in kaj povzroča bolezni, kakršne so različne oblike raka. Celice lahko izvajajo transport snovi, se premikajo in spreminjajo svojo obliko ob sodelovanju molekulskih motorjev. Protitelesa zagotavljajo zaščito pred telesu tujimi snovmi, hkrati pa so zelo pomembne molekule pri raziskavah proteinov in pri zdravljenju nekaterih hudih bolezni. Nenazadnje pa svet zaznavamo s čutili, ki večinoma na molekulski ravni zaznavajo točno določene snovi, s proteini pa, neposredno ali posredno, zaznavamo pa tudi valovanja različnih frekvenc.

Pri predstavljanju molekularnih osnov se bomo pogosto srečali z vprašanjem kompleksnosti sistemov, saj v živem svetu sodeluje v interakcijah veliko število različnih (makro)molekul, kar pomeni, da je razumevanje celotnih procesov na ravni atomov praktično nemogoče. Pri opisu mehanizmov se bomo omejili na najbolj nujne pojme in pojave, za natančnejše razumevanje pa boste morali poseči po drugih virih – učbenikih in znanstveni periodiki.

Osnovni viri pri pisanju vsebine so trije učbeniki, ki so citirani na koncu skript in v katerih lahko poiščete tudi več podatkov kot sem jih uspel navesti v teh gradivih. Gotovo pa boste našli precej informacij tudi v različnih virih na spletu. Nekatero navajam med besedilom, predvsem povezave na slike, ki naj bi vam natančneje predstavile obravnavano snov. Tu vam bodo v veliko pomoč tudi slikovna gradiva s predavanj, ki vam jih sproti posredujem.

Upam, da vam bo študij Molekularnih osnov ved o življenju v veselje.

KAZALO

1. Življenje in vede o življenju	7
2. Značilnosti celic	10
3. Fiziologija večceličarjev	15
4. Evolucija in filogenija	19
5. Celični cikel in celična smrt	22
6. Oksidativni stres	26
7. Rak	27
8. Protitelesa in imunski odgovor	29
9. Biokemija čutil	40

1. Življenje in vede o življenju

1.1. Osnovne značilnosti življenja

Zdi se nenavadno, toda enotne definicije življenja ni. Lahko bi rekli, da je življenje lastnost, ki vključuje pet nujnih sestavin: celično organizacijo, porabljanje energije in metabolizem, vzdrževanje konstantnega notranjega okolja, razmnoževanje, rast in razvoj, vzdražnost in odzivanje na okolje.

1.1.1. Pojem organizacije

Organizacija živih bitij temelji na pojmu celice, osnovne enote, ki omogoča opravljanje življenjskih funkcij. Pri enoceličnih organizmih ta celica vzdržuje vse funkcije sama, pri večceličnih pa je najpogostejša hierarhija organiziranosti celic v tkiva, teh v organe in organov v organske sisteme, ki predstavljajo organizem.

Enocelični organizmi so lahko preprosti, brez izrazitih subceličnih struktur (na primer bakterije), lahko pa vsebujejo vključke v obliki organelov, ki opravljajo specializirane funkcije znotraj posamezne celice.

Čeprav se zdi, da je posamezen organizem zaključena celota, pa v živem svetu prihaja do nadaljnega združevanja osebkov iste vrste in sodelovanja v populacijah, različni organizmi, ki hkrati zasedajo isto ozemlje, pa so skupnost. Če k temu dodamo še neživi svet na tem področju, govorimo o biotski sili in vsa živa bitja skupaj s prostorom, ki ga zasedajo, predstavlja biosfero.

Osnovni gradniki življenja so v resnici molekule, ki v kontroliranem okolju živih celic interagirajo na uravnavan način. Biološke molekule so tiste, ki jih najdemo samo v celičnem okolju, za katerega velja, da je pretežno vodno (brezvodno okolje predstavljajo le nekatere membrane, ki obdajajo celice ali organele, in nekateri redki primeri notranjosti makromolekul).

Organiziranost molekul v višje urejene strukture je tesno povezana z biološko vlogo, ki jo te strukture opravljajo za zagotavljanje življenjskih funkcij. Porušenje strukture bioloških makromolekul lahko pomeni prekinitev funkcije, pa tudi obratno – ko v celici ni potreb po neki funkciji, bo struktura verjetno postopno razpadla. Struktura in funkcija sta torej v živem svetu vedno tesno povezani.

Čeprav se zdi, da je mogoče življenje secirati do posameznih molekul, pa je življenje več kot samo seštevek molekul, organelov in celic. S sodelovanjem med njimi nastajajo lastnosti, ki jih posameznim sestavnim delom ne moremo pripisati, zato je ravno raziskovanje interakcij med deli bioloških sistemov (med molekulami znotraj celice, med površinami celic, med celičnimi izločki in oddaljenimi organi, med človekom in okoljem) eno najpomembnejših za razumevanje kompleksnosti življenja.

1.1.2. Pojem metabolizma

Celični sistemi so odvisni od energije za vzdrževanje življenjskih procesov. Metabolizem je seštevek kemijskih reakcij, ki to omogočajo. Nekateri reakcije so usmerjene v sintezo

novih kompleksnih molekul (anabolizem), druge pa v razgradnjo kompleksnih molekul v enostavnejše (katabolizem).

Vir energije za organizme je okolje, v katerem živijo. Nekateri organizmi (avtotrofi) energijo črpajo iz neživega sveta (svetlobna energija sonca ali kemična energija anorganskih spojin), heterotrofi pa so odvisni od energije, ki jo dobijo od avtotrofov. Potrebe po energiji organizme združujejo v prehranjevalne verige, ki se vedno začnejo z avtotrofi in nadaljujejo s heterotrofi, ki se hranijo z živimi ali odmrliimi drugimi organizmi, njihove produkte pa lahko avtotrofi ponovno uporabijo. Več o prehranjevalnih verigah bomo obdelali v poglavju o ekologiji.

1.1.3. Pojem homeostaze

Živi organizmi zagotavljajo notranje okolje, v katerem potekajo kemijske reakcije in ki je bistveno drugačno od okolja, v katerem organizem živi. Sposobnost ohranjanja konstantnih pogojev za potek reakcij imenujemo homeostaza. Osnova za njeno zagotavljanje je izoliranost od okolja (membrane, koža, oklepi,...), vnos in iznos reagentov, uravnavanje temperature, koncentracije soli, vsebnosti vode in podobno. Veliko energije, ki jo organizmi porabijo za svoje delovanje, gre prav za zagotavljanje konstantnega notranjega okolja.

1.1.4. Pojem reprodukcije

Populacije imajo sposobnost ohranjanja, ki populacijo vzdržuje kljub temu, da posamezni organizmi v njej odmirajo. Mehanizmi za razmnoževanje so zelo raznoliki, od celične delitve (nespolno razmnoževanje pri npr. bakterijah) do notranje oploditve, rasti zarodka in rojstva (pri sesalcih).

Pri večceličnih organizmih so potomci sprva preprosti; zarodek je najprej enoceličen, nato pa se celice delijo in pridobivajo specializirane funkcije. Govorimo o rasti in razvoju organizma, ki postopno pridobi spolno zrelost in je sposoben za razmnoževanje. Pri spolnem razmnoževanju pride do združitve dveh spolnih celic (gamet) v zigoto (ena celica, ki vsebuje DNA iz dveh organizmov), ta pa se deli in nastale celice se po mnogih delitvah oblikujejo v celice s točno določeno notranjo strukturo in funkcijo.

Nespolno razmnoževanje posredno pomeni, da imajo potomci povsem enake lastnosti kot celica, ki se je delila. Pri spolnem razmnoževanju pa nastanejo nove kombinacije genetskega materiala, ki pomenijo večjo raznolikost med potomci.

1.1.5. Pojem prilagodljivosti

Za žive organizme je značilno, da se odzivajo na spremembe v okolju na tak način, da se nanj prilagajajo. S tem se lahko izognejo pogojem, ki bi bili zanje škodljivi ali celo usodni. Na nekatere dražljaje je potreben hipen odgovor (npr. bližajoči požar), na druge pa je proces prilagajanja lahko počasen in postopen (dvig temperature okolja), saj traja lahko tudi več generacij. Ker so tisti posamezniki v populaciji, ki so se bolje prilagodili razmeram, bolj dolgoživi, imajo tudi več potomcev, neprilagojeni pa postopno izginejo iz populacije.

1.2. Vede o življenju

Tako kot je težko natančno definirati življenje, je tudi težko nedvoumno uvrstiti vede v posamezne skupine. Tiste vede, ki raziskujejo življenje, oblikujejo obsežno skupino, ki je osnovana na različnih vejah biologije, vendar vanjo lahko uvrstimo tudi različne veje kemije, fizike, tehnološke in inženirske panoge, ki se osredotočajo na raziskovanje značilnosti živih organizmov, pa tudi medicino. Nekateri avtorji vse te vede prištevajo širokemu področju biologije.

Vede o življenju prištevamo v skupino naravoslovnih ved, kamor sodijo tudi kemija, fizika, geologija in astronomija. Drugi ime za vede o življenju je 'bioznanosti'. Svet lahko raziskujemo z dveh izhodišč: integrativno ali redukcionistično, torej ali lastnosti sestavnih delov povežemo in sklepamo na lastnosti celote (npr. na osnovi lastnosti atomov sklepamo o lastnostih molekulskih kompleksov) ali pa na osnovi lastnosti celote sklepamo o sestavnih delih (npr. na osnovi tega, katere valovne dolžine zazna oko sklepamo na lastnosti receptorskih molekul). Vede o življenju pogosteje uporabljajo integrativni pristop in raziskujejo svet posameznih elementov živega, s spoznanji pa razlagajo delovanje celote.

Molekularne vede o življenju so tiste, ki na procese v organizmih gledajo na ravni interakcij med molekulami ali z metodami, ki uporabljajo molekularne pristope (npr. biomedicina), pa tudi tiste, ki razvijajo molekule, ki naj bi učinkovale v živih sistemih (npr. načrtovanje zdravil).

Za opazovanje živega sveta uporabljamo prosto oko, svetlobne (mikrometrski svet) in elektronske mikroskope (nano-mikrosvet). Opazovanje lastnosti pa je pogosto posredno, pri čemer uporabljamo različne analitske metode. Predvsem tiste v kemiji boste v nadaljevanju študija spoznali zelo natančno.

2. Značilnosti celic

Celice se med seboj zelo razlikujejo po obliki, velikosti [<http://learn.genetics.utah.edu/content/begin/cells/scale/>], notranji sestavi in funkciji, ki jo opravljajo. Pri enoceličarjih mora ena sama celica opravljati vse življenjske pomembne funkcije, a tudi tu so velike razlike v sestavi npr. bakterije in kvasovke. Med največje resnično enocelične organizme prištevamo amebe, ki imajo v premeru pol milimetra. Jajčne celice so največje človeške celice, saj imajo premer okrog 130 µm, rdeče krvničke (eritrociti) pa spadajo med majhne celice s premerom 8 µm. Osnovna razdelitev celic je na dva tipa, prokariontske in evkariontske celice. Prokarionti so enocelični organizmi, ki nimajo jedra in notranjih membranskih struktur. Prototip takih celic so bakterije. Evkarionti so eno- ali večcelični organizmi, katerih celice imajo jedra in znotrajcelične membranske strukture, pomembne za njihovo delovanje. Prav membrane, ki so večinoma sestavljene iz fosfolipidov, so tiste, ki omogočajo zapleteno notranjo sestavo celic ter ločevanje celičnih funkcij na posamezne organele. Razen tega so v membrane vsidrani proteini, ki opravljajo pomembne transportne naloge pri prenosu ionov, molekul in signalov skozi celične membrane [<http://learn.genetics.utah.edu/content/begin/cells/membranes/>].

2.1. Prokariontske celice

Najbolj tipični prokarionti so bakterije. Danes jih poznamo okrog 300.000 vrst, vendar jih je verjetno več milijonov. Med znanimi jih je samo okrog 170 takih, ki povzročajo bolezni pri sesalcih. Čeprav kot značilno bakterijo največkrat predstavljajo paličasto bakterijo (bacil) *Escherichia coli*, ki naseljuje črevesje tudi pri človeku, pa so bakterije lahko tudi zapognjene (vibriji; npr. povzročitelj kolere), kroglaste (npr. streptokoki) ali spiralne.

Za prokarionte je značilno, da nimajo jedra in z membranami obdanih celičnih razdelkov (organelov). S tem pa je povezanih tudi veliko razlik v biokemijskih procesih, od podvojevanja DNA (običajno imajo en sam kromosom krožne oblike) do sestave makromolekulskih kompleksov, ki so v veliki večini zgrajeni preprosteje kot pri evkariontih.

Pogosto viri navajajo, da so bakterije dolge nekaj mikrometrov, obstajajo tudi izrazito majhne (nekaj desetink µm) in izrazito velike (več kot desetinko mm). Vsekakor so v povprečju manjše od povprečne evkariontske celice. Posledica majhnih dimenzij je tudi visoko razmerje površina : volumen. To pomeni, da so potrebe po izmenjevanju snovi sorazmerno majhne in da je površina za izmenjavo snovi z okoljem relativno velika. Zato ne potrebujejo zmogljivih sistemov za vnos hranil in izločanje odpadnih snovi (čeprav nekateri transportni proteini v celičnih ovojnicah vseeno obstajajo).

Bakterije razdelimo na dve veliki skupini: na gramnegativne in grampozitivne. Osnova za razlikovanje je kemijska, saj je značilnost grampozitivnih, da se obarvajo v postopku barvanja po Gramu (nemškem raziskovalcu), gramnegativne pa ne. Razlika v barvanju je posledica različne sestave bakterijskih ovojnic. Pri gramnegativnih bakterijah je

ovojnica dvoplastna. Notranjo plast predstavlja lipidni dvosloj, ki je klasična biološka membrana, zunanjo plast pa modificirana membrana, ki ima v zunanjem sloju značilne molekule lipopolisaharidov (derivati sladkorjev, pripetih na maščobne molekule). Med obema slojema je periplazemski prostor, po sredini tega prostora pa poteka peptidoglikanska mreža (polisaharidi, prečno povezani s peptidi), ki je sorazmerno tanka. Grampozitivne bakterije imajo notranjo klasično lipidno membrano, ki jo na zunanji strani obdaja debela plast iz peptidoglikanov, ki jo zato lahko imenujemo kar 'stena'.

Bakterije se lahko premikajo z vrtenjem bičkov, ki so vpeti v notranjo membrano in povezani z molekulskim mehanizmom, ki to vrtenje omogoča. Površina bakterij je razen tega lahko pokrita z različnimi drugimi izrastki, na primer fimbrijami in pili, ki sodelujejo pri pritrjevanju bakterij na površine in na tarčne celice.

DNA je pri bakterijah včasih vidna pod mikroskopom kot posebno področje na celičnem preparatu, ki ga imenujejo nukleoid. Sicer pa v citoplazmi ne najdemo membranskih struktur, od kompleksnih struktur pa bi pod elektronskim mikroskopom videli ribosome. Bakterije imajo lahko razen lastnega kromosoma v citoplazmi še plazmide, to so manjše krožne molekule DNA, ki prenašajo odpornosti proti antibiotikom in se pod določenimi pogoji lahko tudi vgradijo v kromosom. Plazmidi so 100-1000x manjši od kromosoma, ob delitvi prehajajo v hčerinske celice, imajo pa tudi sposobnost prenosa v druge bakterijske celice. Zaradi svojih lastnosti uporabljamo plazmide kot vektorje v tehnologiji rekombinantne DNA (genskem inženirstvu).

2.2. Evkariontske celice

<http://learn.genetics.utah.edu/content/begin/cells/insideacell/>

Evkarionti imajo DNA v obliki kromosomov, ki jih je običajno več, so linearni in so shranjeni v **jedru**. To je obdano z jedrno membrano, s citoplazmo pa komunicira preko jedrnih por, ki so obdane s proteini in lahko uravnavajo uvoz in izvoz snovi v in iz jedra. Tisti del jedra, kjer so zbrane regije kromosomov, ki zapisujejo za ribosomsko RNA, ima nekoliko drugačno gostoto in je zato na celičnih preparatih videti kot ločen del znotraj jedra (in torej ni obdan z membrano). Imenuje se **jedrce**.

Kromosomov v jedru je pri človeku 23 parov (pri spolnih celicah je nabor kromosomov enojen, torej 23 različnih). Od teh je 22 parov avtosomov, en par pa predstavljata spolna kromosoma. V resnici pri moških ne moremo govoriti o paru, saj je en kromosom X, en pa Y, medtem ko imajo ženske dva kromosoma X. Parni kromosomi so sestavljeni iz dveh kromatid. Konci kromatid se imenujejo telomeri, mesto, kjer se kromatidi stikata, pa je centromer. Značilno za evkariontske kromosome je, da je DNA v njih tesno ovita okrog proteinskih molekul (histonov), pri prokariontih pa je DNA prosta.

Druga pomembna razlika v primerjavi s prokarionti je prisotnost še drugih celičnih organelov (razen jedra), ki so obdani z lipidnim dvoslojem. Površina membran znotraj celice je pri večini celic večja kot je površina celične membrane.

Organeli, ki zagotavljajo energijo, so **mitohondriji**. V evoluciji so se najverjetneje razvili tako, da je neka prostoživeča bakterija vstopila kot simbiot v drugo celico – o tem govori endosimbiontska teorija [<http://learn.genetics.utah.edu/content/begin/cells/organelles/>]. Na podoben način so v predhodnice rastlinskih celic vstopile fotosintetizirajoče bakterije in se postopno razvile v kloroplaste, v katerih poteka proces fotosinteze. Kloroplasti (ki jih najdemo samo pri zelenih algah in višjih rastlinah) in mitohondriji (ki so značilni za vse evkarionte, tudi za enocelične) imajo lastno DNA in lastne ribosome, vendar njihova DNA ne zadošča za vse tiste proteine, ki so potrebni za sestavljanje teh organelov in za njihovo normalno delovanje. Veliko sestavin se je v evoluciji z organelne DNA preneslo na jedrno DNA.

Mitohondriji imajo dvojno membrano. Zunanja je sorazmerno preprosta in gladka, notranja pa je močno uvihana. V tej membrani so umeščeni proteini, ki so pomembni za celično dihanje oziroma za sintezo energetsko bogatih spojin, kakršen je ATP (adenozintrifosfat).

Tudi **kloroplasti** imajo enostavno zunanjo membrano, v notranjosti pa so stolpičasto naložene membranske strukture, tilakoide. V tilakoidne membrane so vgrajeni proteini, ki omogočajo izvajanje fotosinteze, za kloroplaste pa je značilno zeleno barvilo klorofil, ki omogoča učinkovit zajem fotonov, torej svetlobne energije za reakcije, ki v tem organelu potekajo.

Na jedrno membrano se navezuje **endoplazemski retikulum** (ER). Gre za skupino delno med seboj povezanih sploščenih veziklov, ko so pod mikroskopom videti gladki ali pa zrnati. Zrnatosti je posledica na površino pripetih ribosomov. Ti sintetizirajo proteine in jih usmerjajo v notranjost ER, kjer se postopno zvijejo in kjer se začne njihovo zorenje, npr. s pripenjanjem sladkornih verig. V gladkem ER prav tako najdemo proteine, le da so ti vanje vstopili posredno, ne preko sinteze na površini.

Bolj proti robu celice običajno najdemo drugo vezikularno strukturo, podobno ER. Imenuje se **Golgijev aparat** (GA) in je prav tako sestavljen iz sploščenih mehurčkov, ki jim rečemo cisterne. Tiste dele GA, ki so obrnjeni proti jedru, imejemo cis-Golgi, tiste, ki so usmerjeni proti celični površini, pa trans-Golgi. Snovi potujejo v smeri od ER proti GA (preko mehurčkov, ki brstijo z ER) in od tam, prav tako z vezikli, proti celični površini – ta proces imenujemo sekrecija. Proteini, ki jih celice izločajo ali vgradijo v celično membrano, večinoma potujejo prav po tej poti. V GA potekajo zaključne stopnje zorenja proteinov, v njih pa se sintetizirajo tudi nekateri polisaharidi. V celicah, ki intenzivno izločajo snovi (kot so razne žlezne celice), je lahko tudi več deset GA.

Lizosomi so precej manjši organeli, ki vsebujejo encime za razgradnjo makromolekul, ki so z uvihanjem plazmaleme (celične membrane) vstopili v celico ali pa so v celici namenjeni za recikliranje. Hranila, ki vstopijo v celico, so obdana z membrano (prebavna vakuola), po zlitju lizosomske membrane z membrano vakuole pa se proces

razgradnje tudi v resnici lahko začne. V notranjosti je okolje sorazmerno kislo, to pa so razmere, v katerih so lizosomski encimi najbolj aktivni.

Peroksisom je majhen organel, pomemben za razgradnjo vodikovega peroksida, ki nastaja pri nekaterih reakcijah v celici, je pa zanjo lahko zelo škodljiv, zato ga morajo encimi razgraditi. Hkrati v peroksisomih potekajo nekatere stopnje presnove maščobnih kislin.

Ribosomov ne prištevamo k organelom, ker nimajo lipidne ovojnice, so pa zelo značilna sestavina citoplazme (pa tudi površine zrnatega ER). Na ribosomih poteka sinteza proteinov. Evkariontski **ribosomi** so nekoliko večji in sestavljeni iz več verig RNA in proteinov kot prokariontski, njihova funkcija pa je enaka in proces biosinteze proteinov poteka na zelo podoben način.

Ob ustreznem barvanju celičnih preparatov lahko v notranjosti celic razločimo številne nitaste strukture, ki predstavljajo **цитоскелет**. Ta vlakna so treh tipov: mikrotubuli, intermediarni filamenti in mikrofilamenti. Vsi so sestavljeni iz proteinov, razlikujejo pa se po dolžini, premeru in proteinski sestavi. Mikrofilamenti so iz aktinskih podenot, mikrotubuli iz tubulina, intermediarni filamenti pa predvsem iz keratinov.

Na celični površini lahko najdemo migetalke in bičke, ki so nitaste proteinske strukture, nekatere celice pa imajo povečano površino s tem, da običajno samo eno stran celice izvlečejo v mikrovile (mikroresice) – take so na primer celice stene tankega črevesa.

2.3. Razlike med rastlinskimi in živalskimi celicami

Čeprav rastline tako kot živali prištevamo med evkarionte, je v zgradbi enih in drugih vendarle nekaj pomembnih razlik. Ena med njimi je, da ima značilna rastlinska celica steno, sestavljeno pretežno iz celuloznih vlaken, medtem ko živalske celice česa podobnega nimajo.

Druga pomembna razlike je seveda prisotnost kloroplastov v tistih rastlinskih celicah, ki so sposobne izvajati fotosintezo. Lizosomi pa so po drugi strani značilnost živalski celic.

Rastline imajo pogosto v citoplazmi eno veliko ali več manjših vakuol, v katerih shranjujejo zalogo hrane in/ali vode. Taki vakuoli včasih rečemo centralna vakuola, kjer je nameščena v sredini celice.

2.4. Virusi

Virusov v resnici ne prištevamo med celice, saj nimajo vseh lastnosti živih organizmov. Njihovi geni ne zagotavljajo samostojnega preživetja, zato za svoje razmnoževanje

nujno potrebujejo sestavine celic, ki jih napadejo. (Čeprav bi delno lahko to trdili tudi za nekatere parazitske organizme, pa glede slednjih dvomov ni.)

Značilno za viruse je, da imajo ovojnico, v njej pa eno ali več kopij nukleinskih kislin, ki zapisujejo za tiste proteine, ki jim omogočajo okužbo gostiteljskih celic in tiste procese v njihovem življenjskem ciklusu, ki jih s pomočjo gostiteljskih proteinov ne more izvesti. Virusi so veliki od nekaj deset do nekaj sto nanometrov in so različnih oblik [http://academic.pgcc.edu/~kroberts/Lecture/Chapter%2013/13-04_SizesOfViruses_o_L.jpg].

Čeprav so najbolj znani virusi, s katerimi se okužijo človek in živali (gripa, herpes, steklina), pa virusi lahko okužijo tudi rastline in bakterije. Bakterijske viruse imenujemo bakteriofagi. Posamezni tipi virusov lahko okužijo le točno določene vrste celic. Za pritrnitev in okužbo je potrebna interakcija med celično površino in površino virusa, ki običajno poteka preko celičnih receptorskih proteinov, lahko pa tudi preko drugih sestavin membrane (npr. sialne kisline v primeru influence A).

Nekateri virusi imajo kot nukleinsko kislino RNA in so njihovi geni zapisani na tej ravni. Skupina RNA-virusov, ki v svojem življenjskem ciklusu RNA najprej prepíše v DNA, ta pa se vključi v kromosome gostiteljske celice, imenujemo retrovirusi. Med te sodi npr. virus HIV. Niso pa vsi RNA-virusi retrovirusi. Virus influence ima kar 8 kratkih kosov RNA (skupaj zapisujejo 11 proteinov), ki pa se po okužbi v gostiteljski celici ne vključijo v kromosome, pač pa se samostojno podvojujejo in hkrati služijo kot matrica za sintezo virusnih proteinov.

3. Fiziologija večceličarjev

3.1. Tkiva in organi

Prokarioti se le izjemoma povezujejo v večcelične strukture, pa tudi če se, vsaka celica deluje neodvisno in ima povsem enake lastnosti kot vse ostale v skupini. Pri evkariontih pa se je v evoluciji pojavila večceličnost in kasneje specializacija celic. Skupino bližnjih celic z enako funkcijo imenujemo tkivo, organ pa je del organizma, ki opravlja neko sorazmerno zapleteno funkcijo in je običajno sestavljen iz različnih tkiv. Osnova za oblikovanje tkiv in organov je povezovanje med celicami, ki je zelo raznoliko organizirano. Po drugi strani pa celice niso umeščene v inerten prostor, temveč izločajo elemente medceličnine, ki predstavlja sredstvo za sporazumevanje med celicami, transportno pot in – ob razpredenih nitastih strukturah v medceličnini – tudi osnovo za pritrjevanje celic.

3.1.1. Komuniciranje med celicami

Celice komunicirajo med seboj na več načinov. Na daljavo poteka sporazumevanje preko snovi, ki jih ene celice izločajo, druge pa sprejemajo. Celice, ki sproščajo signalne snovi, lahko v grobem imenujemo žlezne celice, celice, ki sprejemajo signale, pa morajo imeti ustrezne receptorske molekule, na katere se signali vežejo. Vezavi signalnih molekul sledi sprožitev biokemijskih reakcij, ki povzročijo odziv celice na nove razmere. Signalne molekule po telesu potujejo najpogosteje s krvjo, pri čemer so lahko vezane na transportne proteine. Na kratke razdalje lahko signalne molekule potujejo tudi po medceličnini.

Signaliziranje je lahko endokrino (hormon, ki potuje po krvi), parakrino (lokalni mediatorji, ki delujejo na bližnje celice), posredovano z živčnim prenašalcem (velja samo za stike med živčnimi celicami ali med živcem in mišico) ali s kontaktom med v membrano zasidranimi molekulami. Po sprejemu signala se v tarčni celici sproži biokemijska kaskada, v kateri se signal ojača, v tej kaskadi pa pogosto sodelujejo fosforilirani proteini. Fosforilacijo katalizirajo encimi kinaze, odstranjevanje fosfatov pa fosfataze.

Hormoni so kemijsko gledano štirih tipov: derivati aminokislin (npr. epinefrin, ki se sintetizira iz aminokislinske tirozina), peptidi (npr. tisti, ki uravnavajo krvni tlak), proteini (npr. inzulin, ki ga izloča trebušna slinavka in uravnava koncentracijo glukoze v krvi) in derivati lipidov (npr. steroidni hormoni, med katere prištevamo spolne hormone testosteron, androsteron, estrogen ipd.). Hormoni lahko delujejo na dva načina: spremenijo celično presnovo ali pa vplivajo na sintezo novih proteinov. Nekateri se vežejo na receptorske proteine v celični membrani, drugi pa na citoplazemske receptorje, ki lahko prehajajo v jedro in tam vplivajo na gene.

Mehansko povezovanje poteka med (sosednjimi) celicami, celice pa se lahko pripenjajo tudi na sestavine medceličnine. Medcelični stiki so štirih tipov: tesni stiki, aderenčni stiki, dezmosomi in presledkovni stiki. Pri rastlinah so poseben tip povezav med celicami plazmodezme, ki predirajo celične stene.

Pri tesnih stikih se membrani sosednjih celic približata, membranski proteini klavdini z obeh celic pa se pri tem stikajo. Adherenčni stiki nastanejo ob običajnem razmiku med sosednjima celicama, pri povezovanju pa sodelujejo membranski proteini kadherini z izrazitimi zunajceličnimi domenami. Na znotrajcelični strani se kadherini povezujejo z adapterskimi proteini, ti pa se vežejo na sestavine celičnega skeleta, ki jih predstavljajo aktinski filamenti. Dezmosomi so podobno povezani s celičnim skeletom, ki ga predstavljajo keratinska vlakna intermediarnih filamentov. V medceličnem prostoru so proteini iz skupine kadherinov (dezmostolein in dezmostokolin), ki se na notranji strani vežejo v proteinsko ploščico (iz plakoglobina in dezmostoplakina).

Presledkovni stiki predstavljajo fizično povezavo med citoplazmama sosednjih celic. V vsaki od sosednjih membran se zberejo proteini koneksini, ki oblikujejo kanalček, imenovan konekson. Ko se stakneta kanalčka sosednjih celic, oblikujeta povezavo s hidrofiličnimi lastnostmi in premerom 3 nm, kar omogoča prehod ionov in malih molekul, ne pa tudi proteinov.

3.1.2. Medceličnina

Medceličnina je bogata s polisaharidi in proteini, pri čemer so polisaharidi lahko vezani na proteine (proteoglikani) ali pa so na proteine vezane krajše verige sladkorjev (glikoproteini), nekateri proteini pa so značilno nitasti (na primer kolagenska vlakna). Medtem ko kolagen v medceličnini zagotavlja čvrstost, molekule proteina elastina omogočajo fleksibilnost.

Bazalna lamina je sloj, ki ga sestavljajo predvsem proteinske molekule, kakršne so kolagen IV, laminin in perlekan. Ustvarjajo mrežasto strukturo, na katero se vežejo sloji celic, ki jim predstavljajo podlago.

Pri rastlinah medceličnino predstavlja preplet polisaharidnih vlaken, med katerimi prevladujejo celuloza, hemiceluloza in pektin, ki skupaj prekrivajo celično membrano in oblikujejo celično steno.

3.1.3. Tkiva pri človeku

Tkiva so skupine celic, ki opravljajo enako funkcijo v organizmu. V osnovi razlikujemo le štiri tipe tkiv: krovna (epiteli), vezivna, mišična in živčna.

Krovna tkiva imajo vlogo zaščite organizma in prekrivajo vse njegove površine, tudi notranje, kot so pri človeku trebušna votlina, žile in posamezni organi (npr. pljuča, želodec).

Vezivna tkiva so najbolj raznolika skupina tkiv, saj vanjo prištevamo tudi kosti, hrustanec, maščobno tkivo, fibrozno tkivo, mehka veziva in kri.

Kri je v resnici tekoča medceličnina (plazma), v kateri so krvne celice: eritrociti (rdeče krvničke), levkociti (bele krvničke) in trombociti (krvne ploščice), ki sodelujejo pri prenosu kisika, obrambi pred tujki in strjevanju krvi. Kri torej sestavljajo plazma (sestavljena iz vode, soli in raztopljenih proteinov), ki je rumenkaste barve, in krvne celice. Funkcija plazme je, da po žilah prenaša krvne celice, pa tudi glukozo, hormone, vitamine in na proteine vezane lipide. Serum je ime za plazmo, iz katere so odstranili proteine, ki sodelujejo pri strjevanju krvi. Če krvi ne obdelamo z antikoagulantmi, se strdi (pojav imenujemo koagulacija), kar pomeni, da nastane preplet proteinov (polimerov

fibrina), v katerega se ujamejo krvne celice, vse to pa lahko s centrifugiranjem ločimo od topnega dela krvi, seruma. Edino, če krvi takoj po odvzemu dodamo antikoagulate (citrati, heparin ali EDTA), se kri ne strdi in odcentrifugiramo samo celice, nad njimi pa ostane plazma.

Pri transfuziji krvi je potrebno upoštevati krvne skupine, saj smemo prejeti samo kri dajalca, ki ima enako krvno skupino kot mi. Osnova za razlikovanje med skupinami, je različna sestava ogljikovih hidratov na površini nekaterih proteinov, vezanih v membrano eritrocitov.

Mišično tkivo sestavlja tri tipe mišic: gladke, skeletne (progaste) in srčno mišico, razlike med njimi pa so v mikroskopski zgradbi in uravnavanju krčenja. Vse tipe sestavljajo mišične celice, ki so pri skeletnih in srčni mišici povezane v vlakna, pri gladkih pa so celice vretenaste oblike. Različne tipe oživčujejo različne skupine živcev. Skeletne mišice so s kitami pritrjene na kosti, gladke pa predvsem obkrožajo arterije in notranje organe in se za razliko od skeletnih krčijo avtonomno. Srčna mišica je po zgradbi podobna skeletnim mišicam, a se tako kot gladke krči nezavedno.

Živčno tkivo je omejeno na možgane, hrbtenjačo in živce, sestavljajo pa ga specializirane celice z izrastki. Med seboj se celice stikajo s sinapsami, ki so na koncu izrastkov. Akson, daljši izmed izrastkov, se na mestu sinapse razširi in v tem delu so v celici membranske strukture, ki vsebujejo živčni prenašalec. Ko se živčna celica vzdraži, se prenašalec sprostí iz celice v sinaptično režo, ki ločuje sosednji celici, in posreduje pri prenosu signala na naslednjo živčno celico. Podoben stik je med živčno in mišično celico (tega imenujemo motorična ploščica). Krajši in bolj številčni izrastki živčnih celic (nevronov) se imenujejo dendriti. V možganih so živčne celice med seboj povezane v omrežje, tako da se ena celica dotika velikega števila drugih celic.

3.1.4. Tkiva pri višjih rastlinah

Višje rastline imajo tkiva treh tipov: osnovna, krovna (zaščitna) in prevodna, nekateri pa k tem štejejo kot četrti tip še zarodna tkiva. Osnovna tkiva so parenhim, kolenhim in sklerenhim, prevodna pa floem in ksilem. V prerezu listov vidimo predvsem parenhimske celice, spodnja in zgornja plast pa je sestavljena iz krovnega tkiva, ki izloča tudi zaščitno prevleko (kutikulo), vsebuje pa listne reže. Za preskrbo lista in za odvažanje organskih snovi, ki se v njih sintetizirajo, služijo listne žile z dvema tipoma tkiv.

3.1.5. Tkivne kulture

Izraza tkivna in celična kultura včasih uporabljajo kot sinonima, vendar za celično kulturo velja, da so v njej celice istega tipa, ki rastejo neodvisno ena od druge, medtem ko tkivna kultura predstavlja celice istega tipa, ki so med seboj povezane (kot na primer kožno tkivo za celjenje opeklin). Pri rastlinah je tkivna kultura način razmnoževanja rastlin, ki se regenerirajo iz koščkov rastlinskega tkiva.

3.1.6. Organi in organski sistemi

Organi so skupine tkiv, ki skupaj opravljajo neko telesno funkcijo. Pogosto lahko rečemo, da je neko tkivo osnovno, torej tisto, ki opravlja za organ specifične naloge, ter pomožna tkiva, ki na primer zagotavljajo preskrbo organa ali njegovo zaščito. Organski sistem sestavlja več organov z usklajenim delovanjem in sorodno funkcijo. V

telesu vladajo konstantne fizikalno-kemijske razmere; nihanja sicer obstajajo, a so zelo majhna, za kar skrbijo različni organi.

Pri rastlinah razlikujemo vegetativne (korenine, steblo/deblo, listi) in reproduktivne organe (cvetovi, plodovi, semena).

Človek ima 10 organskih sistemov: dihala, krvožilje, izločala, živčevje, prebavila, sistem žlez z notranjim izločanjem (endokrini), kožni, limfni, skeletno-mišični in reproduktivni sistem. Tudi ti sistemi delujejo soodvisno. Tako na primer krvožilje sodeluje z dihali, ki zagotavljajo izmenjavo plinov (preko proteina hemoglobina). Tudi prebavila so pri delovanju povezana s krvožiljem, saj snovi, zaužite s hrano po osnovni razgradnji v črevesnem lumnu in celicah tankega črevesa, prehajajo v kapilare črevesnih resic, od tam pa po jetrnem krvnem obtoku pridejo v jetra, kjer poteka razgradnja telesu škodljivih snovi.

Nekatere žleze imajo dvojno funkcijo – izločajo hormone, pa tudi na primer encime. Trebušna slinavka izloča v kri hormon inzulin, ki uravnava koncentracijo glukoze v krvi, hkrati pa druge celice izločajo prebavne encime za razgradnjo zaužitih makromolekul. Tanko črevo je razdeljeno na več predelov z ločenimi nalogami: v zgornjem delu (dvanajstnik) poteka predvsem encimska razgradnja, v spodnjem pa se resorbirajo hranila in voda.

Skeletno-mišični sistem je povezava dveh tipov organov: kosti pri tem delujejo kot oprijemališče za mišice, ki so vedno razmeščene tako, da je med enim in drugim koncem nek sklep, ki se premika.

3.2. Fiziologija

Fiziologija je veda, ki preučuje delovanje organizmov in njihovih sestavnih delov. Primeri fizioloških procesov so uravnavanje krvnega tlaka, ki poteka po več različnih mehanizmih, zagotavljanje viskoznosti krvi, ohranjanje ionskega ravnovesja in telesne temperature. Vsakič gre za kompleksne načine regulacije, ki temeljijo na biokemijskih mehanizmih, pa tudi fizikalnih zakonitostih.

Fiziologija rastlin obravnava faze v razvoju rastlin, na primer cvetenje, sožitje med rastlinami in glivami, kalitev semen in podobno.

3.3. Modelni organizmi

Številni osnovni biokemijski mehanizmi potekajo na podoben način v preprostih enoceličarjih (na primer bakterijah in kvasovkah) in višjih organizmih. Zato lahko take funkcije preučujemo na v kulturi gojenih bakterijah *Escherichia coli* ali kvasovki *Saccharomyces cerevisiae*. Mehanizme, ki so značilni za višje organizme, lahko raziskujemo na miših ali podganah. Med rastlinami ima status modelnega organizma navadni repnjakovec (*Arabidopsis thaliana*), veliko raziskav pa opravijo tudi na tobaku.

4. Evolucija in filogenija

Evolucija je nauk o razvoju vrst, ki pravi, da so se (nove) vrste razvile kot posledica postopnega nabiranja mutacij, pri čemer poteka naravni izbor tistih lastnosti (in posledično tistih posameznikov), ki v določenem okolju predstavljajo konkurenčno prednost. Utemeljitelj evolucijskega nauka je bil Charles Darwin (1809-1882). Izhodišča evolucijskega nauka so, da so imajo vse vrste skupen izvor, da se nove lastnosti dedujejo, da poteka selekcija, ki omogoča uveljavljanje lastnosti, ki zagotavljajo prednost v danem okolju, in da se nove vrste razvijejo zaradi ločevanja populacij.

Kreacionisti menijo, da se življenje na zemlji ni razvilo postopno, pač pa je nastalo s posredovanjem nadnaravnih bitij. Za to stališče ni resnih znanstvenih dokazov.

Filogenija je veda, ki preučuje evolucijske odnose med vrstami – katera skupina organizmov se je kdaj razvila iz katerih drugih organizmov, pri čemer je 'skupina organizmov' lahko vrsta, družina,... ali pa posamezna populacija.

Taksonomija je sistematika) uvrščanja organizmov v skupine glede na njihovo sorodnost in evolucijski razvoj – ker je evolucija potekala postopno, so si razvojno bližnji organizmi tudi sorodni.

4.1. Nastanek življenja na Zemlji

Zemlja kot planet je nastala pred približno 4,6 milijardami let. Žareča gmota se je postopno ohlajala, na njeni površini pa so potekale kemijske reakcije. Nekatere so bile sorazmerno kompleksne, saj so nastale prve organske molekule, nekatere pa so se kasneje polimerizirale v nukleinske kisline in peptide. Začetke organiziranja kompleksnih sistemov imenujemo 'kemijska evolucija'. Vir energije sta bila toplota in sevanja, v tej stopnji pa so se najprej razvile reducirane ogljikove spojine, nato pa molekule z vezmi C-C. Najstarejši ostanki bioloških molekul so stari 3,8 milijarde let, bakterije pa so verjetno živele že pred 3,7 milijardami let.

O tem, kako se je razvilo življenje, obstaja več teorij. Znan je Millerjev eksperiment, v katerem so poskusili ponazoriti razmere na Zemlji v njeni zgodni zgodovini. Iz metana, amonijaka, vodnih hlapov in vodika so ob razelektritvah dobili mešanico organskih snovi, med katerimi so bile številne aminokisline. Vseeno pa današnje gledanje na razvoj organskih molekul ni tako preprosto in obstajajo različne teorije glede nastanka prvih bioorganskih molekul: da so prišle iz vesolja, da so se sintetizirale v podvodnih vročih vrelcih ali pa na kopnem.

Prve stopnje kemijske evolucije imenujemo tudi prebiontski kemizem, z nastankom prvih polimerov pa so vlogo katalizatorjev prevzele molekule RNA. Šele kasneje so se uveljavile molekule DNA kot nosilke dednih informacij, vlogo biokatalizatorjev pa so prevzele proteinske molekule. S stabilizacijo lipidnih ovojnic, ki so obdale polimerne molekule, je nastala praelcelica, ovojnica pa je omogočala izolacijo od okolja in razvoj metaboličnih poti.

Metabolične poti so dveh tipov: anabolične in katabolične. Pri anabolizmu prihaja po sinteze kompleksnih spojin, pri čemer je kemijsko najpogostejša kondenzacija z odcepom vode, pri katabolizmu pa se kompleksne molekule razcepijo, kar v živem svetu najpogosteje poteka v prisotnosti vode, zato govorimo o hidrolizi.

Organizme na splošno delimo na avtotrofe in heterotrofe. Avtotrofni organizmi so sposobni sami na osnovi CO₂ sintetizirati kompleksne organske molekule. To je možno v procesu fotosinteze ali s kemotrofijo. Heterotrofi pa so vsi ostali organizmi – ti dobijo energijo z razgradnjo tistih snovi, ki jih zaužijejo in ki v osnovi izhajajo iz avtotrofov. Avtotrofi so rastline, alge in mnoge bakterije, heterotrofi pa so vse živali in glive, pa tudi številne bakterije.

4.2. Pojem vrste

Definicija vrste se je v zgodovini spreminjala, danes pa velja kot splošno sprejeta tista, ki jo je postavil Ernst Mayer pred približno 70 leti. Pravi, da je vrsta populacija (ali skupina populacij), katerih člani se med seboj lahko križajo in imajo plodne potomce. Ta definicija predstavlja bistveno nadgradnjo tiste, ki je veljala še od časa Carla Linneja (1707-1778), namreč da vrsto predstavljajo bitja, ki so si med seboj po telesni zgradbi enaka.

4.3. Filogenetski odnosi med vrstami in sistematika

Živi svet sestavljajo tri domene: prokarionti, arheje in evkarionti. O pro- in evkariontih smo govorili že v uvodu, arheje pa predstavljajo posebno skupino organizmov, ki poseljujejo nekatera najbolj eksterna okolja, kakršni so vroči vrelci, raztopine visoko koncentriranih soli in niše brez dostopnega kisika. Kar se tiče organizacije celic so marsičem podobni prokariontom, imajo pa drugačno sestavo membranskih lipidov, niso sposobni fotosinteze, zmorejo pa sintetizirati metan, so neobčutljivi za nekatere antibiotike in ne zmorejo fiksirati dušika.

Več sorodnih vrst predstavlja rod. Latinsko ime vrste je sestavljeno iz imena rodu in imena vrste. Posamezno vrsto pa lahko sestavlja več podvrst, ki se med seboj razlikujejo po nekaterih lastnostih, še vedno pa se predstavniki različnih podvrst lahko pariyo in imajo plodne potomce.

Taksonomsko višje kategorije od rodu so družina, red, razred, deblo in kraljestvo. Danes velja mnenje, da živa bitja lahko razvrstimo v šest kraljestev: arheje, bakterije, protiste (večinoma enocelične evkarionte), rastline, glive in živali.

4.4. Molekularne metode za določanje filogenetskih odnosov

Sprva so vrste razvrščali v skupine na osnovi vidnih lastnosti organizmov (**fenotipa**). Na fenotip vpliva genetska zasnova (**genotip**), pa tudi okolje. Za izumrle vrste so primerjali fosilne najdbe, za še živeče pa so imeli na voljo več podatkov – od morfoloških do molekularnih. Danes so molekularne analize zelo pomembne, saj so natančne in

sorazmerno hitre. Primerjamo lahko aminokislinska zaporedja proteinov ali nukleotidna zaporedja genov. S poravnavo zaporedij več organizmov, za katere predvidevamo, da so si sorodni, lahko ugotavljamo, kako podobna so si zaporedja in kako so se v evoluciji kopičile mutacije. Genotip predstavlja genetske lastnosti nekega organizma in sodobne metode omogočajo določanje zaporedja nukleotidov ne le v posameznih genih, pač pa celotnega genoma, torej prav vseh nukleotidov, tako kot so razporejeni na kromosomih. Nekateri geni se spreminjajo zelo počasi, na primer manj kot 1 % nukleotidov v desetih milijonih let, drugi pa precej hitreje. Za počasi spreminjajoče se molekule menimo, da opravljajo neko osnovno funkcijo v celici ali organizmu. Take molekule so primerne, če poskušamo določiti filogenetska razmerja med oddaljenimi vrstami. Za razločevanje znotraj ožje sistematske skupine pa so primerne tiste molekule, ki se spreminjajo hitreje, na primer 1 % v 100.000 letih. Poravnavo zaporedij [http://evolution-textbook.org/content/free/figures/05_EVOW_Art/16_EVOW_CH05.jpg] in filogenetsko drevo [<http://www.ultimateungulate.com/Images/Phylogenies/AntilopinaePhylogeny.gif>], ki izhaja iz tovrstne analize si lahko ogledate na slikah.

5. Celični ciklus in celična smrt

(v študijskem letu 2011/12 to ni več izpitna snov za študente Kemijskega inženirstva)

V življenju evkariontske celice se izmenjujeta dve fazi: interfaza (rast celic, podvojitev DNA in kopičenje snovi za celično delitev) in mitoza (delitev). Interfaza je bistveno daljša in jo razdelimo na več podfaz. Označene so z G₁, S in G₂. Mirujoče celice so v (pod)fazi G₀, ki je ne pripisujemo celičnemu ciklusu, saj se te celice niso sposobne deliti, vse dokler ne preidejo v interfazo. Faza G₀ (faza mirovanja) je izhod iz faze G₁. Mirovanje se nanaša samo na procese, povezane z delitvijo, sicer pa take celice opravljajo vse običajne naloge, ki jih določen tip celic ima.

5.1. Življenjski cikel evkariontov

Za fazo G₁ je značilno, da v njej potekajo metabolične spremembe, ki vodijo v celično delitev, hkrati pa poteka sinteza proteinov, lipidov in ogljikovih hidratov. V fazi S se genomski DNA podvoji, tako da ima vsak kromosom dve kromatidi. Faza G₂ predstavlja tisti del ciklusa, v katerem poteka sinteza citoskeletnih proteinov in sestavin bioloških membran, ki se lahko nabirajo v praznih veziklih tik pod celično membrano. Začne se tudi kondenzacija kromosomov v jedru, kar pomeni vstopno točko v fazo mitoze.

Med mitozo potekata dva procesa. Najprej se razdeli genetski material (kromosomi), nato pa se razdelita še celici (citokineza). Celice kvasovk, ki se hitro delijo, mitozo opravijo v eni uri, človeške pa običajno v 8 – 10 h. Večina somatskih celic večceličnih evkariontov se obnavlja prav z mitozo, ki je pomembna tudi v procesih kot so celjenje ran in rast tumorjev. Pri enoceličnih organizmih je mitoza način nespolnega razmnoževanja. Pri spolnem razmnoževanju pa je mitoza značilna za zgodnji zarodek po tistem, ko se spolni celici (gameti) združita v zigoto. Gameti sta haploidni (imata samo po eno kopijo vsakega kromosoma), zato je po njuni združitvi zigota diploidna (to označimo z 2n). Da lahko nastanejo haploidne celice, se mora zgoditi drugačna celična delitev, imenovana mejoza (http://kvhs.nbed.nb.ca/gallant/biology/mitosis_meiosis.html).

Mitoza (http://royaleb.files.wordpress.com/2009/04/mitosis_phases1.jpg) ima več stopenj, v vsaki pa potekajo značilni procesi. Med profazo, ki pri kvasovkah traja okrog pol ure, se razgradi jedrna membrana, jedrce izgine, kromosomi pa se dokončno kondenzirajo. Vsak ima dve identični kromatidi. Dva centrosoma potujeta vsak na eno stran celice in nase pripneta mikrotubule delitvenega vretena. V prometafazi kromosomi potujejo na ekvatorialno ravnino in se pripnejo na niti delitvenega vretena. Med metafazo se kromosomi dokončno razporedijo v sredini celice. Anafaza je najkrajši del mitoze. Zanj je značilno, da se kromatidi ločita, delitveno vreteno pa kromatidi potegne vsako na svojo polovico celice. Na koncu mitoze, med telofazo, ponovno nastane jedrna ovojnica, ki obda kromosome; ti se razpustijo, delitveno vreteno pa izgine. Citokineza je končna stopnja celične delitve, med katero pride do ločevanja citoplazme in organelov. Pri rastlinah na mestu

(nekdanje) ekvatorialne ravnine nastane celična plošča, pri živalih pa pride do uvihavanja membrane. Celica preide v interfazo.

Celični cikel ima več kontrolnih točk, najpomembnejši pa sta dve v interfazi in ena v mitozu [<http://www.bio.miami.edu/~cmallery/150/mitosis/c12x13checkpoints.jpg>]. Zagotavljajo, da so vsi dotedanji procesi potekli pravilno, če je treba, pa sprožijo popravilne mehanizme.

Uravnavanje celičnega cikla poteka preko interakcije med proteini, imenovanimi ciklini in encimi s kratico CDK (od ciklinov odvisne kinaze) [<http://www.bio.miami.edu/~cmallery/150/mitosis/sf8x15b.jpg>]. Razen tega na rast in delitev celic vplivajo tudi številni drugi dejavniki, kot so hormoni in rastni faktorji, ki se sintetizirajo v drugih celicah. Znotraj celic pa se sintetizirajo različni ciklini in različne z njimi povezane kinaze. Te posredno povzročijo aktivacijo tistih genov, ki so pomembni za izvedbo celične delitve.

Koncentracija ciklinov v celici se med celičnim ciklom spreminja, medtem ko so kinaze prisotne ves čas v približno enakem številu. Sinteza ciklinov se začne v fazi G₁ in se nadaljuje tudi v fazah S in G₂ [<http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/summer2002/cdko2.gif>]. Na celični cikel delujejo s tem, da se vežejo na od ciklina odvisne kinaze, ki nato aktivirajo ustrezne gene. Med njimi so tudi geni za encime, ki razgradijo cikline, vendar so ti kratkoživi, zato se v celicah kasneje ciklini ponovno lahko akumulirajo, se znova vežejo na CDK in tako sprožijo novo celično delitev.

5.2. Vrste celične smrti

Za razvoj nekega organizma je zelo pomembno ravnovesje med delitvijo celic (mitozo) in odmiranjem celic, ki večinoma poteka na programiran način, ki ga imenujemo apoptoza. Ko se na primer iz ličinke razvije odrasla žival, je potrebna razgradnja nekaterih tkiv in razvoj novih. (Podobno je pri razvoju tistih dvoživk, ki imajo v razvoju stopnjo paglavca, saj je ta morfološko precej drugačen od odraslih živali.)

Tako se torej celice, ki so v procesu razvoja osebka odvečne, pa tudi tiste, ki so okvarjene do take mere, da bi bili procesi popravljanja (npr. DNA) neuspešni, razgradijo. Apoptoza ali programirana celična smrt je serija morfoloških in biokemijskih sprememb, ki privedejo do celične smrti, ta pa je za organizem smiselna. Celice, ki so poškodovane, odmrejo z nekrozo. Tudi pri tem procesu ločimo nekatere značilne spremembe, ki so vedno enake, ne glede na tip celice. Tretji način odmrtnja celic pa se imenuje avtofagija ali citoplazemska celična smrt. Zanj je značilna razgradnja organelov in spremembe v celici, ki so drugačne kot pri nekrozi in apoptozi.

5.2.1. Apoptoza

Apoptoza ali programirana celična smrt je postopen in uravnavan proces, v katerem nastanejo z membrano obdani ostanki celice, ki jih imenujemo apoptotska telesa

[<http://padmahari.files.wordpress.com/2009/12/apoptosis.jpg>]. Ta iz organizma odstranijo fagociti, to so imunske celice, ki požirajo tujke.

Apoptoza se začne z rahlim zmanjšanjem celice in kondenzacijo kromatina. Temu sledi nastajanje izvihanih delov celične membrane, nekakšnih mehurjev. Jedro se razgradi, DNA se razcepi na kratke segmente, iz membranskih mehurčkov pa nastanejo apoptotska telesa [<http://www.scq.ubc.ca/wp-content/uploads/2006/07/Apoptosis.gif>].

Zaradi razgradnje intermediarnih filamentov vezanih na jedrno membrano se kromatin začne kondenzirati, razgradijo se encimi, ki sodelujejo pri popravljanju in pri podvojevanju DNA, aktivirajo pa se nukleaze, tako da se DNA začne razgrajevati na kose, ki so dolgi okrog 100 bp. Ker se prekinejo tudi poti prenosa elektronov v mitohondrijih (glej poglavje o energetskem metabolizmu v učbeniku), se začnejo iz mitohondrijev sproščati različne snovi, med drugimi prenašalci elektronov. Zaradi cepitve proteinov citoskeleta in proteinov pomembnih za pritrjevanje celic na druge celice, se spremeni oblika celic, na celično površino pa pridejo nekatere molekule, ki jih prej tam ni bilo. Zato fagociti prepoznajo ostanke celic kot tujke, jih vključijo v citoplazmo in tam razgradijo. Celoten proces apoptoze traja približno eno uro.

Sprožilci programirane celične smrti so številni in lahko prihajajo od zunaj celice (npr. strupene snovi ali visokoenergetska sevanja) ali pa iz notranjosti [<http://img.medscape.com/fullsize/migrated/551/371/eid551371.fig1.gif>]. Pri proženju signala od zunaj sodelujejo 'receptorji smrti' na celični membrani, ki prenesejo signal v notranjost celice. Preko adapterskih proteinov se prenese na kaspazo 8, ki sproži kaskadni proces: zapored se aktivirajo različne prokaspaze in v aktivni obliki povzročajo celične spremembe, ki so vidne tudi z mikroskopom [http://www.celldeath.de/encyclo/aporev/revfigs/rev_4b.jpg]. Ob svojem delovanju inaktivirajo tudi tiste proteine, ki v normalni celici preprečujejo razvoj apoptoze. Notranji signali najpogosteje prihajajo iz mitohondrija, odkoder se sprosti citokrom c, ki sproži aktivacijo (pro)kaspaze 9. [<http://www.researchapoptosis.com/apoptosis/images/chart-CC.gif>]

Pri poteku apoptoze imajo torej odločilno vlogo proteolitični encimi iz skupine kaspaz. Kaspaze se sintetizirajo kot neaktivne molekule (prokaspaze), ki se šele z odcepom dela molekule aktivirajo. Aktivatorski encimi odcepijo domeno, ki je prej delovala kot inhibitor, preostanek molekule pa s tem postane aktiven (kaspaza). V kaspazni kaskadi so aktivatorski encimi lahko sami kaspaze. V prvi stopnji kaskade posamezna aktivna molekula kaspaze aktivira nekaj sto prokaspaz, v drugi stopnji tako nastale kaspaze aktivirajo nekaj deset tisoč drugih prokaspaz itd. Kaspaze pa ob tem, da aktivirajo prokaspaze, cepijo tudi druge tarčne proteine v citoplazmi in jedru in s tem povzročijo celične spremembe, ki privedejo do nastanka apoptotskih teles.

Rastlinske celice odmirajo na drugačen način, ob delovanju vakuolarnih encimov. Izpraznjene celice pri rastlinah še vedno lahko opravljajo za organizem koristne funkcije, na primer transport vode.

5.2.2. Nekroza

Nekroza je nekontroliran proces, ki je posledica poškodbe celice. Biokemijski procesi med nekrozo niso tesno regulirani. Celica se najprej napihne, potem počni in sproži vnetni odgovor okoliških celic. [<http://herkules.oulu.fi/isbn9514266676/html/graphic11.jpe>]

5.2.3. Avtofagija

Avtofagija je postopek razgrajevanja znotrajceličnih komponent, na primer proteinskih agregatov, makromolekulskih kompleksov in organelov. Samo izjemoma lahko privede do celične smrti, v glavnem pa gre za prilagoditev celice neugodnim ali bistveno spremenjenim razmeram. [http://www.abcam.com/ps/cms/Images/Autophagic_Pathway_480px.jpg]

Avtofagijo sprožijo različni signali, predvsem pomanjkanje hranil, slaba preskrba s kisikom, pa tudi odsotnost rastnih faktorjev. Znotraj celice se najprej oblikuje fagofor, to je lipidna membranska struktura v obliki meniskusa, v katero so vključeni tudi številni celični proteini. Fagofor se poveča in objame del citoplazme, vključno s tarčnimi strukturami (makromolekulskimi kompleksi in/ali organeli). Meniskus se zapre v vakuolo, avtofagosom. Ta se združi z lizosomom, ki vsebuje hidrolitične encime, tako da nastane avtolizosom. Proteinska vsebina se razgradi do aminokislin, ki jih celica v pogojih stradanja lahko ponovno uporabi za sintezo lastnih proteinov in torej ni odvisna od sinteze aminokislin.

Ugotovili so, da celice lahko v pogojih nezadostne preskrbe s kisikom razgradijo lastne mitohondrije, ki jih ne potrebujejo in bi celici lahko celo škodovali zaradi sinteze reaktivnih kisikovih zvrsti. V tem primeru avtofagija deluje kot mehanizem za zaščito celice (ne za celično smrt).

6. Oksidativni stres

(v študijskem letu 2011/12 to ni več izpitna snov za študente Kemijskega inženirstva)

Reaktivne kisikove zvrsti (vodikov peroksid, superoksidni anion, singletni kisik) – označujemo jih z angleško kratico ROS (*reactive oxygen species*) – nastajajo v celicah, izpostavljenih različnim okoljskim vplivom; najbolj značilno je ultravijolično (UV) sevanje. Podobne učinke imajo okoljski toksini, agresivna zdravila in ionizirajoče sevanje. Razen tega ROS nastajajo tudi znotraj celice v procesu celičnega dihanja ter zaradi vnetnih reakcij v tkivu. Zaradi svoje reaktivnosti imajo ROS vrsto neželenih učinkov, ki povzročajo staranje celic, lahko pa privedejo tudi do razvoja bolezni, tudi raka.

Posledica delovanja ROS so v prvi vrsti peroksidacija proteinov in lipidov ter poškodbe DNA [<http://www.bmglabtech.com/images/apps/111-1.jpg>]. Zaradi nepravilnega delovanja proteinov, signalne funkcije modificiranih lipidov in poškodb dednega materiala se sproži vrsta reakcij, ki upočasnijo celični cikel, onesposobijo mehanizme odgovora proti tujkom, povzročijo poškodbe celic in morebitno celično smrt. Spremembe na ravni celice so v veliki meri posledica delovanja ROS na transkripcijske faktorje ali na druge proteine, ki uravnavajo raven transkripcije genov v jedru [<http://www.nature.com/jid/journal/v126/n12/images/570034of2.jpg>].

Seveda so se v evoluciji razvili mehanizmi, ki preprečujejo prekomerne okvare celic: encimi, kakršni so superoksid-dismutaza (SOD), katalaza in glutation-peroksidaza, ter hidrofilni (glutation) in lipofilni (tokoferoli) lovilci radikalov. Vendar intenzivno obsevanje z UV žarki povzroči tudi zmanjšanje zaščitnega odgovora na račun nižje encimske aktivnosti.

Superoksid-dismutaze (SOD) katalizirajo pretvorbo superoksidnega aniona v vodikov peroksid, ki ga nato katalaza in glutation-peroksidaza pretvorita v vodo. Značilno za SOD je, da so metaloencimi, torej imajo v strukturo proteina vključene kovinske ione (Cu, Zn, Ni, Mn, Fe; npr. Cu/Zn dismutaza kvasovk [<http://chemistry.umeche.maine.edu/CHY431/1b4l-1.jpg>]), ki sodelujejo v katalitičnem mehanizmu prenosa elektronov. Več o katalazi si preberite v navodilih za vaje.

Antioksidanti v celicah so prisotni, njihovo raven pa lahko povišamo z rednim uživanjem antioksidantov, ki so prisotni predvsem v sadju. Dodajajo jih tudi živilom kot so različni napitki, veliko pa prodajo tudi multivitaminskih tablet in prehranskih dodatkov. Razen vitaminskih antioksidantov (vitamini A, C in E) [<http://www.cellscience.com/reviews3/antioxidants.gif>] učinkujejo tudi flavonoidi – derivati fenola, ki jih najdemo med drugim v čaju [http://www.teatech.com/images/health_chemicals.gif], kavi, grozdnih lupinah in peškah [http://www.theworldwidewine.com/Wine_articles/Wine_and_health/resveratrol_and_flavonoids.gif], itd.

7. Rak

(v študijskem letu 2011/12 to ni več izpitna snov za študente Kemijskega inženirstva)

Snovi iz okolja, predvsem sevanja, agresivne kemikalije in toksini, pa tudi procesi znotraj organizma, kakršna sta na primer kronično vnetje ali izpostavljenost reaktivnim kisikovim zvrstem, lahko sprožijo nastanek raka. V razvitem svetu za rakom zboli tretjina prebivalstva.

Rakave spremembe se začnejo pri eni celici, ki se nekontrolirano deli in iz nje zraste (primarni) tumor. Če se tumorske celice preselijo (po žilah) na oddaljena mesta, se tam lahko razvijejo sekundarni tumorji (metastaze) [<http://www.nature.com/leu/journal/v22/n5/images/leu200848f3.jpg>].

Razlog, da se celice morfološko in fiziološko spremenijo in se neprestano delijo, je v nakopičenju mutacij. Te so sprva tihe in ne vplivajo na vitalne celične funkcije. Postopno pa se jih nabere toliko in na takih mestih, da pride do majhnih, nato pa vedno večjih sprememb v uravnavanju celičnega cikla, tako da kontrolni mehanizmi ne delujejo več, hkrati pa se inaktivirajo tiste signalne poti, ki bi sicer morale začeti in izvesti odmrtje celice z apoptozo. Posledica je nastanek transformiranih celic, ki se nekontrolirano delijo, tako da nastane tumor [<https://www46.safesecureweb.com/positivehealth/permit/Articles/Cancer/brudn53b.gif>].

Tarčna mesta kritičnih mutacij so geni za tumorske supresorje (zaviralci tumorske rasti) in protoonkogeni. Protoonkogeni so geni v genomu, ki so povezani s celično rastjo in lahko privedejo do razvoja raka [<http://www.scq.ubc.ca/wp-content/uploads/2006/07/oncogene-formation.jpg>]. Če se spremeni njegovo mesto v genomu, tako da gen dobi močnejši promotor, ali če se poveča število kopij gena za rastni faktor, potem bo prišlo do povečane proizvodnje proteinov, ki pospešujejo celično rast in delitev. Po drugi strani lahko posamezne mutacije znotraj gena ali v promotorju gena za rastni faktor pomenijo povečano proizvodnjo ali povečano stabilnost takih signalnih molekul in s tem večjo aktivnosti. Mutirane protoonkogene imenujemo onkogeni.

Razvoj mutacij je posledica delovanja agresivnih kemikalij in sevanja, pa tudi delovanja ROS (prejšnje poglavje), po drugi strani pa so premalo aktivni encimi, ki zagotavljajo popravljanje mutacij. Nekontrolirana celična delitev tudi pomeni, da je moteno uravnavanje celičnega cikla.

Ko tumor raste, se povečujejo tudi njegove potrebe po kisiku in hranilnih snoveh. Preskrba je mogoča samo s širjenjem lokalnega omrežja krvnih žil in rastjo novih (angiogeneza) [<http://www.nature.com/nrc/journal/v3/n6/images/nrc1093-f2.jpg>].

Zdravila proti raku so lahko nespecifična in so usmerjena proti vsem delečim se celicam, prizadanejo pa najmočnejše tiste, ki se najhitreje delijo – to so rakave celice. Razen obsevanja tako delujejo analogi nukleotidov, ki pa ne omogočajo podaljševanja nove verige DNA, zato se sinteza predčasno zaključi. Bolj usmerjena zdravila delujejo na procese signaliziranja v celici. Zdravilo Tamoxifen se na primer veže v strukturo jedrnega receptorja za steroidni hormon estradiol in zato preprečuje vezavo hormona, posledično

pa se na receptor ne more vezati koaktivator in aktivacija transkripcije se ustavi [<http://www.web-books.com/eLibrary/Books/Bo/B18/OPS/images/image015.jpg>]. Zdravila so lahko usmerjena tudi proti rasti krvnih žil, kar upočasni rast tumorjev.

8. Protitelesa in imunski odgovor

(v študijskem letu 2011/12 sta za študente Kemijskega inženirstva kot izpitna snov pomembni samo podpoglavji 8.4 in 8.6)

Imunski sistem omogoča, da preživimo v okolju, polnem parazitov, bakterij in virusov. Pri človeku se je razvil v zapleten preplet med seboj povezanih procesov, ki omogočajo prepoznavanje in obrambni odgovor proti zelo različnim tipom tujkov, tudi takim, ki jih organizem doslej še ni nikoli srečal. Osnova za obrambni odgovor je sposobnost telesa, da sintetizira več kot sto milijonov različnih protiteles in več kot bilijon različnih receptorjev. Na prvi pogled se to zdi nemogoče, saj so tako receptorji kot protitelesa pač proteini, človekov genom pa ima zapise le za približno 25.000 različnih proteinov. Zapleten mehanizem kombiniranja posameznih genskih segmentov pa omogoča, da se na osnovi relativno majhnega nabora genov vendarle sintetizirajo proteini z zelo različnimi vezavnimi lastnostmi. Snov, ki sproži imunski odgovor, imenujemo antigen (Ag), nanj pa organizem odgovori na različne načine; eden med njimi je sinteza proteinov iz razreda imunoglobulinov, ki jim zaradi njihove posebne funkcije rečemo protitelesa (Ab). Pogosto jih prikazujejo shematsko v obliki črke Y. Antigeni so lahko zelo veliki, protitelesa pa se vežejo le na nek kratek del antigena. Ta segment imenujemo epitop [http://www.odec.ca/projects/2003/lanage3c/public_html/antigen_antibody.gif].

8.1. Obrambni mehanizmi pri živalih in človeku

Obrambni mehanizmi so dveh tipov: prirojeni in pridobljeni. Prirojeni obrambni mehanizmi so neodvisni od tarče, proti kateri so usmerjeni, pridobljeni pa se razvije za vsako tarčo (tujka) posebej. Ta je dvokomponentni; sestavljata ga humoralni odgovor, pri katerem nastajajo topna protitelesa (imunoglobulini), usmerjena proti tujku, in celični odgovor, pri katerem se razvijejo citotoksični limfociti T (T-celice ubijalke). V evoluciji se je pridobljeni odgovor razvil šele na stopnji vretenčarjev, medtem ko imajo nižje razvite živali le prirojeni odgovor.

Imunski odgovor najpogosteje povezujemo z delovanjem različnih skupin belih krvnih celic, levkocitov. Med seboj se razlikujejo po izvoru, delovanju, po površinskih proteinih in po načinu laboratorijskega barvanja. Osnovna razdelitev levkocitov je na limfocite (tipov B in T) in na mono- in granulocite [<http://www.lymphomation.org/images/leukocytes-normal.gif>].

8.1.1. Prirojeni obrambni odgovor

Najpreprostejši primer prirojene obrambe pred tujki so pregrade, ki preprečujejo vdor škodljivih mikroorganizmov v telo. Tako delujejo koža, sluznice in izločki, ki razen tega s svojo alkalnostjo ali kislostjo lahko zaviralno vplivajo na nekatere organizme. Izločki lahko vsebujejo tudi zaščitne proteine, ki delujejo protimikrobno ali protivirusno, kot na primer lizocim (ki razgrajuje bakterijske ovojnice), interferone (ki ob prisotnosti tujkov aktivirajo druge imunske celice in delujejo zaviralno na razmnoževanje virusov v okuženih celicah) in laktoferin (ima fungicidno in baktericidno delovanje). Drugo raven prirojene obrambe predstavljajo notranji mehanizmi - delovanje fagocitov (celic, ki požirajo in razgrajujejo

tujke), protimikrobni proteini, vnetni odgovor in naravne celice ubijalke. Sem bi lahko prištevali aktivacijo komplementa, to je kaskadnega sistema okrog 30 različnih proteinov, ki se postopno aktivirajo in na koncu povzročijo propad patogenega organizma s tem, da se v njegovo membrano vstavi kompleks petih proteinov komplementa, ki oblikuje poro, skozi katero začne iztekati celična vsebina [<http://people.eku.edu/ritchisong/complement2.gif>].

Čeprav se zdi prirojeni imunski odgovor dokaj preprost, pa ni povsem tako. Organizem mora razlikovati tuje od lastnega. Človeške celice imajo na svoji površini vrsto različnih membranskih proteinov, ki delujejo kot receptorji in se odzivajo na prisotnost telesu tujih sestavin, kakršne so na primer bakterijske membrane, virusna RNA in podobne. Ti receptorji spadajo v skupino Tollu podobnih receptorjev (TLR), ki so jih prvič odkrili pri vinskih mušicah, kasneje pa tudi pri človeku. Ko celica dobi signal o prisotnosti tujkov, se znotraj celice začne sinteza proteinov, ki predstavljajo obrambni odgovor (različne signalne in protimikrobne snovi) [http://www.sapphirebioscience.com/images/wallcharts/alexis_toll_like_receptors_detail.jpg]. Skupina TLR je heterogena in se odziva na zelo različne komponente tujkov: nukleinske kisline virusov, sestavine mikrobnih ovojnic ipd., ki jih vse označujemo s skupnim izrazom PAMP (s patogeni povezani molekularni vzorci) [http://www.invivogen.com/popup.htm?images/bacteria_web.gif].

Za prirojeni imunski odgovor velja, da deluje hitro, to je takoj, ko pride do vdora patogena, medtem ko se pridobljeni odgovor razvije postopno, v nekaj dneh, in poteka nekoliko različno, če gre za prvi stik organizma z nekim tujkom ali če je bil organizem temu tujku izpostavljen že prej.

8.1.2. Pridobljeni obrambni odgovor

Za delovanje pridobljenega (adaptivnega) odgovora so ključne krvne celice iz skupine limfocitov in to limfociti B in T, ki jim rečemo tudi T- oziroma B-celice. Čeprav so si pod mikroskopom te celice precej podobne, imajo na površini zelo heterogene membranske proteine – receptorje za tuje molekule. Vsak limfocit ima na površini veliko število takih receptorjev, ki pa so si vsi enaki in hkrati različni od receptorjev na površini limfocita z drugo specifičnostjo. Število enakih limfocitov se lahko izrazito poveča le ob vdoru tujka, kakršnega določen limfocit prepozna. Proces prepoznavanja molekul tujka poteka posredno: limfociti se v stopnji prepoznavanja tujkov ne vežejo neposredno na patogene, pač pa na razgrajene patogene, ki so jih celice predstavile na svoji površini vezane na membranske proteine – govorimo o predstavitvi antigenov na celični površini. Razgrajene molekule tujkov se tam pojavijo vezane na molekule poglobitnega kompleksa tkivne skladnosti (MHC ali poglobitni histokompatibilnostni kompleks).

Pri predstavitvi antigena (dela tujka, ki ga imunski sistem prepozna) sta možna dva scenarija. Pri patogenih, ki jih fagociti uničijo, se razgradni produkti iz lizosomov povežejo z vezikli, ki prihajajo iz Golgijevega aparata in vsebujejo proteinske molekule MHC II (poglobitni histokompatibilnostni kompleks razreda II). Peptidi tujega izvora se vežejo na površino molekule MHC II in kot kompleks prenesejo na celično membrano. Tako se antigeni predstavijo na zunanji površini fagocita (antigen-predstavitvene celice), kjer jih prepoznavajo T-celice pomagalke (T_H).

Celice, ki jih na primer okuži virus, predstavijo tuje peptide na drugačen način. Virus v okuženi celici povzroči sintezo lastnih proteinov, ki pa jih celica, ker so ji tuje, lahko do neke mere prenese v proteasom. Tam se razgradijo do peptidov. Ti peptidi potujejo v endoplazemski retikulum, kjer se povežejo z molekulami MHC I in nato preko veziklov potujejo na površino [<http://microvet.arizona.edu/Courses/MIC419/Secure/CaseNoTap/Parhamagproc.jpg>]. Molekule MHC I najdemo na površinah vseh celic organizma, ki imajo jedro. Na molekulah MHC I predstavljene antigene prepoznajo citotoksične T-celice (T_C), ki jih imenujejo tudi T-celice ubijalke.

Čeprav se zdi, da gre pri molekulah MHC za dve točno določeni primarni strukturi, ni tako: med posameznimi ljudmi so razlike v aminokislinskem zaporedju molekul MHC in te razlike med membranskimi proteini predstavljajo osnovo za zavračanje presadkov – celice enega človeka imunski sistem drugega človeka prepozna kot tuje in jih začne napadati.

8.2. Sinteza protiteles

Imunoglobulini so v genomu človeka zapisani na način, ki je pri ostalih proteinih zelo redek: za eno polipeptidno verigo je zapis razdeljen na več segmentov (pogojno bi jim lahko rekli tudi geni), ki se med seboj različno povezujejo na ravni DNA, kar omogoča veliko raznolikost proteinskih produktov ob sorazmerno majhnem številu genov. Razen tega prihaja do različnega izrezovanja intronov in do nenatančnosti pri povezovanju segmentov, kar vse prispeva k izredni raznolikosti protiteles, ki so posledično usmerjena proti točno določenim antigenim determinantom.

Tudi T-celični receptorji spadajo v skupino imunoglobulinov z veliko selektivnostjo in torej zelo različno primarno strukturo v delu, ki je odgovoren za prepoznavanje in vezavo na površini predstavljenih antigenov. Čeprav vsaka T- celica na površini nosi okrog 100.000 imunoglobulinskih molekul, imajo vse te molekule na površini iste celice enako primarno strukturo in s tem enako specifičnost. Po drugi strani pa sta si dve T-celici le redko enaki. Ocenili so, da je v človekovem telesu okrog 1 milijon različnih B-celic in 10 milijonov različnih T-celic, število genov oziroma segmentov za imunoglobuline pa je le nekaj sto.

Ko se v kostnem mozgu razvije nezrela celica B, ima na površini monomerni IgM. Pri sintezi protiteles, ki so usmerjena proti nekemu tujku, mora priti do selekcije in ojačanja točno določenih celic. Proces se začne z vezavo Ag na membranski receptor (monomerni IgM). Ta je povezan z membranskim heterodimerom Ig-alfa-Ig-beta, ki ima na C-koncu vsake verige na citoplazemski strani 18 AA dolg motiv ITAM s tirozinskimi ostanki, ki se lahko fosforilirajo [http://www.roswellpark.org/files/1_2_1/immunology/seonfig2.jpg]. Ob vezavi Ag pride do oligomerizacije receptorskih molekul, ta pa sproži fosforilacijo tirozinskih ostankov s posredovanjem protein-kinaze. Fosforilirane domene ITAM služijo kot mesto pripenjanja drugih protein-kinaz in posledično fosforilacije proteinov v celici. Sproži se zelo zapletena signalna kaskada [http://www.cellsignal.com/reference/pathway/images/B_Cell_Antigen.jpg], ki privede do aktivacije izražanja genov, to pa do hitrejše rasti celic in diferenciacije B-celic.

Da pride do razvoja učinkovitih protiteles, se morajo v kri sprostiti Ab z ustreznimi efektorskimi lastnostmi. Najprej pride do alternativnega izrezovanja intronov, tako da se

namesto membranskih IgM začnejo izražati sekretorni IgM, ki so pentamerni. V naslednji stopnji pride do zamenjave razreda, tako da se sintetizirajo drugi tipi Ab, a z isto specifičnostjo [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/b3/Class_switch_recombination.png]. To je mogoče, ker se L-veriga sintetizira ves čas enaka, medtem ko se H-veriga zamenja. Zapisi za C-segmente različnih razredov so na DNA nanizani drug za drugim (8 različnih). Pri zamenjavi pride do prenosa segmenta VDJ v bližino drugega segmenta C kot prej.

Glede na to, da imamo v telesu vsaj milijon različnih prekurzorskih B-celic (z različnimi specifičnostmi), a le majhno število enakih, mora obstajati mehanizem, po katerem se ob okužbi intenzivno namnožijo tiste celice, ki prepoznajo točno določene antigene. Gre za selekcijski mehanizem, v katerem se kot kloni namnožijo in dozori le tisti limfociti B, ki so prišli v stik z antigenom, za katerega imajo na površini ustrezno protitelo (receptor). Hkrati s to klonsko ekspanzijo [<http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/C/ClonalSelection.jpg>], ki privede do nastanka plazmatk in intenzivnega izločanja topnih protiteles, nastane tudi manjše število spominskih celic, ki bodo na voljo za hitrejši odziv pri morebitni naslednji okužbi z istim povzročiteljem.

8.3. Citotoksični limfociti

Celice B dozori v plazmatke in izločajo velike količine topnih protiteles, usmerjenih proti tujkom. Po drugi strani pa pridobljeni imunski odgovor vključuje tudi celice T, ki analoge protiteles – T-celične receptorje – izražajo na površini in z njimi prepoznajo obolele celice [<http://www.smile.org.au/research/images/paper-cytotoxic.JPG>]. Medtem ko T-celice pomagalke (Th; CD4+) prepoznava na molekule MHC vezane antigene in preko mediatorjev posredujejo signale B-celicam, da se diferencirajo, pa T-celice ubijalke, imenovane tudi citotoksični limfociti (CTL ali T_c; CD8+), z vezavo na tarčne celice (tumorske ali okužene) povzročijo njihovo celično smrt.

Celice T na površini izražajo T-celične receptorje, ki prepoznajo antigene, vezane v strukturo MHC I na površini vseh celic z jedrom. Stik z antigenom sproži sintezo interleukina 2, ta pa služi kot signalna molekula, ki sproži intenzivno delitev in diferenciacijo T-celic [<http://www.nature.com/nri/journal/v4/n4/images/nri1330-f2.jpg>]. Nastale celice T so aktivirane in lahko napadejo okužene celice z antigenom na površini, lahko pa tudi presajene organe ali tumorske celice. Diferenciacija in aktivacija v tem primeru pomenita sintezo citotoksičnih snovi, ki se odlagajo v granulah.

Napad na okužene celice sprožita proteinska citotoksina perforin in granulizin. V celicah T_c sta shranjena v citosolnih granulah, ko pa se granule sprostijo na površino, se vgradita v membrano tarčne celice in tam oblikujeta pore. Skozi pore lahko vstopi serinska proteinaza grancim B (ki je tudi shranjena v granulah) [<http://www.nature.com/nri/journal/v2/n10/images/nri911-f1.gif>]. Ta aktivira kaspazno kaskado, kar privede do apoptoze (glej poglavje o programirani celični smrti).

8.4. Lastnosti imunoglobulinov

Konec 50-tih let 20. stoletja so uspeli odkriti, kako so zgrajene molekule imunoglobulinov razreda G. Po cepitvi IgG s proteinazami so produkte analizirali s PAGE in določili velikosti fragmentov. S papainom je IgG razpadel na 3 fragmente s po 50 kDa, od katerih sta 2 (Fab) bila sposobna vezati antigene, 1 (Fc) pa ne [http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/sigma-aldrich/migratemisc4/Papain_Fig2.Par.0001.Image.569.gif]. Vseeno pa je Fc pomemben del molekule, saj posreduje efektorske funkcije kot npr. iniciacijo kaskade komplementa. IgG ima 150 kDa in je zgrajen iz 2 parov verig v obliki črke Y: 2x25 kDa lahki verigi (L) + 2x50 kDa težki verigi (H). Verige so povezane z disulfidnimi mostički. H-verigi imata po 4 domene, značilne za imunoglobuline, L-verigi pa po 2 taki domeni [<http://img.tfd.com/vet/thumbs/gr222.jpg>].

Zaradi tega, ker ima vsaka molekula IgG 2 vezavni mesti za Ag, lahko pride do prečnega povezovanja Ag z Ab. Kót v Y je spremenljiv, ker je na stiku Fc in Fab zelo fleksibilna regija, t.im. zglob.

V serumu je najvišja koncentracija IgG, obstaja pa še več drugih razredov imunoglobulinov. Vsi imajo L-verigo, ki je bodisi kapa ali lambda, medtem ko so H-verige pri vsakem razredu različne. Po stiku z Ag se najprej razvijejo IgM, ki imajo 10 vezavnih mest za Ag in zato zelo dobro vežejo multivalentne Ag. IgA so najpogostejši v telesnih tekočinah in sluznicah, zato predstavljajo prvo obrambno črto v boju proti tujkom. IgE so učinkoviti proti parazitom, sodelujejo pa tudi pri alergijskih reakcijah. Pomen IgD še ni dobro znan, najverjetneje pa stimulirajo B-celice k sintezi drugih protiteles.

Poravnava aminokislinskih zaporedij različnih Ab iz skupine IgG pokaže, da so razlike med Ab skoncentrirane na N-konca verig L in H, kjer so po 3 nizi hipervariabilnih ostankov. Aminska konca predstavljata variabilni domeni (VL, VH), preostanek pa so konstantne domene oz. regije (CL1; CH1-3). Prostorska struktura pokaže, da so hipervariabilni odseki tisti, ki oblikujejo zanke na skrajnih koncih obeh krakov imunoglobulina in s tem predstavljajo vezavno površino za antigene. Velika raznolikost razmestitve zank pomeni zelo različne vezavne regije, ki so za vsak antigen drugačne.

Ig-zvitje ima obliko beta-sendviča s hipervariabilnimi zankami na N-končnih domenah. Vsaka domena ima dve beta-plošči iz antiparalelnih beta-snopov, ki obdajajo hidrofobno sredico. Z Ag se vežejo le zanke, ki predstavljajo 'regije, ki določajo komplementarnost' (CDR – *complementarity determining regions*). V človekovem genomu je več kot 750 genov za proteine z Ig zvitjem, ki imajo različne funkcije, ne samo imunskih. Najdemo ji tudi pri drugih vretenčarjih, pa tudi pri nižjih živalih, pri rastlinah in glivah pa jih ni v klasični obliki.

Hipervariabilni deli Ig so razporejeni tako, da jih vseh 6 na enem kraku Y tvori neprekinjeno vezavno površino za Ag. Kristalografske analize so pokazale, da je interakcija med Ag in Ab podobna kot med encimom in substratom, kjer prihaja do različnih vrst povezav, ki omogočajo, da je povezava specifična in močna. Majhni Ag se lahko vežejo na Ab le preko nekaj zank (npr. oktapeptid interagira s ~15 ostanki na Ab, veliki pa s ~20 ostanki). Ob vezavi prihaja le do manjših konformacijskih sprememb na

vezavni površini (ki meri $\sim 20 \times 30 \text{ \AA}$). Protitelesa (poliklonska) proti istemu proteinu imajo lahko različno oblikovane vezavne regije, saj lahko prepoznajo različne dele molekule.

8.5. Alergijski odgovor

V nekaterih primerih se organizem lahko odzove z imunskim odgovorom na nek sicer neškodljiv antigen. Tak antigen imenujemo alergen, odgovor pa alergijski. Pri prvem stiku s tako snovjo se aktivirajo celice B, ki začnejo sintetizirati imunoglobuline razreda IgE, ta pa se vežejo na mastocite. Ta povezava je možna, ker imajo mastociti na površini receptorje za Fc-regijo IgE, povezava pa je izredno močna, tako da IgE ostanejo vezani na površino zelo dolgo. Ob naslednjem stiku z istim alergenom pride do vezave alergena na IgE na površini mastocitov, ti pa posledično hipno sprostijo vsebino veziklov (granul), ki so napolnjeni predvsem s histaminom in heparinom [<http://www.web-books.com/eLibrary/Medicine/Immunological/Images/Allergy.gif>], sintetizirajo in sproščajo pa se tudi citokini in eikozanoidi (prostaglandin in levkotrien) [http://www.mydietaryfats.org/images/uploads/overview_figure2.jpg]. Mastociti so celice, sorodne krvnim granulocitom (bazofilcem) in jih najdemo predvsem v vezivnem tkivu in sluznicah; znani so predvsem kot posredovalci alergijske reakcije, čeprav sodelujejo tudi pri celjenju ran in obrambi pred paraziti [<http://www.sciencefriday.com/news/090707/mast.jpg>].

Izredno močan hipni odgovor celotnega organizma na alergen imenujemo anafilaktični šok in lahko privede do smrti. Sproščanje heparina povzroči širjenje in povečanje prepustnosti kapilar, to pa ima za posledico pordečitev in oteklino. Drugi mediatorji alergijske reakcije prav tako prispevajo k razvoju značilnih simptomov. Kot zdravilo uporabljajo antihistaminike, ki blokirajo receptorje za histamin, pa tudi druga sredstva, ki delujejo zaviralno na kalcijeve kanale, udeležene pri degranulaciji mastocitov oziroma blokirajo levkotriene, mediatorje vnetja. Pri anafilaktičnem šoku pride do sistemskega širjenja žil, kar povzroči izredno znižanje krvnega tlaka, hkrati pa močno oteče sluznica dihal, zato se bolniki dušijo. Anafilaktična reakcija s šokom je smrtna v 1 % primerov. Znani akutni alergeni so sestavine strupa žuželk (predvsem čebel in os), penicilin, pa tudi nekateri oreščki. Drugi pogosti alergeni redko povzročijo akutne reakcije (npr. izločki pršic, živalski prhljaj, cvetni prah itd.).

Alergeni so večinoma proteini in polisaharidi, ne pa izključno. Kemijsko gledano so zelo heterogena skupina molekul, saj lahko alergijski odgovor sproži stik s kovino, beta-laktamskimi antibiotiki, lateksom, cvetnim prahom nekaterih trav, dreves in zeli, uživanje mleka, jajc, nekaterih vrst sadja in zelenjave idr. Čeprav kot alergene v širšem pomenu besede štejemo posamezne vrste živil, zdravil in izločkov, so natančnejše analize pokazale, da je na primer alergen 'mačje dlake' v resnici heterodimerna proteinska molekula Fel d1, ki jo izločajo v slino in z lojem. Poglavitni alergen arašida je protein Ara h1 s 623 aminokislinskimi ostanki, med katerimi je 23 epitopov (dolžine 6-10 ostankov), ki jih prepoznajo IgE.

8.6. Imunološke metode

Protitelesa omogočajo izredno natančno prepoznavanje točno določenih tarčnih molekul, najpogosteje proteinov. Vezava teh antigenov je lahko tako specifična, da protitelesa v heterogeni mešanici proteinov prepoznajo nek protein, tudi če se od drugih najbolj podobnih, razlikuje samo po enem ali dveh aminokislinskih ostankih. Poskusne živali, ki jim vbrizgamo tuj protein, začnejo sintetizirati protitelesa, ki pa so lahko usmerjena proti različnim regijam na površini iste proteinske molekule. Taka protitelesa imenujemo poliklonska. Monoklonska protitelesa so tista, ki prepoznajo samo točno določeno regijo (epitop) na površini antigena, njihova priprava pa je bolj zapletena.

8.6.1. Imunizacija poskusnih živali in izolacija protiteles

Če želimo pripraviti protitelesa za uporabo v laboratoriju, torej za iskanje tarč, moramo predhodno antigenski protein popolnoma očistiti. Potem ga vbrizgamo v žilo ali v potrebušnico poskusne živali, ki je lahko miš, podgana, kunec, če pa rabimo velike količine protiteles, pa lahko imuniziramo tudi ovce, koze ali konje. Seveda se protitelesa ne bodo razvila proti lastnim proteinom, zato npr. ne moremo pri miših povzročiti nastanka protiteles proti mišjim proteinom. V določenih časovnih razmakih ponovimo imunizacijo - podobno kot tudi pri nekaterih cepljenjih človek dobi ponoven odmerek cepiva. S tem se sintetizira več protiteles. Po več tednih – običajno 2-3 mesecih – živalim odvzamemo kri in shranimo krvni serum [http://upload.wikimedia.org/wikibooks/en/7/76/Biochem-polyclonal_production.jpg], ki ga zdaj imenujemo antiserum. Za imunizacijo miši potrebujemo skupaj okrog 0,2 mg proteina, dobimo pa okrog 1 ml seruma. Iz seruma nato z afinitetno kromatografijo očistimo protitelesa. To lahko naredimo tako, da v koloni preko inertnega nosilca, ki ima imobilizirane molekule proteina A, spustimo kapaciteti kolone ustrezno količino seruma. Protitelesa se vežejo na protein A (tega sicer proizvajajo patogene bakterije *Staphylococcus aureus*, da inaktivirajo imunski odgovor organizma, ki ga okuži, lahko pa ga dobimo tudi v rekombinantni obliki iz drugih mikroorganizmov) preko svoje konstantne regije [<http://images.the-scientist.com/content/figures/images/yr2000/apr17/reagent.jpg>], medtem ko se ostali serumski proteini ne vežejo. S spremembo pufrskih pogojev interakcija med proteinom A in imunoglobulini popusti in protitelesa se sprostijo s kolone.

8.6.2. Priprava monoklonskih protiteles

Visokospecifična protitelesa, ki prepoznajo samo en epitop na površini antigena, lahko dobimo s tem, da pripravimo hibridomske celice, to so hibridi med celicami vranice imuniziranih miši in mielomskimi celicami, ki se neprestano delijo. S tem ustvarimo celično linijo, ki proizvaja samo eno vrsto protitelesa in se neprestano deli, tako kot tumorske celice. Take celice lahko gojimo v laboratoriju in iz gojišča, v katerem rastejo, izoliramo izločena protitelesa.

Postopek je tak, da miš najprej imuniziramo (tako kot pri pripravi poliklonskih protiteles). Miši začnejo sintetizirati protitelesa, kar sicer res pomeni, da plazmatke proizvajajo topne imunoglobuline, vendar pa imajo v vranici prekurzorske B-celice, iz katerih take plazmatke nastajajo. Ker vsaka celica proizvaja samo en tip protitelesa, lahko z izolacijo in gojenjem posamezne celice dosežemo proizvodnjo protiteles samo proti enemu epitopu. Za lažje gojenje celice naredimo nesmrtno (imortalizirane) s tem, da jih spojimo z rakavimi plazmatkami (mielomskimi celicami). Tako kot rakave celice se tudi hibridomske neomejeno delijo, ob tem pa proizvajajo velike količine takih protiteles, kakršna bi

proizvajala vranična celica pred fuzijo [http://www.nature.com/nchembio/journal/v4/n6/fig_tab/nchembio0608-326_F1.html]. Postopek priprave monoklonskih protiteles traja 4-6 mesecev in zahteva boljše opremljen laboratorij za delo s celičnimi kulturami. Najzahtevnejša stopnja priprave je selekcija klonov, to je iskanje tistih hibridomskih celic, ki proizvajajo protitelesa z željeno specifičnostjo v čim večjih količinah.

8.6.3. Imunodetekcija po prenosu western

Mešanico proteinov, ki smo jo z elektroforezo ločili na posamezne proteine na osnovi velikosti (NaDS-PAGE), s poliakrilamidnega gela prenesemo na nitrocelulozno ali najlonsko (PVDF) membrano. Ta prenos lahko opravimo s tem, da na gel položimo membrano, oboje pa preko v pufer namočenih filtrirnih papirjev stisnemo med dve elektrodi in priklopimo tok. Proteini, ki so bili že med prvotno elektroforezo negativno nabiti, bodo potovali iz gela na membrano, ki je položena na + strani, na membrano pa se bodo ireverzibilno vezali. Samo tak prenos proteinov na membrano imenujemo prenos western [<http://www.fermentas.com/techinfo/electrophoresis/img/blotting.gif>].

Postopek običajno traja 1 h, ko je končan, pa na membrani najprej blokiramo vsa prosta vezavna mesta (uporabimo goveji serumski albumin ali mleko – vsebuje kazein, albumin in druge proteine), nato pa membrane inkubiramo v raztopini protiteles proti proteinu, ki nas zanima in za katerega ne vemo, ali je res bil prisoten v mešanici proteinov [<http://www.bseinquiry.gov.uk/report/volume2/images/chaptec8.gif>]. Če je bil prisoten, se bodo protitelesa nanj vezala, na druge proteine pa ne. Ker so protitelesa brezbarvna, moramo na koncu izvesti barvno reakcijo, da vidimo, kje so protitelesa prepoznala antigen. To naredimo tako, da uporabimo tako imenovana sekundarna protitelesa, ki prepoznajo primarna [<http://www.westernblotting.org/wb-antibody.jpg>]. Primarna sekundarna telesa je mogoče kupiti in so za tovrstno uporabo vezana na encim, najpogosteje hrenovo peroksidazo. Pravimo, da so sekundarna protitelesa konjugirana (povezana) z reporterskim encimom. Tam, kjer se bodo sekundarna protitelesa vezala na primarna (to pa je tam, kjer je bil na membrani antigen), tam bo tudi encim. Če dodamo kromogeni substrat, bo na mestu encima nastala temnejša lisa, medtem ko bo ozadje ostalo neobarvano.

Podoben imunološki postopek, ki pa ni povezan z elektroforeznim ločevanjem proteinov, se imenuje točkovni prenos. Vzorce, za katere predvidevamo, da lahko vsebujejo antigene, s pipeto nanesimo na membrano kot posamezne točke. Preostalo membrano inkubiramo z albuminom ali kazeinom, nato pa razvijemo reakcijo s primarnimi in konjugiranimi sekundarnimi protitelesi [<http://www.gbiosciences.com/EducationalUploads/EducationalProducts/Images/mediumimages/Dot%20Blot%20scheme.jpg>]. Tam, kjer vidimo obarvano točko, je bil antigen prisoten. Če nanesimo različne koncentracije antigena in imamo ustrezno umeritveno krivuljo, lahko ocenimo koncentracijo antigena v začetnem vzorcu proteinov.

8.6.4. Encimskoimunski test (ELISA)

Eden najpogosteje uporabljanih imunskih testov je ELISA (angl. enzyme-linked immunoassay). Z njim lahko določimo koncentracijo nekega antigena v kompleksnem vzorcu, saj specifična protitelesa prepoznajo samo tisti protein, proti kateremu so se razvila. Mnoga protitelesa je mogoče kupiti, tako da dolgotrajni postopek priprave odpade. ELISA obstaja v precej različnih izvedbah, za vse pa je značilno, da jih izvajamo na mikrotitrskih ploščah – plastičnih nosilcih z vdolbinami volumna ~250 µl. Plastični nosilec

je prepariran tako, da zelo močno veže proteinske molekule. Če v vdolbinice odpipetiramo mešanico proteinov, med katerimi je tudi neznan koncentracija tistega, proti kateremu imamo protitelesa, se bodo proteini vezali na plastiko, vse ostale sestavine vzorca pa bomo sprali z nevtralnimi puframi. Nato nezasedena mesta na plastiki prekrijemo z albuminom ali kazeinom; prebitek ponovno speremo. Dodamo raztopino primarnih protiteles, ki se bodo vezala samo na tistih mestih, kjer je bil na plastiko vezan tarčni protein. Da razvijemo reakcijo, ponovno uporabimo konjugirana sekundarna protitelesa. Več ko je bilo v vzorcu (in torej v vdolbinici) antigena, več molekul primarnega protitelesa se je v vdolbinico vezalo, posledično pa se bo nanje vezalo tudi več sekundarnih protiteles. Po dodatku kromogenega substrata bo encim, vezan na sekundarno protitelo, razcepil substrat, intenziteta barve pa bo merilo vezanih molekul [<http://microvet.arizona.edu/Courses/MIC419/ToolBox/elisa3.jpg>]. Intenziteto določimo s prirejenim spektrofotometrom, čitalnikom mikrotitrskih plošč. Če smo predhodno pripravili umeritveno krivuljo z izoliranim antigenom, lahko iz krivulje odčitamo koncentracijo antigena v začetnem vzorcu.

Sendvič-izvedba je nekoliko drugačna. Tu na plastiko vežemo primarno protitelo, nato prosta mesta blokiramo, speremo in naneseemo vzorec. Mesto vezave določimo tako, da ponovno vežemo primarno protitelo, nato pa konjugirano sekundarno in razvijemo barvno reakcijo [http://newenglandbiolabs.de/en/images/stories/cst_elisa_gross.jpg].

8.6.5. Imunoafinitetna kromatografija

Če protitelesa proti nekemu proteinu vežemo na nosilec, lahko z njegovo pomočjo ta protein izoliramo in heterogene mešanice proteinov. Iskan protein se bo vezal na imobilizirana protitelesa na nosilcu, medtem ko bomo ostale sestavine vzorca sprali. S spremembo pogojev, ki je lahko sprememba pH, ionske jakosti ali z dodatkom nizke koncentracije denaturanta (npr. uree) bo povezava med protitelesom in antigenom oslabil in antigeni protein se bo eluiral. Pogosto kromatografijo izvajamo v kolonah, ki pa so večinoma zelo majhne, saj se na nosilec veže samo en protein in kapaciteta nosilca običajno presega nekaj miligramov na mililiter. Gre za izvedbo afinitetne kromatografije, pri kateri kot ligand deluje protitelo [http://services.leatherheadfood.com/mycotoxins/wp2training/immunoaffinity_principle.jpg].

Rekombinantne proteine lahko označimo z epitopom tako, da na ravni DNA proteinu, ki ga želimo pripraviti v rekombinantni obliki, dodamo na N- ali C-konec kratek segment, ki zapisuje za epitop. Iz znanstvene literature poznamo več različnih primerov epitopov, ki jih dodajajo proteinom, proti katerim sicer protiteles ni mogoče vnaprej pripraviti, protitelesa proti izbranim epitopom pa so komercialno dostopna. Tako označevanje z epitopi je pomembno tudi pri detekciji rekombinantnih proteinov po prenosu western ali za določanje prisotnosti proteinov v celičnih preparatih, ko želimo npr. določiti, kje v celici je rekombinantni protein (npr. preverjanje vloge signalnih zaporedij, ki določajo usmerjanje proteinov v celici).

8.6.6. Imunofluorescenčne tehnike

Predvsem v celični biologiji so se za zasledovanje proteinov v celicah in tkivih zelo razvile imunofluorescenčne tehnike. Če imamo protitelesa proti proteinu, ki nas zanima, jih lahko konjugiramo s fluorescenčnim barvilom [protokoli - <http://www.drmmr.com/abcon/>], s tako pripravljenimi protitelesi pa obarvamo histološki preparat fiksiranih celic. Če je v preparatu prisoten antigen, se bodo nanj protitelesa vezala, ker pa so fluorescenčno

označena, bomo ob uporabi fluorescenčnega mikroskopa [<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/techniques/fluorescence/anatomy/images/bx51epilighpaths.jpg>] lahko določili, kje (v katerih celicah ali kje znotraj celice) je protein prisoten. To bi bil primer direktnega barvanja. Izvedb takih tehnik je več: fluorescenčno označeno je lahko sekundarno protitelo (s tem nam ni treba pripravljati konjugiranih protiteles za vsak antigen posebej, pač pa kupimo protitelesa proti imunoglobulinom iz živali, ki so proizvedle protitelo) – tako barvanje bi imenovali indirektno [<http://www.bio.davidson.edu/COURSES/genomics/method/IMF.GIF>]. Če na istem preparatu uporabimo več različnih in različno fluorescenčno označenih protiteles, lahko izvajamo kolokalizacijske študije, torej določamo, ali sta dva proteina prisotna sočasno v istem delu celice ali tkiva [<http://www.kcl.ac.uk/depsta/biomedical/randall/images/fluo-mul.jpg>]. Fluorokromi, ki jih najpogosteje uporabljajo za označevanje protiteles, so cianini (Cy3 in Cy5) [<http://www.olympusfluoview.com/theory/images/fluorophoresintrofigure6.jpg>], fluorofori iz skupine AlexaFluor [http://www.invitrogen.com/etc/medialib/en/images/ics_organized/brands/molecular-probes/Notes.Par.47163.Image.641.277.1.gif], fluorescein in fikoeritrin (PE). Cianine na primer vežemo na protitelesa preko aaminskih skupin na stranskih verigah lizinskih ostankov. Enako označujemo proteine s fluoresceinom, pri tem pa uporabimo reaktivni izotiocianatni derivat (FITC). Fikoeritrin je velik protein (~240 kDa) in nanj se veže 25 fluorovih atomov, zato deluje kot močan fluorokrom. Aktivacija fikoeritrina poteče s sukcinamidom, pri čemer nastane maleimid-PE, ta pa se veže preko prostih SH- skupin cisteinskih ostankov reduciranega protitelesa – tako dosežemo kovalentno konjugacijo protiteles.

Na tak način označena protitelesa uporabljajo tudi v pretočni citometriji za označevanje celic, ki imajo na površini izražene značilne proteine. Protitelesa se vežejo na površinske proteinske molekule in s tem nanje pripnejo fluorescenčno oznako. Pretočni citometer, opremljen z ločevalnikom fluorescenčno označenih celic [http://www.steve.gb.com/images/science/fluorescent_cell_sorter.png], lahko na osnovi optičnih lastnosti celic zbira v frakcije samo tiste celice, ki nosijo določeno oznako.

9. Biokemija čutil

Čutila so tisti organi, ki živalim omogočajo zaznavanje okolja in posredno odzivanje nanj. V evoluciji so se pri različnih vrstah razvili predvsem tisti sistemi zaznavanja, ki omogočajo preživetje v okolju, v katerem živijo – lahko gre za lociranje hrane ali zaznavanje prisotnosti plenilca. Signali iz okolja so lahko različna v valovanja in drugi mehanski dražljaji, fotoni ali vrsta zelo različnih molekul. Stik teh dražljajev z organizmom poteka s posredovanjem receptorjev, to so proteinske molekule, ki so večinoma vgrajene v membrano specializiranih (receptorskih) živčnih celic, redkeje pa gre za posebne epiteljske celice. Receptorji so sposobni vezavo signala, ki povzroči spremembo konformacije receptorja, posredovati v notranjost celice, ki nato v obliki živčnega impulza informacijo o okolju preko čutih živcev (senzoričnih nevronov) posreduje možganom.

Kar se na videz zdi kot en sam proces zaznavanja okolice, je v resnici sestavljeno iz dveh ločenih procesov: občutenje signala (od receptorja do možganov) [http://www.indiana.edu/~phys215/lecture/lecnotes/ns2_sensory/sensory.gif] in interpretacija signala - percepcija (v možganih), ki bo povzročila neko reakcijo na dražljaj [<http://www.bio.miami.edu/~cgallery/150/neuro/sensory.signaling.jpg>], lahko pa tudi samo informacijo o dražljaju, ki bo del celotne 'slike' okolja, v katerem smo. Možgani pri obdelavi informacije uporabljajo tudi podatke, shranjene v spominu.

Nekatera čutila so izredno občutljiva in zaznajo že prisotnost ene same molekule v okolju, druga pa se odzovejo šele, ko je koncentracija nekega dražljaja precej večja. Mutacije posameznega aminokislinskega ostanka v receptorju lahko povzročijo, da se signalna molekula nanj ne bo več mogla vezati, posledično pa se organizem na tak signal ne bo več odzival.

Živali so razvile širok spekter čutil, ki zaznavajo najrazličnejše signale, nekatere tudi zemeljski magnetizem (nekateri kiti in ptice selivke), polariziranost svetlobe (čebele) in obliko odbitega zvoka (eholokacija pri nekaterih delfinih in netopirjih). natančneje bomo obravnavali le tista čutila, ki so dobro razvita tudi pri človeku in preko katerih dojemamo okolje ljudi.

Razen receptorjev, ki zaznavajo dražljaje iz zunanjega okolja, imajo organizmi še vrsto znotrajceličnih receptorjev, ki sprejemajo signale o stanju v celici ali drugje v telesu. Ti se po vezavi tarčne molekule pogosto preselijo v celično jedro in v njem uravnavajo izražanje genov, proteini, ki se sintetizirajo, pa so osnova za odgovor celice na dražljaj.

Receptorske molekule, ki zaznavajo signale iz okolja, so najpogosteje transmembranski proteini. Veliko skupino predstavljajo takoimenovani 7TM-receptorji, ki so v biološko membrano vstavljeni preko 7 alfa vijačnic [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/3a/7TM_receptor.png]. Zaznavajo na primer svetlobo, barve in vonje. Drugačno zgradbo imajo nekateri ionski kanali, to so membranski proteini, ki so sposobni vezave določenih ionov, omogočajo pa tudi njihov selektivni vnos v celico ali izhod iz nje. Tako delujejo tudi receptorji za tip in sluh. Po vezavi signala na receptor pride do konformacijske spremembe, ki omogoči na notranji strani membrane vezavo proteinov, ki posredujejo signal do efektorskih molekul ali pa povzročijo fosforilacijo receptorja [npr.

<http://breast-cancer-research.com/content/figures/bcr919-2-l.jpg>]. Signaliziranje v celici je najpogosteje povezano s kaskado fosforilacijskih procesov, pri katerem sodelujejo protein-kinaze.

9.1. Molekulski mehanizmi vonjanja

Človek lahko vonja in med seboj razlikuje več tisoč različnih snovi. Značilnost vseh teh snovi je, da so kemijsko gledano relativno majhne hlapne organske molekule. Tista lastnost, ki daje neki snovi točno določen vonj, je predvsem oblika molekule, saj na primer človek drugače zazna R-karvon (iz mete) in S-karvon (iz kumine), čeprav gre le za zrcalni obliki iste molekule [<http://www.scielo.br/img/fbpe/jbchs/v13n6/13837f19.gif>]. Pomembna je torej oblika molekule, ki se veže na receptorski protein. Pri raziskovanju procesa vonjanja je bilo pomembno, da nekateri ljudje nekaterih vonjev ne zaznavajo (anozmijs). To je posledica mutacij v receptorjih za določene tipe molekul.

Receptorji za vonje so po svoji zgradbi 7TM-receptorji, ki kljub temu, da imajo enotno splošno zgradbo, lahko zelo natančno vežejo le majhno število zelo podobnih molekul ali pa eno samo. Receptorji so nameščeni na membranah celic vohalnega (olfaktornega) epitela na vrhu nosne votline [<http://www.iupucanatomy.com/images/Picture%201371.jpg>]. Površino na tem mestu sestavljajo epitelne celice in konci senzoričnih nevronov, ki se končajo z migetalkami [<http://www.iupucanatomy.com/images/Picture%201374.jpg>]. Prav na teh migetalkah so nameščeni receptorski proteini. Za odkrivanje molekularne narave teh receptorjev in mehanizma zaznavanja vonjev sta leta 2004 Richard Axel in Linda B. Buck dobila Nobelovo nagrado za medicino oziroma fiziologijo [http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2004/index.html].

Na ravni genov so našli več kot 1000 različnih receptorjev za vonj pri miših in podganah, pri človeku pa je teh genov pol manj, pa še od tega jih polovica ni funkcionalnih, saj evolucijsko njihova aktivnost ni predstavljal konkurenčne prednosti. Na ravni primarne strukture so si receptorji za vonj med seboj 30 – 60-odstotno identični. Velike razlike so predvsem v sestavi 4. in 5. transmembranske vijačnice, kar kaže na to, da je tu verjetno vezavno mesto za različne ligande.

Vsak olfaktorni nevron na svoji površini izraža samo enega izmed mnogih genov za olfaktorne receptorje – katerega, je verjetno povsem naključno. Posledica vezave liganda v vezavno mesto je sprožitev signalne kaskade, ki se konča s sprožitvijo akcijskega potenciala. Kaskada se začne z aktivacijo heterotrimerne G-proteina, ki ima v osnovi v svojo strukturo vezan GDP. Ob aktivaciji se GDP izmenja z GTP, to pa povzroči razpad trimera na podenoto alfa in kompleks podenot beta in gama. Podenota alfa se veže na membranski encim adenilat-ciklazo; ob njeni aktivaciji se začne sinteza cAMP iz AMP. Povečanje koncentracije cAMP v celici povzroči odprtje nespecifičnega kationskega kanala, ki omogoči vdor kalcijevih in drugih kationov v celico, zato se membrana depolarizira in sproži se akcijski potencial, ki potuje proti možganom [http://4.bp.blogspot.com/_DZH2cmCoois/RaPtFvow_4/AAAAAAAAAWE/VlwKwBF7x_Y/s1600-h/figure+9-43.jpg].

S poskusi so ugotovili, da se posamezna čista snov najpogosteje veže na več različnih receptorjev, a ne na vse enako močno. Vzorec aktivacije receptorjev za dve snovi, ki jo ločimo po vonju, je različen, snovi, ki za nas nimajo vonja, pa se ne vežejo na noben receptor dovolj močno, da bi lahko prišlo do sprožitve signala. Signali se prenesejo v možgansko regijo, ki jo imenujemo vohalni betič (*bulbus olfactorius*) [<http://universe-review.ca/l10-85-bulb.jpg>], od tam pa se procesirajo v različnih delih možganov, kjer nastane odgovor na zaznani vonj [http://www.insidestory.iop.org/images/mri_smell_top.jpg]. Vpogled v možgane nam omogoča funkcionalna magnetna resonanca (fMRI), ki zaznava področja s povečano aktivnostjo [<http://www.insidestory.iop.org/mri.html>]. Aktivni deli možganov imajo namreč bolj razširjene kapilare, ki lahko bolje preskrbujejo aktivne celice, zato v teh regijah najdemo več oksihemoglobina. Ko se na hemoglobin veže kisik, se železov center strukturno preuredi, kar se izraža tudi v magnetnih lastnostih: oksidiran železov center ni magneten, medtem ko deoksihemoglobin deluje kot magnet. NMR zaznava signale predvsem s protonov v molekuli vode, v prisotnosti magnetnega hemoglobina pa se signali spremenijo [<http://www.sinauer.com/neuroscience4e/animations1.1.html>].

Na osnovi mehanizma, ki učinkovito prepoznava mnoge hlapne snovi iz okolja, so pripravili 'elektronski nos', pri katerem so vlogo receptorja prevzeli polimeri ki se vežejo le na posamezne tipe molekul. Kombinacija signalov z različnih 'receptorjev' daje končen rezultat – identifikacijo neke snovi.

Zanimivost:

[Ali vonjate izovalerno kislino?](#) – Sandwalk – sprehod s skeptičnim biokemikom (blog Larrya Morana)

9.2. Molekulski mehanizmi okušanja

Okušamo lahko le pet različnih vrst snovi: grenke, sladke, kisle, slane in *umami* in znotraj vsake od teh petih skupin okusov ne moremo razlikovati. Različni 'okusi' hrane so tako v veliki meri posledica različnih vonjev, ne pa v resnici okusov.

Receptorji za okuse so nameščeni v membranah resic, ki štrlijo iz brbončic na površini papil na jeziku [<http://faculty.stcc.edu/AandP/AP/imagesAP2/sensation/taste.jpg>]. Resice so drobno nagubane strukture na površini čutnih nevronov, njihova membrana pa vsebuje veliko število različnih receptorskih molekul. Ista celica torej zaznava različne vrste okusov, kar je drugače kot pri zaznavanju vonjev, kjer vsaka celica zazna samo en tip molekul.

Različne okuse predstavljajo lahko zelo raznolike molekule, zato so tudi receptorji zanje precej heterogeni [http://www.unmc.edu/physiology/Mann/pix_4b/gust_chan.gif]. Za zaznavanje kislega in slanega so receptorske molekule najpogosteje ionski kanali, medtem ko ostale okuse zaznavamo z receptorji, ki so 7TM – zanje velja, da lahko vežejo bolj heterogene molekule kot ionski kanali.

Raziskave receptorjev za okuse so omogočile različnosti v okušanju med posamezniki (nekateri ljudje na primer propiltiouracil [<http://www.chemblink.com/structures/51-52->

[5.gif](#)] zaznajo kot izredno grenko snov, drugi pa je ne čutijo) v povezavi z genetskimi analizami ter lastnost nekaterih snovi, da spremenijo intenziteto okusa (amilorid [http://wpcontent.answers.com/wikipedia/commons/thumb/b/be/Amiloride_structure.svg/250px-Amiloride_structure.svg.png] zmanjša slanost jedi, ker se veže v strukturo receptorja za slano – ionskega kanala).

Soli in kisline zaznajo receptorski ionski kanali, glutamat (okus umami) pa poseben 7TM receptor, ki je zelo podoben tistemu, ki ga najdemo v membranah nekaterih živčnih celic. Glutamat namreč v zelo nizkih koncentracijah lahko nastopa kot živčni prenašalec (nevrotransmitter). Celice, ki sprejemajo signal preko glutamata, imajo v membranah receptorje tipa 7TM z zelo veliko (~600 ostankov) N-končno domeno, ki predstavlja visokoafinitetno vezavno domeno za glutamat. Na receptorjih v brbončicah manjka približno polovica N-končne regije, zato se glutamat veže s precej nižjo afiniteto in ravni glutamata, ki jih senzorske celice na jeziku zaznavajo, so okrog 1 mM.

Vezava molekul, ki sprožajo zaznavo različnih okusov, torej sproži neposredno depolarizacijo receptorske celice, če je receptor ionski kanal, ali pa sproži kaskado znotrajceličnih procesov, ki privedejo do depolarizacije membrane, kadar so receptorji tipa 7TM [http://163.178.103.176/Fisiologia/neurofisiologia/Objetivo_2/taste_files/tastebud.gif]. V tem primeru receptor posreduje signal posebnemu G-proteinu, ki se imenuje gustducin, ta pa aktivira fosfodiesterazo. Proces posredovanja signala še ni v celoti raziskan, kaže pa, da kot sekundarna prenašalca sodelujeta molekuli inozitoltrifosfata (IP₃) in diacilglicerola (DAG) [<http://openwetware.org/images/e/e2/Dag.gif>], v celicah pa so opazili tudi zmanjšanje koncentracije cikličnih nukleozidtrifosfatov, kar naj bi privedlo do depolarizacije. Signal potuje v možgane, kjer se procesira.

Zaznavanje pekoče hrane ne poteka preko receptorjev za okus, pač pa s posredovanjem mehanoreceptorjev.

9.3. Zaznavanje svetlobe in barv

Ljudje zaznavamo svetlobo z valovnimi dolžinami med 300 nm in 850 nm (barvni spekter od vijolične do rdeče), nekatere živali pa lahko tudi ožji ali širši spekter. Receptorske celice so v očesu razporejene v mrežnici, ki vsebuje več milijonov čepkov (ki zaznavajo barve) in okrog 100 milijonov paličic, ki zaznavajo (šibko) svetlobo, ne razlikujejo pa med barvami. Že en sam foton lahko sproži biokemijske spremembe na receptorju, signal pa pride do možganov, če receptorji sprejmejo vsaj 10 fotonov.

Končni deli paličic in čepkov vsebujejo diskaste membranske strukture, ki imajo v membrano vključene molekule opsina, v strukturo opsina [<http://webvision.med.utah.edu/imageswv/rhodopH.jpeg>] pa se kot prostetična skupina veže derivat vitamina A, 1-cis-retinal [<http://www.elmhurst.edu/~chm/vchembook/images/533vitAtocisretinal.gif>]. Skupaj oblikujeta molekulo rodopsina [http://www.mhl.soton.ac.uk/public/Main/research/projects/current/rhodopsin/rhodopsin_Xray.gif], ki jo imenujejo tudi vidni pigment. Retinal je v strukturo rodopsina vezan tako, da aldehidna

skupina retinala oblikuje Schiffovo bazo z aaminsko skupino stranske verige lizinskega ostanka 296 v sredini sedme transmembranske vijačnice molekule opsina [<http://www.ch.ic.ac.uk/vchemlib/mim/bristol/retinal/schiff.gif>]. Rodopsin najmočnejše absorbira svetlobo z valovno dolžino ~500 nm, kar ustreza spektru bele svetlobe, ki jo oddaja sonce. Opsin uvrščamo v skupino 7TM receptorjev in je bil prvi iz te skupine, ki so ga izolirali in mu določili kristalno strukturo, njegov gen pa je bil prvi, ki so mu določili nukleotidno zaporedje. Retinal je polien, v katerem se izmenjuje šestkrat ponovita dvojna in enojna vez, kar predstavlja ustrezno kemijsko osnovo za absorpcijo fotonov. V primeru rodopsina retinal predstavlja kromofor, skupino, ki je odgovorna za barvo kompleksa. Podobna je tudi zgradba rastlinskega barvila klorofila, ki omogoča zajetje svetlobne energije pri fotosintezi.

Pod vplivom svetlobne energije (fotona) se cis-retinal izomerizira v trans-retinal, pri čemer se dušik v Schiffovi bazi premakne za 5 Å glede na cikloheksanski obroč [<http://www.elmhurst.edu/~chm/vchembook/images/533cistransretinal.gif>]. Prosti retinal ima absorpcijski vrh pri 370 nm, vezan na lizin v opsinu in protoniran pa pri 440 nm ali višje. Dodatni stiki z opsinsko molekulo, predvsem verjetno bližina Glu-133 (iz 2. vijačnice), ki kompenzira naboj protonirane oblike kromofora, dvigne absorpcijski vrh na 500 nm. Izomerizacijo retinala si lahko predstavljamo kot atomski premik, ki je posledica delovanja svetlobne energije fotona. Zgodi se v nekaj pikosekundah, opsin z vezanim trans-retinalom pa se imenuje batorodopsin. Ta se preko več intermediatov v približno 1 milisekundi pretvori v metarodopsin II, pri katerem se Schiffova baza deprotonira, opsin pa se strukturno preuredi [<http://www.fz-juelich.de/isb/isb-1/datapool/page/24/Figure3.jpg>]. Metarodopsin II je analog ostalih 7 TM-receptorjev z vezanim ligandom in pritegne poseben G-protein, transducin [<http://www.med.ufl.edu/biochem/rcohen/transducin.JPG>], ki nato posreduje signal preko cGMP-fosfodiesteraze. Aktivira jo tako, da se veže na inhibitor tega encima. Fosfodiesteraza hidrolizira cGMP v GMP – s tem se zmanjša znotrajcelična koncentracija cGMP do take mere, da se ta molekula ne more več vezati v strukturo posebnega ionskega kanala, ki se zato zapre, posledica pa je hiperpolarizacija membrane, saj natrijevi (pa tudi kalcijeve) ioni ne morejo več vstopati v celico [<http://www.lfhk.cuni.cz/rezacovam/fototransmise/fototran3.jpg>].

Človek lahko zazna svetlobne signale, ki si vrstijo tudi do 1000-krat v sekundi, to pa je mogoče le, če se zaznavanje vsakega posameznega signala tudi dovolj hitro konča. Pri tem sodeluje vrsta dodatnih proteinov, med katerimi ima pomembno vlogo arestin, ki se veže na receptor in s tem preprečuje ponovno vezavo G-proteinu (transducinu) [<http://www.sinnesphysiologie.de/gruvo03/auge1/deact02.jpg>].

Barve zaznavamo s podobnimi receptorji kot so tisti za zaznavanje šibke svetlobe – 40 % aminokislinskih ostankov je identičnih. Pri človeku obstajajo trije različni opsinski receptorji za barve, ki najbolje zaznavajo modro (426 nm), zeleno (530 nm) oziroma rdečo (560 nm) svetlobo [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=gene&part=rgcb&rendertype=figure&id=rgcb.F1>]. Receptorja za zeleno in rdečo sta si med seboj zelo podobna, saj se razlikujeta le v 15 ostankih (od skupaj 364), hkrati pa sta dokaj različna v primerjavi z receptorjem za modro barvo (40 % ohranjenih aminokislinskih ostankov). Na ravni genov se rdeči in zeleni receptor razlikujeta v <2 % nukleotidov.

Pri ljudeh z barvno slepoto najpogosteje pride do sprememb v genih za receptorje za zeleno oziroma rdečo barvo. Gena sta v neposredni bližini na kromosomu X (receptor za modro barvo je na 7. kromosomu). Kaže, da se je rdeči receptor razvil s podvojitvijo in kasnejšimi mutacijami gena za zeleni receptor, kar se je zgodilo pred okoli 35 milijoni let. Zelo podobna nukleotidna zaporedja na kromosomu so bolj dovzetna za rekombinacijo, zato se lahko zgodi, da se podobne regije med pari kromosomov (kot na primer med mejozo v razvoju spolnih celic) izmenjajo - rekombinirajo. Če ta rekombinacija ni povsem natančna, lahko pride do povečanja števila kopij na enem kromosomu in do zmanjšanja števila kopij na drugem [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=gene&part=rgcb&rendertype=figure&id=rgcb.F4>]. V resnici ima 2 % ljudi na kromosomu X samo en gen za barvni receptor, 20 % jih ima dva gena, 50 % tri gene, 20 % štiri in 2 % pet ali več genov. Več genov pa ne pomeni tudi boljšega zaznavanja barv, saj sta aktiva vedno le prva dva, ostali pa se ne prepisujejo oz. prevajajo. Kar 8 % moških severnoevropskega porekla je slepih za vsaj eno območje barvnega spektra, najpogosteje za zeleno barvo in ti slabo razlikujejo med rdečimi in zelenimi barvnimi toni, saj njihovo zaznavanje temelji na razliki v signalu z rdečega in zelenega receptorja. Ženske so redko barvno slepe (0,5 % populacije), ker imajo dve kopiji kromosoma X, zato tudi v primeru, da imajo na enem zmanjšano število kopij ali okvaro gena, na osnovi drugega, neokvarjenega seta genov lahko proizvajajo receptorske proteine. Genetskih okvar, vezanih na kromosom X, je še več (tudi npr. hemofilija) in za vse velja enak princip: ženske lahko prenašajo okvarjene gene, a same redko zbolijo – zbolevalo največkrat moški potomci, ki podedujejo okvaro od enega od staršev.

9.4. Mehanizem zaznavanja zvoka

Čutila za zaznavanje zvoka uvrščamo skupaj s čutili za tip v skupino mehanoreceptorjev. Najpogosteje so po svoji zgradbi receptorske molekule ionski kanali, povezani s citoskeletom ali zunajceličnimi strukturami, kot so na primer dlačice pri žuželkah. Zaznavanje zvoka je pri večini živali tesno povezano z zaznavanjem gravitacije oziroma z ravnotežjem.

Zaznavo zvoka lahko definiramo kot pretvorbo energije valovanja zraka v živčne impulze. Vibracija zraka se v notranjem ušesu pretvori v vibracijo tekočine v ušesnem polžu. Ta doseže Cortijev organ [<http://www.kvarkadabra.net/pojavi/images/sluh4.gif>], kjer so na bazilani membrani nameščene čutne celice – dlačnice, ki se dotikajo tektorialne membrane nad njimi. Zaradi tlačnih valov tekočine v polžu bazilarna membrana niha, ta nihanja pa se prenesejo na dlačice na površini receptorskih celic. Te različno velike dlačice s sredico iz aktinskih filamentov so urejene v snop in so razmeščene ob stiku s tektorialno membrano, ki je fiksna. Ko dlačice zavibrirajo, se premaknejo najprej v eno smer in nato v drugo, to pa odpre (in nato ponovno zapre) ionske kanale in sproži akcijski potencial. Posamezne dlačice so vpete na membrano s proteini, ki so po zgradbi in delovanju podobni vzmetem, spadajo pa v skupino ankirinov [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/3a/Ankyrin_R_membrane-binding_domain_1N1.png], razen tega pa so s proteini povezane tudi med seboj.

9.5. Tip

Izraz 'tip' v povezavi s čutili je nekoliko zavajajoč, saj čutimo različne oblike pritiska, pa tudi raztezanje mišic. Pri raztezanju delujejo kot senzorijski mišični vretena, to so skupine vlaken, ki obkrožajo posamezne snope mišičnih celic. Vlakna so v resnici dendriti senzoričnih nevronov in se skrčijo, ko se skrči celica, to pa povzroči depolarizacijo na membrani in sprožitev akcijskega potenciala.

Tudi senzorijski za pritisk so posebej oblikovani dendriti živčnih celic in so pogosto umeščeni v kožno vezivo. Obstajajo različni tipi [<http://www.octc.kctcs.edu/gcaplan/anat/images/Image492.gif>], ki se razlikujejo po obliki in po tem, katere vrste signal najučinkoviteje sprejemajo. Eni se najmočneje odzivajo na rahle pritiske (Meissnerjeva telesca, ki so bolj pri površini), drugi le na močne pritiske in vibracije (Pacinijska telesca, ki so bolj v globini).

9.6. Bolečina in vročina

Za zaznavanje bolečine obstaja skupina receptorjev z imenom nociceptorji. Bolečino lahko zbudi vrsta različnih dražljajev: mehanski pritisk ali vbod, vročina, mraz ali kislina. So goli živčni končiči, ki se raztezajo v vse dele telesa in delujejo po različnih mehanizmih, torej v membrani vsebujejo različne tipe receptorskih molekul [<http://www.nature.com/nrc/journal/v2/n3/images/nrc747-f1.gif>].

Zaznavanje pekoče hrane in vročine posreduje posebna skupina receptorjev. Odkrili so jih, ko so preučevali, kako nastane pekoč občutek, ko ugriznete v feferon. Feferoni vsebujejo spojino kapsaicin [http://www.kalsec.com/images/capsaicin/capsaicin_mol_1.gif], ki se veže na receptor – kalcijev kanal. Enak tip receptorjev zaznava vročino, a različne podskupine različna temperaturna območja.

Občutek bolečine lahko nekatere snovi povečajo. Regulatorji vnetnih procesov prostaglandini [<http://medchem.rutgers.edu/MedChemII/graphics/pge1.png>] delujejo na tak način, da povečajo občutljivost nociceptorjev za signale, ki jih sprejemajo.

9.7. Povezovanje zaznave z odzivom

Ko možgani sprejmejo signal od receptorja po senzoričnem živcu, se nanj odzovejo. Odziv je lahko zelo preprost, na primer umik od preteče nevarnosti (torej krčenje gibalnih mišic), lahko pa kompleksen, na primer dobro počutje ob prijetni glasbi. Eden najpreprostejših primerov odziva na dražljaj je patelarni (pogačični) refleks: ko vas zdravnik rahlo udari pod kolenom, noga nezavedno zaniha navzgor. Receptorji (mišična vretena), ki so nameščeni tako, da obdajajo mišična vlakna [http://www.todayschiropractic.com/issues/archives/mar_apr_04/images/figure_4.jpg], zaznajo rahlo raztegnitev kite štiriglave stegenske mišice in signal po hrbtenjačnem živcu pošljejo v hrbtenjačo, odkoder odgovor potuje po motoričnem živcu v isto mišico, ki se skrči [<http://www.colorado.edu/intphys/>].

[Class/IPHY3430-200/image/13-7.jpg](#)]. Odgovor nastane vsega 30 milisekund po udarcu, tako hiter pa je, ker v tem primeru na poti do centralnega živčnega sistema ni nobene sinapse.

Vprašanja za razmislek:

- Ali rastline nimajo čutil? Kaj pa bakterije ali kvasovke? Kako se potem odzivajo na razmere v okolju?

Viri:

Učbeniki

Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, Lubert Stryer, Biochemistry, 5. izdaja. New York: W.H. Freeman & Co., 2001

Ricki Lewis, Bruce Parker, Douglas Gaffin, Marieëlle Hoefnagels, Life, 6. izdaja. New York: McGraw Hill, 2007

Neil A. Campbell, Jane B. Reece, Lisa A. Urry, Michael L. Cain, Steven A. Wasserman, Peter V. Minorsky, Robert B. Jackson, Biology, 8. izdaja. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings, 2008
