

## ZAPISKI GENETIKA POMEMBNO

Genetika se ukvarja s proučevanjem raznolikosti organizmov, proučuje mutacije in sisteme prenosa genskih informacij. Z genetiko raziskujemo strukture in delovanje genov v različnih organizmih preko analize biološke raznolikosti.

Genetika je uporabna, ker z njo lahko razumemo dedovanje iz roda v rod in način delovanja genov. Na podlagi teh spoznanj lahko zmanjšamo pogostost oz. prekinemo določeno neuporabno lastnost, vedno bolj pa napredujemo tudi pri hitrejšem odkrivanju različnih bolezni, kar omogoča učinkovitejše zdravje (npr. BRCA geni). S poznavanjem dedovanja lahko izboljšuje npr. določene rastline in živali (vedno bolj tudi razvitejše organizme), da ima npr. kuzu daljše, bolj močne korenine, steblo krajše, plod pa spet velik, da od nje dobimo čim več semen s čim manjšo porabo (vode idr.). Prav tako z genetiko spoznavamo delovanje človeka.

Izraz genetika prvi uporabil William Bateson l.1909. Še tri leta prej predlaga genetiko kot novo področje biologije.

Mendel J.G. (1822-1884; 1856 prvič objavil rezultate svojih eksperimentov) iz:

[http://mss.svarog.si/biologija/MSS/index.php?page\\_id=11284](http://mss.svarog.si/biologija/MSS/index.php?page_id=11284)

Ugotovil je, da obstajajo diskretne enote (faktorji), ki nosijo informacijo od staršev na potomce. Za svoje eksperimente je izbral grah, nezahtevno enoletno rastlino z dobro vidnimi lastnostmi. Opazoval je enostavne in različne lastnosti, kot so velikost rastline, barva cvetov in plodov ter oblika semen in plodov. Med seboj je križal tiste rastline graha, ki so se razlikovale v posamezni lastnosti. Mendel je rezultate križanj spremljal več let in na podlagi dobljenih rezultatov postavil preprosto teorijo o dedovanju lastnosti iz generacije v generacijo.

1. *Mendlov zakon ali zakon o enakosti (uniformnosti) križancev v F1 generaciji.* Ugotovil je, da po vsakem križanju dveh čistih linij (P generacije) nastane F1 generacija, ki je sestavljena iz potomcev z enakimi lastnostmi. Na podlagi tega je sklepal, da je ena od lastnosti dominantnejša nad drugo (tista ki se vedno izrazi – npr. vijolična). Da so čiste linije homozigoti in da v F1 generaciji dobimo heterozigote (osebke z različnimi aleli za opazovano lastnost).
2. *Mendlov zakon ali zakon o razdvajanju znakov v F2 generaciji.* Ugotovil je, da se genotipi rastlin F2 generacije pojavljajo v razmerju 1:2:1 (homozigot, heterozigot, recesivni homozigot), razmerje genotipov pa vedno 3:1 (dominantni vs recesivni).
3. *Mendlov zakon ali zakon o neodvisnem razporejanju alelov.* Po tem ko je Gregor Mendel preučil rezultate svojih križanj, je prišel do zaključka, da se aleli za različne lastnosti v gamete razporejajo neodvisno drug od drugega. Trdil je, da se lahko alel za neko lastnost (v našem primeru za obliko semena) pridruži kateremukoli alelu za neko drugo lastnost (v našem primeru barvo semena).

**Punnetov kvadrat** prikazuje možne razporeditve alelov v spolne celice (gamete) med mejozo ter možne načine združitve alelov starševskih osebkov pri oploditvi (fertilizaciji). Je način prikaza nastanka gamet in genotipov posameznih generacij. Omogoča nam določiti genotipe in tako tudi fenotipe osebkov novih generacij. Prav tako nam omogoča predvideti pogostost pojavljanja posameznih genotipov in fenotipov osebkov v novih generacijah. Kako pogosto se pojavijo določeni genotipi in fenotipi je preverljivo s poskusi. Večje število testiranih rastlin je vključenih v poskus, bolj so dobljeni rezultati približani napovedim Punnetovega kvadrata.

## Testno križanje

Ali lahko za rastlino graha z izraženim dominantnim fenotipom za neko lastnost (v našem primeru vijolična barva cvetov) z zagotovostjo trdimo, kakšen genotip ima? Glede na to, da vemo, da je lahko rastlina graha z vijoličnimi cvetovi genotipsko dominantni homozigot (BB) ali pa je heterozigot (Bb) za opazovano lastnost, je odgovor na zgornje vprašanje, ne. Kako pa ugotoviti, kakšen genotip ima rastlina z vijoličnimi cvetovi? Ker vemo, da je organizem, ki navzven kaže recisivni fenotip (beli cvetovi), recisivni homozigot (v našem primeru bb), ga uporabimo pri t.i. testnem križanju. **Testno križanje** je križanje rastline z neznanim genotipom, ki izraža dominantni fenotip, z rastlino z znanim genotipom, ki izraža recisivni fenotip. Na podlagi rezultatov testnega križanja lahko sklepamo, ali je organizem z neznanim genotipom dominanten homozigot ali je heterozigot za opazovano lastnost.

**Monohibridno križanje** – spremljanje dedovanja le ene lastnosti

**Dihibridno križanje** – opazujemo prenos dveh lastnosti v naslednje generacije. Mendel je na svojih grahkih ugotovil, da se genotipske lastnosti pojavijo v razmerju 9:3:3:1. Ta pojav je posledica neodvisnega razvrščanja (3. Mendlov zakon) in prekrižanja kromosomov.

Ko so se spet začeli ukvarjati z Mendlom (okoli leta 1900) je to vplivalo na državne in genetske reforme – evgenika (Galton), rasizem, nacizem...

- 1928 spoznajo evkromatin in heterokromatin (Heitz), transformacija DNA (Griffith)
- 1944 DNA kot osnova genetske informacije (Avery)
- 1952 geni so iz DNA (Hershey & Chase), poznajo plazmide, transdukcijo s fagi, odkrijejo 1. okvarjen encim pri človeku
- 1953 znana je struktura molekule DNA! (Watson in Crick)
- Genetski kod (aminokislina) je določen v letih 1963-1966.
- 1970-73 kloniranje genov
- 1975-77 analiza DNA, sekvenciranje
- 1983 transformacija rastlin
- 1987 transformacija živali
- 1990-2000 genomski projekti
- 2000- razvoj -omike (genomika, transkriptomika, proteomika in bioinformatika, sistemska biologija)

Vsak organizem ima genom, v katerem je so zapisane biološke informacije. Osnovni elementi sistema dedovanja informacij so GENI. Izraz je uvedel Wilhelm Johannsen 1909, ko je proučeval dedovanje pri fižolu. Geni so na kromosomu linearno nanizani, vsak gen ima svojo pozicijo in strukturo. Informacije v genih so zapisane s serijo nukleotidov. Specifično zaporedje nukleotidov določa katera beljakovina bo nastala kot končni produkt. Zbirko genov v organizmu predstavlja GENOM.

GENOM. Poznamo jedrni, mitohondrijski, pri rastlinah še kloroplastni. Shranjuje biološke informacije. Njegovo delovanje je odvisno od koordiniranih aktivnosti encimov in drugih proteinov, ki sledijo seriji kompleksnih biokemijskih reakcij (ekspresija genoma). Glavni produkt te ekspresije je TRANSKRIPTOM (vse RNA molekule), proces pa imenujemo TRANSKRIPCija.

PROTEOM je sekundarni produkt transkripcije genoma, gre za nastanek proteinov preko procesa TRANSLACIJE. Z omenjenimi procesi in njihovo povezavo se ukvarja SISTEMSKA BIOLOGIJA. Filmček: [https://www.youtube.com/watch?v=41\\_Ne5mS2ls](https://www.youtube.com/watch?v=41_Ne5mS2ls)

#### NASTANEK ŽIVLJENJA:

Polimerizacija gradnikov v biomolekule je najbrž potekala v oceanih ali pa jo je povzročila ponavljajoča se kondenzacija suhih delcev in vode v oblakih. Ko se je fosfolipidski dvosloj združil (ratal mehurček) je bil kar naenkrat prostor, ki je bil ločen od ostalega okolja in s tem dobil neko zaščito in avtonomijo delovanja.

**Malo izven:** Endosimbiotska teorija je ena izmed teorij nastanka večceličnih organizmov in predpostavlja, da da so prvotni enocelični heterotrofni organizmi s svojim telesom kot ameba zaobjeli (po principu fagocitoze) preproste predjedrne (prokariontske) avtotrofe in jih 'vključili' v lastno telo. Celica jih ni uničila, temveč ohranila. Tako strokovnjaki razlagajo obstoj energijskih organelov kot so kloroplasti in mitohondriji v celicah pravojedrnih (evkariontskih) organizmov. Teorija je sicer bolj komplicirana.

Potem so se polinukleotidi in polipeptidi morali na nek način sodelovati, da se je razvil biokemijski sistem s sposobnostjo samoreplikacije. Polinukleotidi določajo nastanek beljakovin in se lahko replicirajo, vendar za to reakcijo potrebujejo pomoč beljakovin. Beljakovine se sami po sebi ne morejo replicirati, so pa nujno potrebne za katalizo biokemijskih reakcij. Največji napredek pri razumevanju začetka življenja je bil leta 1980, ko so odkrili, da ima molekula RNA katalitično aktivnost:

- 1) ima sposobnost rezanja molekul (izrez intronov, nekateri virusni genomi)
- 2) ima sposobnost razreza drugih RNA molekul (RNaza P)
- 3) ima sposobnost tvorbe peptidnih vezi.

V epruveti so sintetične RNA molekule pokazale še druge aktivnosti:

- sinteza ribonukleotidov,
- sinteza in kopiranje RNA molekul,
- prenašanje na RNA vezane AK do naslednje AK s formacijo dipeptida (primer tRNA in sinteza proteinov).

Vse te ugotovitve so potrdile, da je celoten biokemijski sistem slonel na molekuli RNA (Prva živa celica je imela za osnovo RNA)

#### Nastanek DNA:

1. Razvoj proteinskih encimov: ti so zamenjali in nadomestili katalitične aktivnosti riboencimov.
2. Zakaj je prišlo do tranzicije iz RNA v proteine? Z 20 AK je bila večja kemijska variabilnost v primerjavi s 4 ribonukleotidi v RNA. Prav tako so

reakcije, ki jih usmerjajo proteini bolj učinkovite zaradi fleksibilnosti polipeptidov (3D struktura) v primerjavi z rigidnostjo polinukleotidov.

Protogenomi so postali kodirajoče molekule katerih glavna funkcija je bila katalitična aktivnost. Nastanek DNA je bil nekako logičen pojav, saj je molekula DNA stabilnejša:

- redukcija ribonukleotidov je povzročila nastanek deoksiribonukleotidov (redukcija 2'-OH), ki se lahko polimerizirajo v kopije RNA protogenoma s pomočjo encima reverzna transkriptaza.
- Zamenjal se je tudi uracil s svojim derivatom (timin).
- DNA je kot dvojna veriga bolj stabilna, omogočeno je delovanje popravljalnih mehanizmov, ki odstranjuje napake, ki nastajajo pri kopiranju komplementarne verige...

Genomi so imeli več posameznih molekul. Vsaka DNA molekula je kodirala en gen/protein, kasneje pa so se posamezne molekule povezale skupaj in nastal je kromosom. Vsak kromosom je dolga molekula DNA in geni so funkcionalne regije na molekuli DNA.

DNA je odkril Johann Friedrich Miescher (1869). Ugotovil je, da je DNK kislina, bogata s fosforjem in da so posamezne molekule zelo velike. Strukturo DNK sta leta 1953 ugotovila Watson&Crick.

Poskusi, ki dokazujejo, da je dedni material DNK in ne proteini kot so mislili pred tem:

- 1) princip transformacije:

Griffith (1928);

Imamo R sev (bakterije, ki nimajo zaščitnega ovoja, zato umrejo zaradi imunskega sistema miške, miška pa preživi) in S sev (bakterije, ki ta zaščitni ovoj imajo, zato jih imunski sistem ne more uničiti in preživijo, miška pa umre). Če S sev toplotno obdelamo izgubi ta zaščitni ovoj (s segrevanjem se proteini uničijo), imunski sistem jo lahko uniči in miška preživi. Če pa ta toplotno obdelan S sev združimo z R sevom, ugotovimo, da se R sev spremeni (transformira) v S sev, saj miška umre. To, kar omogoča to spremembo, je DNK. Da je to res DNK so dokazali tako, da so prvič dali poleg teh dveh sevov zraven še encime, ki uničujejo proteine in rnk molekule (proteaze in ribonukleaze), drugič pa encime, ki uničujejo DNK molekule (deoksiribonukleaze). V prvem primeru so miške umrle, v drugem pa ne, kar pomeni, da brez DNK (ker jo je uničil encim) ni prišlo do te transformacije iz R v S sev in tako je miška bakterijo lahko uničila.

Griffith je rezultate interpretiral kot transformacijo; substance iz toplotno uničenih bakterij so spremenile nevirulentni tip R v virulentni tip S. Kasneje so Griffithsovi študenti pokazali, da je ta transformacija tudi dejansko nastala. Avery (1944) je menil, da je ta substanca DNA, DNA je genetski material!

Avery, Macleod in McCarty (1944)

so dokazali, da je DNK aktivni dejavnik transformacijskega principa in da se lahko genetske informacije spremenijo. Ugotovili so, da visoka temperatura ni uničila DNA virulentnega seva bakterij. Del kromosoma, ki vsebuje gen, odgovoren za sintezo kapsule (plašča) se je lahko sprostil iz seva S in se prenesel v sev R. Ko se je S gen vključil v R celice, so se te spremenile (transformirale) v S celice. Tako so R celice pridobile virulenco S celic oziroma so se transformirale v S celice.

2) Harshey-Chase eksperiment (1952) sta zagotovila nove dokaze, da je DNK res genetski material.

Predpostavljala sta, da virus, ki uničuje bakterije (bakteriofag) z vključitvijo v bakterijsko celico prenaša svoj material, da se lahko virus nadalje razmnožuje. Ugotovila sta, da je ta material, ki prenaša informacijo, DNK. Odločila sta se, da bosta označila ločeno DNA in protein z radioaktivnimi izotopi, da bi lahko ločeno spremljala 'materiala' ob okužbi. Ko sta bakterije okužila, sta jih še premešala in centrifugirala, da so lažji in prazni ostanki bakterije ostali na površju, bakterije pa ostale na dnu. Ugotovila sta, da je spodaj ostalo 70% DNK materiala (označen z radioaktivnim fosforjem) in le 20% proteinov.

!!! James Watson in Watson Crick - 1953 - na podlagi ugotovitev različnih raziskovalcev sta povezala in ugotovila strukturo DNK - dvojna vijačnica.

Pri razvoju modela molekule DNA sta se Watson in Crick oprijemala predhodnih znanstvenih spoznanj in tekočih raziskav kolegov:

-osnovni gradniki DNA: fosfat, deoksiriboza in baza (adenin, citozin, gvanin, timin) sestavljajo nukleotid.

-razmerje baz v DNA; Erwin Chargaff: predstavil empirično pravilo o količini posamezne baze v DNA: Razmerje količin pirimidinskih nukleotidov (T+C) je vedno enako purinskih nukleotidov (A+G). Količina timina (T) je identična količini adenina (A), količina (C) pa je enaka količini (G)

-analiza uklanjanja X žarkov pri DNA molekuli; Rosalind Franklin; DNA je heliksne oblike, DNA je sestavljena iz ponavljajočih se enot, enote so med seboj oddaljene 0,34 nm. Je dvojni heliks z antiparalelnimi verigami, fosfatna hrbtenica je na zunanji strani.

## STRUKTURA DNK

Nukleotid: Fosfat+sladkor (pentoza - 2'deoksiriboza)+ baza (a,t,c,g). Med nukleotidi je fosfodieterska vez.

CITIZIN in TIMIN imata en obroč: PIRIMIDINI  
ADENIN in GVANIN imata dva obroča: PURINI

DNA ima 2 konca:

5' konec - fosfatni

3' konec - hidroksilni.

Sinteza oz. polimerizacija poteka vedno v smeri 5' proti 3'. Nov nukleotid se veže na 3. C koncu obstoječega polinukleotida.  $\beta$  in  $\gamma$  fosfatne skupine se odstranijo kot pirofosfatne molekule. Vse naravne polimeraze imajo sposobnost delovanja v smeri 5' proti 3'.

Dvojna vijačnica je desno orientirana, heliks je stabiliziran:

1. Parjenje baz, ki so povezane z H vezmi (A in T ter C in G), vez je dokaj šibka, vloga v vijačnici je stabilizacija sekundarne strukture proteina.

2.  $\pi$ - $\pi$  interakcija vključuje hidrofobično interakcijo med sosednima baznima paroma in dodaja stabilnost dvojnemu heliksu, ko sta vijačnici že združeni skupaj preko vezi baz.

## 2. predavanje: RNK IN TRANSKRIPTOM

Inicialni produkt ekspresije genoma je TRANSKRIPTOM, skupek molekul RNA, ki nastanejo iz genov, ki kodirajo (določajo) protein, ki ga celica v nekem trenutku potrebuje. Proces imenujemo TRANSKRIPCija.

Molekula RNA je podobna DNA, vendar ima 2 pomembni kemijski razliki:

1. Sladkor v RNA je RIBOZA (v DNA deoksiriboza)

2. RNA vsebuje URACIL namesto TIMINA

Molekula RNA ima prav tako 3'-5' fosfodiesterske vezi, ki pa so šibkejše zaradi posrednega vpliva OH na 2. C atomu v ribozi.

Molekule RNA običajno niso daljše od nekaj tisoč nukleotidov, večinoma so enoverižne.

Encimi, ki omogočajo prepis DNK v RNK so od DNK odvisne

**RNA polimeraze**. Encimatska reakcija omogoča sintezo molekule RNA, sekvenca nukleotidov na matrici DNA določa sekvenco RNA. Ribonukleotidi se dodajajo en za drugim na 3' koncu RNA transkripta.

Pg je oznaka picogram: merska enota, ki predstavlja 10<sup>-12</sup>g.

Ena bakterija vsebuje 0,05-0,10 pg RNA, kar predstavlja 6% njene celotne teže. To pomeni, da je povprečna bakterijska

celica težka med cca. 0,83-1,667pg □. Človeška celica pa je težka cca. 2000-3000pg, kar je 2-3ng. (\*10<sup>-9</sup>g)

## Vrste RNA

Osnovna delitev RNA molekul **kodirajoče in nekodirajoče RNA**.

**Kodirajoča:** informacijska RNA (mRNA = messenger RNA), transkripti genov, ki kodirajo protein, sledi translacija v protein v drugi fazi ekspresije genoma. Običajno je je v celici le 4 % celokupne RNA, ima kratko življenjsko dobo, kmalu po sintezi se razgradi. (bakterijska RNA nekaj minut, pri evkariontih nekaj ur)

**Nekodirajoče / funkcionalne RNA:** produkti se ne sintetizirajo v protein, imenujemo jih funkcionalne, ker imajo esencialno vlogo pri procesih v celici (procesiranje molekul, prenos informacij od DNA do proteina,...).

1. **Ribosomalna RNA (rRNA):** v največjih količinah, v vseh celicah, 80 %, so komponente ribosomov, kjer poteka sinteza proteinov.

2. **Prenašalna RNA (tRNA = transfer RNA):** prenašajo AK k ribosomu in zagotavlja, da se AK vežejo skupaj v zaporedju, ki ga določa nukleotidno zaporedje mRNA.

3. **Mala jedrna RNA (snRNA = small nuclear RNA ali U-RNA),** nahajajo se v jedru evkariontov. Te molekule imajo vlogo pri združevanju (splicing) eksonov.

4. **Mala nukleolarna RNA (snoRNA = small nucleolar RNA),** najdena v nukleolarnih strukturah v evkariontski celici. Imajo pomembno vlogo pri kemijski modifikaciji rRNA molekul. Procesiranje RNA molekule.

5. **Mikro RNA (miRNA = micro RNA)** regulacija ekspresije genov

6. **Kratka interferenčna RNA (siRNA = short interfering RNA);** ohranja popolnost genoma, preprečuje razmnoževanje virusov in širjenje transpozonov na druge kromosomske lokuse. Zadnji dve vrsti so majhne molekule, ki sodelujejo pri regulaciji ekspresije posameznih genov.

## Procesiranje prekurzorske RNA (preRNA)

mRNA je zrela molekula. Njena predhodnica pri evkariontih je prekurzorska – preRNA. Te molekule morajo čez niz reakcij, ki privedejo do nastanka zrele mRNA. Procesiranje omogoča, da postane RNA funkcionalna.

### PROCESIRANJE

- **Modifikacija koncev:** doda se gvanozin na 5' in adenin na 3' mRNA.

- **Povezovanje eksonov in izrezovanje intronov**, gre za proces izrezovanja določenih segmentov iz pre-mRNA. Pri evkariontih obstajajo interni segmenti, ki ne vsebujejo bioloških informacij = INTRONI, ki se nahajajo znotraj EKSONOV, ki pa informacije vsebujejo. Introni so tako odstranjeni iz pre-mRNA z izrezovanjem in združevanjem segmentov, kjer je do izreza prišlo. Nezdružene pre-mRNA oblike jedrne RNA se imenujejo tudi heterogena jedrna RNA (angl. heterogenous nuclear RNA = hnRNA).
- **Dogodki izrezovanja**: pomembni pri procesiranju rRNA in tRNA. Pre-rRNA in pre-tRNA morajo biti najprej razrezane v manjše segmente, da se lahko sintetizirajo zrele RNA molekule. Značilno za prokariote in evkarionte.
- **Kemijske modifikacije**: tRNA, rRNA, mRNA. rRNA in tRNA dobijo nove kemijske skupine, ki dodajo specifične nukleotide. Procesu pravimo tudi RNA popravljanje (angl. RNA editing), ki je značilen za evkarionte.

**PROTEOM**, druga faza ekspresije genoma

Drugi produkt ekspresije genoma je PROTEOM. Proteini nastanejo s procesom TRANSLACIJE mRNA molekul. Struktura proteinov: protein je nerazvejan, linearni polimer, njegove monomerne podenote imenujemo AMINOKISLINE. Polimer ali polipeptidi so običajno sestavljeni nekje do 2000 enot.

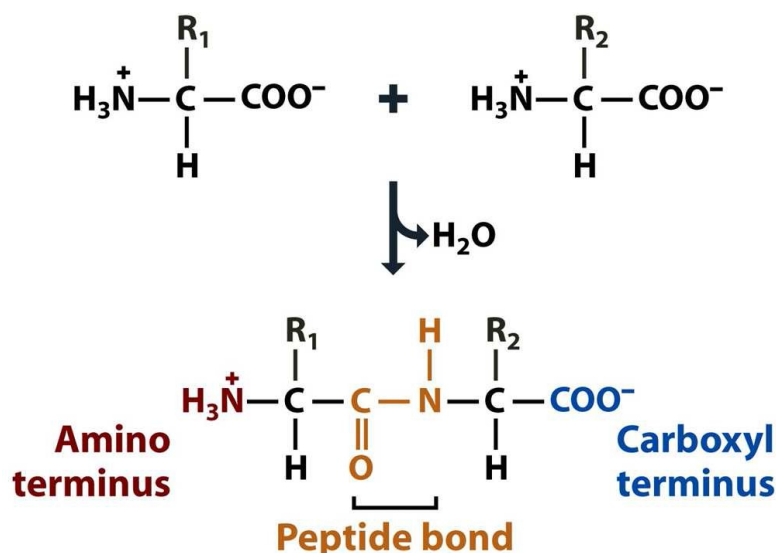


Figure 1-15 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

Raznolikost aminokislin določa raznolikost proteinov

- Proteini so funkcionalno različni (sestavljani iz različnih AK)
- Različno zaporedje AK rezultira v različni kemijski strukturi, zaporedje AK določa katere reaktivne skupine bodo na površini, kar določa kemijske značilnosti proteina



- Raznolikost AK izhaja iz R skupine.
- Proteini so sestavljeni iz 20 AK
- R so lahko preproste skupine npr. en H atom (glicin) ali metilna skupina (CH<sub>3</sub> v alaninu). R so lahko bolj kompleksne skupine (aromatske npr. fenilalanin, triptofan, tirozin).
- Večina AK nima naboja, 2 sta negativno nabiti (aspartinska in glutaminska kislina), 3 so pozitivno nabite (arginin, histidin, lizin).
- Nekateri AK so polarne (glicin, serin, treonin), druge nepolarne (alanin, levcin, valin).

20 aminokislin določa genski kod.

Aminokislina so povežejo med seboj med translacijo mRNA.

Med procesiranjem proteina lahko pride do sprememb AK z dodajanjem novih kemijskih skupin, npr. acetilacija ali fosforilacija.

## Proteom

- Proteom vsebuje proteine v celici v določenem času.
- Tipična jetrna celica pri sesalcih vsebuje od 10 do 20 tisoč različnih proteinov, okrog  $8 \times 10^9$  molekul (0,5 ng proteina ali 18-19% celotne teže celice). Kopije posameznih proteinov so različne (manj kot 20.000 do 100 mio). Pri analizi proteinov so ugotovili, da se nekateri v celici ponavljajo, pravimo jim **housekeeping proteini, ki so pomembni za splošne biokemijske reakcije v celici.**

### **Vez med transkriptomom in proteomom**

Kako iz DNA nastane RNA ni težko razumeti, težje je bilo ugotoviti kako iz mRNA nastane protein.

- Leta 1950 je bil izpostavljen t.i. informacijski problem. Nanaša se na genetski kod, ki določa protein (zaporedje nukleotidov mRNA določa zaporedje aminokislin, ki sestavljajo protein).
- 1950: kodon (triplet baz) določa aminokislino.
- Če bi bile le 2 bazi, potem bi bilo  $4^2 = 16$  kodonov, kar ne zadostuje za 20 AK, 3 baze dajo  $4^3 = 64$  kodonov. Ugotovili so, da različni kodoni določajo isto aminokislino. Samo triptofan in metionin imata edinstven kodon, ostale AK so določene z 2, 3, 4, 6 kodoni.
- Iz teh izsledkov so določili, da je genetski kod degeneriran.
- Določili so tudi kodone, ki določajo začetek in konec transkripcije.

## Iniciacijski in terminalni kodoni

- **Iniciacijski / START kodon:** triplet na mRNA kjer se prične transkripcija:

5'-AUG-3' (določa tudi metionin),

5'-GUG-3,

5'-UUG-3'.

- **Terminalni / STOP kodon:** zaključek transkripcije:

5'-UAG-3',  
5'-UAA-3',  
5'-UGA-3'.

## Genetski kod ni univerzalen

- Genetski kod naj bi bil enak za vse organizme, vendar ni čisto tako, obstajajo deviacije. Nazoren primer predstavlja mitohondrijski genom.
- skupina raziskovalcev v Angliji je ugotovila (Sanger et al., 1979), da mt mRNA človeka vsebuje 5'-UGA-3', ki je običajno terminacijski kodon, sicer pa je ta kodon tudi za triptofan...
- Tudi pri jedrni DNA nižjih evkariontov so poznana odstopanja predvsem pri terminalnih kodonih.

**Biološka informacija, ki jo določa genom ima končno ekspresijo v proteinu, katerega biološke značilnosti so determinirane s prostorsko organizacijo kemijskih skupin.**

Funkcionalnost proteoma:

- 1) Encimi so posebni proteini, ki katalizirajo metabolne poti za sintezo proteinov, OH, lipidov.
- 2) Struktura na nivoju celice določa citoskelet, je primarna funkcija ekstracelularnih proteinov. Primer je kolagen, vezivno tkivo
- 3) Gibanje, omogočajo ga kontraktilni proteini, primeri aktin, miozin v citoskeletnih vlaknih
- 4) Transport, primer hemoglobina, ki transportira kisik, serum albumin, ki transportira maščobne kisline.
- 5) Regulacija celičnih procesov; signalni proteini STAT (signal transduction and activators of transcription), aktivatorji, ki določajo nivo ekspresije genov, gre pretežno za hormone, citokini (primer inzulin, hormon, ki regulira vsebnost sladkorja v krvi)...
- 6) Zaščita organizma; protitelesa..
- 7) Založna funkcija: primer feritin, zaloga železa v jetrih,..

TESTNI ORGANIZMI V RAZISKAVAH:

Bakteriofag  $\lambda$ , pritrjen na okuženo E. coli.;

Neurospora, ki raste na zažganem deblu po gozdnem požaru;

Arabidopsis thaliana L.; navadni repnjakovec: 1. Rastlina, pri kateri je bilo določeno celotno nukleotidno zaporedje.

Caenorhabditis elegans (Sekvenca genoma je bila objavljena leta 1998, dokončno 2002.)

### **PREDAVANJE 3\_4 PROGRAMI GENETSKIH RAZISKAV**

Pomembno vlogo ima tudi okolje, ki vpliva na delovanje in ekspresijo genov:

- Model 1: genetska determinacija; geni in okolje določajo fenotip (migracija Afričanov v ZDA: kljub menjavi okolja se barva kože ne spremeni kar pomeni, da geni nadvladajo okolje, podobno srpasta anemija )
- Model 2: okoljska determinacija (enojajčna dvojčka v različnih okoljih)
- Model 3: interakcija genotip-okolje (mušica v različnih T).

**Razlika med genotipom in fenotipom:** genotip je esencialna lastnost posameznega organizma, ki **ostane fiksna** čez celotni življenjski cikel, razen v primeru redkih mutacij v celicah. **Fenotip se skozi življenje spreminja.**

RAZVOJNI ŠUM ('developmental noise'): skupek naključnih dogodkov v razvojnem obdobju osebkov, ki vodijo v variabilnost fenotipov.

Interakcije genov, okolja in šuma določajo v kakšen fenotip se bo razvil genotip. Vsak organizem se razvija po fazah in je vedno v stiku z okoljem. Interakcije enega razvojnega obdobja, določajo dogodke v naslednjem razvojnem obdobju.

## Napredna genetika –začne iz fenotipa

- S proučevanjem genov se ukvarja t.i. 'forward' genetika, ki poskuša celostno razrešiti biološko informacijo. Z napredno genetiko iščemo genetske razlike, ki povzročajo fenotipske razlike.
- Proučevanja se začnejo z raziskavo enega samega gena (mutanta) in končajo z detajlno analizo celice vključno z biokemijskimi procesi.
- Najprej se lotimo genomike, da identificiramo gene za neko biološko informacijo, nato induciramo mutanta tega gena, sledi fenotipska analiza mutanta in molekulska analiza gena.

Zadnja faza napredne genetike je karakterizacija DNA variant alelov (genov).

- DNA sekvenca, razlike v strukturi, zaporedju, funkciji, količini in lokaciji metabolno aktivnih molekul
- Nekatere spremembe na DNA lahko zaznamo s spremenjenim proteinom.

## Molekularna osnova albinizma

- Normalna varianta: jedro melanocita; A gen za tirozinazo konvertira tirozin v pigment melanin
- Varianta Aa, A normalen in producira dovolj tirozinaze, da lahko pride do konvercije v melanin, zato so fenotipi 'normalni'.
- Varianta aa, oba gena mutirana, nista sposobna tvoriti produkta, zato se albinizem fenotipsko izrazi.

## REVEZNA GENETIKA – začne iz genotipa (s proučevanjem DNK)

Z osvojenim znanjem o molekuli DNA, načinu kako DNA kodira informacije za sintezo aminokislin in proteinov ter znanjem o delovanju celice, se je razvila še ena možna veja proučevanja razlik med posamezniki: REVERZNA GENETIKA.

## METODE V GENETIKI

Za proučevanje genov in njihove aktivnosti so na voljo različni pristopi:

1. **Odkritje mutacije**, ki vpliva na biološki sistem

2. **Analiza potomcev kontroliranih križanj** med mutanti in normalnimi osebki. Na ta način identificiramo gene in njihove alele, lokacijo na kromosomu in vzorec njihovega dedovanja.

3. **Genetska analiza biokemijskih procesov** v celici. Osnovni pristop sloni na tem, da proučimo kemijo celice in spremembe, ki nastanejo zaradi mutacije in tako iz vrednotimo vlogo gena.

4. **Mikroskopija**: proučimo strukturo kromosomov, označujemo gene in njihove produkte, da jih lahko vizualiziramo.

5. **Direktna analiza DNA**. Izolacija in koloniranje genov, določanje nukleotidnega zaporedja (sekvenciranje), določitev strukture gena in njegovo funkcioniranje.

Citogenetika se ukvarja s strukturo in morfologijo kromosomov. Uporabljajo različne tehnike barvanja kromosomov in uporabljajo se hibridizacijske sonde za detekcijo kromosomskih regij, ki jih preučujejo.

genomika, ki proučuje strukturo, delovanje in evolucijo celotnega genoma.

**KOMPARATIVNA ALI PRIMERJALNA GENOMIKA** opisuje razlike in podobnost med genomi različnih vrst, ki so v določeni meri lahko podobni.

Del genomike predstavlja **BIOINFORMATIKA**, ki temelji na računalniški analizi informacij, ki so zapisane v genomu.

## ENCIMI

**Ligaza** – ima sposobnost vezave molekul. Potrebna je E. Sticky-end ligation is more efficient

Od matrice odvisna **DNA polimeraza** – sintetizirajo ali razgradijo molekule DNK. Omogočajo sintezo v smeri 5' priti 3'. Če pride do napake, omogoča proofreading: odstrani napake in doda pravilne nukleotide. To se dogaja od 3' do 5' (eksonukleazna aktivnost). 3' 5' eksonukleazna aktivnost je manj pogostejša, vendar jo imajo določene DNA polimeraze katera glavna funkcija pri replikaciji genoma zahteva, da so sposobne odstraniti del nukleotidov, ki so se že prijeli na matrično verigo, ki jo polimeraza kopira. Pri pomnoževanju uporabimo termostabilno DNA polimerazo (od ene termofilne bakterije, naša je manj)

**Primer** – molekula, ki se veže na del DNK molekule in tako določa, kje se bo začel prepis, torej kateri del se bo prepisal.

**Reverzna transkriptaza:** Od RNA odvisna DNA polimeraza omogoča nastanek DNA kopij RNA molekul, ki so v tem primeru matrica. V molekularni genetiki lahko s pomočjo RT mRNA molekule privedemo v DNA kopijo. Te kopije imenujemo komplementarna DNA (cDNA). Pomembno pri kloniranju genov in tehnikah, s pomočjo katerih se določa pozicijo na genomu za specifično mRNA molekulo. Reverzna transkriptaza se vključuje v replikacijske cikle retrovirusov (npr. HIV).

## NUKLEAZE

So lahko specifične (samo za DNK ali RNK)..

**Endonukleaza** – cepijo molekulo znotraj nje s prekinitvijo fosfodiesterских vezi

**Eksonukleaza**- odstrani nukleotide na koncih DNK

**Restriksijska endonukleaza:** pomembna v rekombinantni DNK tehnologiji. Vežejo se na DNA molekuli na specifičnem zaporedju in naredijo rez dveh verig na ali blizu tega specifičnega zaporedja. Pomembno pri kloniranju genov.

Sticky vs. Blunt ends. Dodajanje linkerjev ali adapterjev, ki se vežejo na tope konce molekulskega segmenta. Da dobimo sticky end. Adapterji vsebujejo poznano zaporedje za restriksijske endonukleaze in tako lahko izdelamo lepljive konce, če uporabimo določeno restriksijsko endonukleazo.

**Alkalna fosfotaza** omogoča preoblikovanje koncev molekulskega segmenta. Iz 5' konca odstrani fosfatno skupino, kar prepreči, da bi se ta molekula lahko povezala s kakšno drugo. Tako usmerja delovanje ligaze.

**T4 polinukleotidna kinaza** omogoča preoblikovanje koncev molekulskega segmenta. Na 5' konec dodaja posfatne skupine, da lahko ligaza deluje. (Ravno obratno od alkalne fosfotaze).

## Vektorji za kloniranje

Plazmid: ima replikativno sposobnost, ki omogoča kloniranemu genu, da se razmnožuje znotraj celice gostitelja

- Ori.: origin of replication
- Primer vektorja pUC8 (1980): ori in dva gena, 2,7kb
- Gen za rezistenco na ampicilin; bakterije, ki imajo ta vektor so torej odporne na ampicilin, zato je to selekcijski marker, da lahko ločimo kolonije, ki so ali niso odporne.

PCR – polymerase chain reaction

Verižna reakcija s polimerazo (PCR) je bila razvita sredi osemdesetih. S tehniko kopiramo kratke segmente DNA. V 4 urah dobimo cca. Milijon kopij določene sekvence gena.

Kako med vsemi molekulami opazujemo specifične? Najlažje s pomočjo sond. Sonde imajo določeno nukleotidno zaporedje, ki je komplementarno zaporedju na makromolekuli, zato se lahko nanjo vežejo. Skupek molekul inkubiramo s sondo, ki je označena (radioaktivno, fluorescentno).

Northern blot – postopek za označevanje molekul RNK (za sondo uporabimo kloniran gen)

Southern blot - postopek za označevanje molekul DNK (za vezavo se uporabi kloniran gen)

Western blot - postopek za označevanje proteinov ( za vezavo uporabimo protitelesa ali antigene)

## TRANSMISIJSKA GENETIKA

Področje genetike, ki se ukvarja s proučevanjem dedovanja – prenosa bioloških informacij, lastnosti od staršev na potomce. Proučuje mehanizme, ki vključujejo prenos genov iz ene generacije v drugo.

## Mednlovaska genetika – principi dedovanja

Samoprašitev – da se sami med sabo

Testno križanje – križamo z recesivnim homozigotom

### Mendlova odkritja iz poskusov križanja graha

1. Dedni faktor je GEN. Gen je potreben za pigmentacijo.
2. Vsaka rastlina ima po en par genov.
3. Gen ima dve obliki / alela; Y rumena barva, y zelena barva
4. Rastlina je lahko genotipsko: Y/Y, Y/y, y/y.
5. Y/y; Y dominira nad y (recesiven), fenotip je rumen.
6. Pri mejozi se posamezen član genskega para enakomerno porazdeli v gamete, 1. Mendlov zakon, Zakon o enakomerni porazdelitvi
7. Posamezna gameta ima samo enega člana genskega para.

8. Po oploditvi se gamete v zigoto združijo naključno, ne glede na to katere alele nosijo.

Recipročno križanje: In [genetics](#), a **reciprocal cross** is a breeding experiment designed to test the role of parental sex on a given inheritance pattern.<sup>[4]</sup> All parent organisms must be [true breeding](#) to properly carry out such an experiment. In one cross, a male expressing the trait of interest will be crossed with a female not expressing the trait. In the other, a female expressing the trait of interest will be crossed with a male not expressing the trait.

Poleg recesivno-dominantnega dedovanja poznamo tudi nepopolno dominantno in kodominanco.

**Nepopolna dominantna Fenotip** je intermediaren med dvema homozigotnima oblikama. (iz rdeče in bele dobimo rozno) - nagelj

**Kodominanca** – Heterozigot fenotipsko pokaže obe homozgotne oblike (AB0 pri krvnih skupinah)

1. Mendlov zakon: zakon o segregaciji (cepljenju) lastnosti: aleli se v gamete razporedijo naključno, če gre za dedovanje ene lastnosti. Mendlov zakon: zakon o neodvisni segregaciji. Genski pari, ki so ločeni na različnih kromosomih, segregirajo ločeno od ostalih parov genov (lastnosti). To pomeni, da imajo lahko gamete različne kombinacije genov. Pari alelov se v gamete razporedijo naključno. Aleli gena A se dedujejo neodvisno od alelov gena B. 2. Mendlov zakon: različni genski pari se v gamete razporedijo neodvisno. Mendlova pravila potrjena 1900. leta. Nekateri genetiki so bili skeptični glede 2. Pravila dedovanja. Kmalu so vedeli, da so geni locirani na kromosomu in da imajo organizmi več genov na kromosomu. Ob tem je postalo jasno, da se nekateri geni dedujejo skupaj, ker so na istem kromosomu. Gre za princip **vezanega dedovanja. Nekateri geni so delno vezani, kar pomeni, da se enkrat dedujejo skupaj, drugič posamezno, itd.**

## Delno vezano dedovanje

- **Bateson, Saunders, Punnett**, 1905; poskus na grahu. Križali so rdeče cvetove z okroglim pelodom in vijola cvetove s podolgovatim pelodom.
- V F1, vsi potomci vijola, podolgovat pelod (dominantni lastnosti).
- Križanja potomcev F2, niso dobili razmerja 9:3:3:1, ki je značilno, če so geni na različnih kromosomih, oziroma 3:1, če so geni vezani.
- Neobičajno razmerje, ki so ga dobili je posledica delno vezanih genov.

Pri mejozi pride do crossing-over – rekombinacija. Odkril Janssens 1909.

Sturtevant predpostavi, da je CO naključen. Če to drži, potem bosta gena, ki sta na kromosomu dovolj skupaj manjkraj ločena s co, kot gena,

ki sta daleč narazen. Merimo lahko frekvenco rekombinacije, ki je dejansko merilo oddaljenosti dveh genov. Iz tega lahko izdelamo gensko karto, se pravi določimo relativno pozicijo genov na kromosomu.

Rekombinacijske vroče točke so točke, kjer pogosteje pride do CO. Razdalje na genetski karti niso čisto vedno enake razdaljam na fizični karti.

## ODSTOPANJA OD MENDLOVEGA DEDOVANJA

### Spolni kromosomi

- Avtosomni, 'navadni' kromosomi sestavljajo genomski set
- Spolni kromosomi: večina rastlin in živali izraža dimorfizem
- Spol je na *Drosophila* proučeval Morgan 1900. leta. *Drosophila* ima 3 avtosomne kromosome in 1 spolni kromosom, XX ženska, XY moški.
- Diecične rastline imajo na ločene moške in ženske cvetove na različnih rastlinah
- Monoecične rastline imajo enospolne cvetove na isti rastlini.

### HUMANA GENETIKA

AVTOSOMNO RECESIVNE BOLEZNI (cistična fibroza, anemija srpastih eritrocitov, albinizem)

AVTOSOMNE DOMINANTNE BOLEZNI (pritlikavost, brahidaktilija, polidaktilija, Hunting's, ...)

RECESIVNO SPOLNO VEZANO DEDOVANJE (vezano na X kromosom) barvna slepota, hemofilija

DOMINANTNO SPOLNO VEZANO DEDOVANJE (sindrom testikularne feminizacije)



## 5\_7 PREDAVANJE

### INTERAKCIJE GENOV – POLIGENI

V primerih, ko obstaja interakcija genov, govorimo o **POLIGENIH** ali o **LOKUSIH S KVANTITATIVNIMI LASTNOSTMI** (QTL: quantitative trait loci). Poligeni so razporejeni po genomu, velikokrat na različnih kromosomih, zato se dedujejo neodvisno.

Razumevanje poligenškega delovanja je velik izziv genetikov v 21. stoletju. Pri človeku npr. gre za razumevanje visokega pritiska (hipertenzija), bolezni arteroskleroze... Pomembno je razumevanje, njihovo dedovanje in funkcioniranje.

Vpliv genov je lahko aditiven, kar pomeni, da se učinki seštevajo. Vpliv genov je lahko tudi naddominanten, kar pomeni, da vsak alel prispeva ločen učinek in kombinacija obeh alelov ima še večji učinek, kot na primer aleli v homozigotnem stanju.

Barva paprike je določena z interakcijo več genov.

**Pleiotropizem genov** En gen lahko vpliva na več različnih lastnosti (npr. pri miših: Alel  $A_y$  ima efekt na dve lastnosti: Barvo kožuščka in smrt organizma, rumeno barvo povzroči v eni dozi, smrt v dveh dozah.)

Na molekularnem nivoju geni delujejo preko serije kemijskih reakcij, vsak korak kontrolira produkt gena. Geni so lahko med seboj povezani, med njimi vlada interakcija.

- **Biosinteza:** nastajajo esencialne molekule s serijo kemijskih reakcij, ki jih katalizirajo encimi (so produkti kodirajočih genov)
- **Transdukcija/prenos signala:** prenaša 'navodila' iz npr. okolja (kemijski signal, hormon) po organizmu. Ti signali aktivirajo celične proteine, ki lahko aktivirajo druge proteine in na koncu regulatorne proteine, da lahko pride do transkripcije genov.
- **Razvojne poti:** kontrolirajo jih geni, ki so odgovorni za rast in diferenciacijo v organizmu.

**Primer: barva las pri človeku.** Pokazali smo vse tri prej omenjene reakcije: melanocit mora diferencirati v razvojni poti, melanin se tvori s sintezo, pretvorba feomelanina v eumelanin pa zahteva signalno transdukcijo, ki jo povzroči hormon.

#### INTERAKCIJA ALELOV ENEGA GENA: OBLIKE DOMINANCE

Dominanca je tip interakcije med aleli enega samega gena pri heterozigotu. Interakcija alelov je lahko med normalnimi in mutiranimi aleli (+/m) ali pa med dvema mutiranimi aleli ( $m_1/m_2$ ). Obstaja več vrst dominanc, vse predstavljajo različne tipe interakcije med aleli.

**POPOLNA DOMINANCA IN RECESIVNOST** (npr. fenilketonurija; fenil piruvična kislina se nabira in povzroča mentalno zaostalost)

Lahko se spremeni ena ali več AK, kar inaktivira encim.

#### DOMINANTNE MUTACIJE

- Normalna oblika alela ni zadostna, ena kopija normalne oblike ne zadostuje za nastanek produkta.

Na primer za normalno funkcioniranje gena je potrebnih 16 enot, en alel prispeva 10. V normalnem stanju bo 20 enot produkta zadostovalo za reakcijo, če pa je en alel okvarjen, bo produkta le 10, kar ne zadostuje za normalno reakcijo, gre za **DOMINANTNO MUTACIJO** (povzroči nefunkcionalnost proteina). Ničelna mutacija s kombinacijo normalnega alela bo sproducirala  $0+10=10$  produkta, kar je pod zahtevo za produkt (16 enot). Heterozigot (normalen/ničeln) je mutant in mutacija je dominantna.

#### **Dominantne, negativne mutacije;**

polipeptidi takih genov delujejo kot **kvarilci**, genski produkti so homodimerični proteini, sestavljeni iz dveh podenot istega tipa. Heterozigot +/M: okvarjen protein se veže na normalnega in ga tako uniči. Lahko tudi zamaskira delovanje heterodimera.

Primer: Dominantna mutacija gena za kolagen povzroča fenotip *osteogenesis imperfecta* (bolezen krhkih kosti). Kolagen je vezivno tkivo, protein sestavljen iz 3 monomerov (trimer). Pri mutiranem heterozigotu okvarjen protein odene enega ali dva normalna in ga tako uniči.

**NEPOPOLNA DOMINANCA** opisuje stanje fenotipa v heterozigotnem stanju, ki je vmesno med dvema homozigotoma v kvantitativni skali. Vsak alel k izražanju lastnosti doprinese določeno količino proteina-produkta. V tem primeru gre za pigment: dve dozi (rdeča), ena doza manj (roza), brez doze (bela).

**KODOMINANCA** Je še ena oblika dominance, pri kateri se v heterozigotnem stanju izrazita oba alela (AB0 skupine).

#### **ANEMIJA SRPASTIH ERITROCITOV:**

V heterozigotnem stanju  $Hb_A$  proizvede dovolj delujočega hemoglobina, kar preprečuje anemijo.

**Glede na obliko krvničk pa gre za nepopolno dominanco, saj so pri heterozigotu prisotne tudi srpaste celice. Glede na hemoglobin, lahko rečemo, da je prisotna tudi kodominanca.** Alela  $Hb_A$  in  $Hb_S$  kodirata 2 različni obliki hemoglobina, ki se razlikujeta v eni sami aminokislini ter se pri heterozigotu tvorita obe. A in S obliko lahko ločimo z elektroforezo, ker imata različen naboj.

## INTERAKCIJA GENOV 2

**RECESIVNI LETALNI GENI:** aleli, ki povzročajo propad orgaanizma. Primer: rumena barva kožuha pri miših.

Geni kontrolirajo kemijske procese v celici.

- 20.stoletje, **Archibald Garrod**, fizik, je to domnevo potrdil. Ugotovil je, da številne recesivne bolezni pri človeku povzročajo napake v metabolizmu. Proučeval je bolezen AKU alkaptonurija (bolezen črnega urina).

### Biosinteza pri *Neurospori*

- George Beadle in Edward Tatum, 1940 **sta razjasnila vlogo genov in dokazala interakcijo genov v biokemijski poti.** Za delo sta prejela Nobelovo nagrado, z njunim delom se pričinja obdobje molekularne biologije.
- Delala sta na haploidni glivi *Neurospori* s ciljem, da ugotovita genetsko kontrolo sinteze kemijskih spojin v celici. Obsevala sta celice *Neurospore*, da bi povzročila mutacije in jih nato testirala v celični kulturi. Odkrila sta številne mutacije. Nekateri mutanti so potrebovali hranila, da se je lahko sprožila sinteza, kar je pomenilo, da so bili nekateri koraki v procesu okvarjeni.

Hipoteza: 1gen=1encim

**Epistaza** se pojavi takrat, ko mutiran alel enega gena zamaskira delovanje mutiranega alela drugega gena in namesto tega se fenotipsko izrazi sam. Primer: • Pasma *Labrador retriever*. Rumena barva je recesivna

epistaza.

- Alela **B** (črna) in **b** (rjava) producirata črn in rjav melanin. Na drugem genu se nahaja še alel **e**, ki preprečuje pigmentacijo, zato so psi zlate barve, alel **E** pa dovoljuje pigmentacijo.

*Mutirani aleli supresorji* preprečujejo ekspresijo mutiranih alelov drugih genov, rezultat je normalna oblika fenotipa.

- Modifier mutacija na drugem lokusu spremeni ekspresijo mutiranega gena na prvem lokusu.

## TESTNO KRIŽANJE

Testno križanje izvajamo, ko želimo določiti genotip na določenem lokusu za neko lastnost. Ko ne ločimo dominantnega homozigota od heterozigota, kako ugotoviti ali je osebek homozigot (AA) ali heterozigot (Aa)? Rešitev je, da naš osebek križamo s staršem (TESTER), ki je homozigot z recesivnimi aleli, torej aa. Če homozigot aa ni na razpolago, potem izvedemo samooprašitev. Če je bil naš osebek heterozigot Aa, pričakujemo potomce v razmerju 3:1.

## ORGANELNI GENOMI

- Za organelne genome je značilno citoplazmatsko dedovanje, ki je popolnoma neodvisno od dedovanja jedrnega genoma.
- Mitohondriji in kloroplasti so specializirani organeli, ki se nahajajo v citoplazmi. Vsebujejo krožne kromosome, ki vsebujejo gene za produkcijo energije (mitohondrij) in gene za fotosintezo (kloroplasti).
- Posebnost organelnih genov je, da se nahajajo v velikem številu kopij v celici. Vsaka celica vsebuje 100 ali 1000 organelnih kromosomov.
- DNA v organelih je včasih 'pakirana' v suborganelno strukturo NUKLEOID.

## Vzorci dedovanja organelne DNA

- Potomci dedujejo organelne gene samo od enega starša. V večini primerih po materi.

Zakaj po materi? Organelni genomi so locirani v citoplazmi in moške in ženske gamete ne prispevajo enakopravno k citoplazmi v zigoti. Pri jedrnih genomih oba starša prispevajo k zigoti, pri organelnih pa prispeva jajčna celica.

## Fizične lastnosti organelnih genomov

- MtDNA prisotna pri vseh evkariontih
- CpDNA prisotna pri vseh fotosintetsko aktivnih evkariontih
- Prvotno je bilo mišljeno, da gre za krožno molekulo, z el. mikroskopijo so ugotovili tako linearno (? fragmenti krožne) kot krožno strukturo.
- Razlike med organizmi; ekstremni primer morske alge dinoflagele; kloroplastni genom je organiziran v združenih krožnih molekul, vsaka molekula vsebuje en sam gen. Linearne mt genome imajo *Paramecium*, *Chlamydomonas*, nekatere kvasovke...

## Segregacija citoplazme

- V nekaterih primerih imajo celice mešanico mutiranih in normalnih organelov (heteroplazmoni).
- Pri takih celicah lahko zaznamo segregacijo citoplazme v različnih delih v hčerinske celice.
- Rastline so najboljši primer, v veliko primerih imamo opravka z mutacijami kloroplastnih genov, ki kontrolirajo sintezo pigmentov (klorofila).
- Klorofilne mutacije so letalne, obstajajo rastline s pisanimi (zeleno-belimi) listi.

Mutirani aleli povzročijo odsotnost klorofila v kloroplastih, del lista ali cel poganjek je bel. Velikokrat imamo opravka z mozicizmom. Materine gamete v času cvetenja določajo barvo listov pri potomcih: *če je jajčna celice iz rastline z zelenimi listi, bodo vsi potomci zeleni, ne glede na to iz kje izhaja pelod*

## Mutacije citoplazme pri človeku

- Nekateri rodovniki kažejo dedovanje redkih bolezni samo po ženski liniji in nikoli po moški. To nakazuje na citoplazmatsko dedovanje mtDNA.
- MERRF bolezen (myoclonic epilepsy and ragged red fiber) povzroča mutacija substitucije ene same baze v mtDNA. Bolezen prizadene

mišičevje, simptomi se kažejo tudi na prizadetosti oči in sluha.

- Kearns-Sayre sindrom (prizadetost vida, srca, mišic, možganov) je posledica izgube (delecije) dela mtDNA.

## Vsebina organelnih genomov

- Vsi mtDNA vsebujejo gene za nekodirajočo tRNA in nekaj proteinov, ki so komponente respiratorne verige. Nekateri genomi vsebujejo kodirajoče tRNA, ribosomalne proteine in proteine, ki se vključujejo v transkripcijo, translacijo in transport drugih proteinov v mitohondriju in citoplazmi.
- Večina cpDNA vsebuje set 200 ali več genov, ki kodirajo rRNA in tRNA, ribosomalne proteine in proteine, ki so vključeni v fotosintezo. Običajno vsebujejo več genov kot mitohondrijski genom.
- Za mitohondrijske genome ne velja Mendlovsko dedovanje (tudi za kloroplastne ne). Mitohondrijski genom se deduje po materi in se prenese na vse potomce ne glede na spol.
- Analiza populacije je lažja, sledimo materini liniji (rodovniku).
- Mitohondrij akumulira mutacije 10x hitreje, zato pričakujemo večji polimorfizem.
- Ker se ne rekombinira, enostavneje sledimo mutacijskim spremembam v primerjavi z jedrnim genomom.
- Analiza mtDNA je izredno pomembno orodje v forenzičnih primerih (primer družine Romanov).

## 8. PREDAVANJE: KROMOSOMI

Kromosomi se med seboj ločijo glede na pozicijo **centromere** in glede na dolžino **kromatid**. S tehniko barvanja kromosome

ločimo. Vloga centromere: nanjo se med mitozo oprime delitveno vreteno.

Vloga **telomer**:

- 1) Zaščita koncev kromosomov pred nuklezami
- 2) Preprečevanje združevanja koncev kromosomov
- 3) Z mehanizmom replikacije telomer preprečiti krajšanje kromosomov

1970: Raziskave biokemije in elektronske mikroskopije. Vedeli so, da je jedrna DNA povezana s proteini, ki se prilegajo na DNA - HISTONI.

**Kromatin**: DNA-histonski kompleks (DNA, ki je ovita okrog histona) in je zavarovana pred nukleazo. Dolgi so (cca.) 146bp.

**Nukleaze** so encimi, ki režejo molekulo DNA na poziciji, kjer le ta ni zaščiten s proteinom. (endonukleaze, eksonukleaze)

**Nukleosom**: struktura, sestavljena iz 8 histonskih proteinov. Ti skupaj tvorijo sodčasto obliko - jedrni oktamer na katerem je DNA dvakrat zavita.

Linkerji histoni so vezani na vsak nukleosom, skupaj tvorijo KROMATOSOM. delujejo kot sponka, ki preprečuje, da bi se zavita DNA izvila s proteinskega jedra.

**Vsak kromosom v nukleusu zaseda svoj 'teritorij'**

- Odkrili z barvanjem kromosomov, hibridizacija s sondo
- Kromosomi so med seboj ločeni z nekromatinskimi regijami znotraj katerih se nahajajo encimi in proteini, ki se vključujejo v ekspresijo.

Pod mikroskopom vidimo temna in svetla območja kromosoma - temna predstavlja **heterokromatin**, kjer je DNA z relativno kompaktno organizacijo. Poznamo **konstitutivni heterokromatin**, stalno strukturo celice, ki predstavlja DNA z malo ali brez genov in je vedno v kompaktni obliki. Sem spadata tudi centromera in telomere, prav tako večino Y kromosoma. **Fakultativni heterokromatin** pa ni permanentna struktura. Vsebuje gene, ki so inaktivirani v nekaterih celicah ali v določenem obdobju celičnega cikla. Npr. drugi X kromosom pri ženskah. (Ko pa so aktivni, so kompaktni.) **Evkromatin** predstavlja manj kompaktna območja DNA, kjer imajo ekspresijski proteini dostop do genov.

**Kariotip vs. Kariogram:**

Karyotypes describe the number of chromosomes, and what they look like under a light microscope. Attention is paid to their length, the position of the centromeres, banding pattern, any differences between the sex chromosomes, and any other physical characteristics. The preparation and study of karyotypes is part of cytogenetics.

The study of whole sets of chromosomes is sometimes known as karyology. The chromosomes are depicted (by rearranging a microphotograph) in a standard format known as a karyogram or idiogram: in pairs, ordered by size and position of centromere for chromosomes of the same size.

POSEBNOSTI KROMOSOMOV:

**Minikromosomi:** relativno kratke dolžine z veliko gostoto genov.

**B-kromosomi:** dodatni kromosomi, ki jih imajo posamezniki v populaciji. So dokaj običajni pri raslinah, glivah, insektih, nekaterih živalih. Nastanejo kot posledica neobičajnih dogodkov, njihova funkcija pa še ni čisto razjasnjena.

**Holocentrični kromosomi:** nimajo ene centromere, ampak multiplo strukturo vzdolž dolžine.

DNA, ki se nahaja na mestu centromere in telomere ima posebne značilnosti, ki so povezane z delovanjem teh struktur (Centromere: CDEI, CDEII, CDEIII)

Telomere: sestavljena iz 5'-TTAGGG-3' s kratkim podaljškom na koncu dvojne verige. Sem se vežeta TRF1, ki pomaga regulirati dolžino telomere in TRF2, ki ohranja podaljševanje enojne verige. Če ra ni aktiviran, potem podaljševanje ni mogoče in dva polinukleotida se vežeta skupaj s kovalentno vezjo. Brez telomer bi bili kromosomi nestabilni in bi se lahko združili z drugimi kromosomi v dicentrično obliko ali v prstan.

**Problematika replikacije koncev linearne DNA**

Nova DNA se lahko sintetizira samo v 3' smer, nezapolnjen žep nastane na 5' novo sintetizirane dvojne vijačnice, ko se RNA odstrani. Tako ostane enojna veriga, nestabilna DNA. V naslednjih ciklih celične delitve, bi tako nova veriga postajala vse krajša in krajša kar pelje do izgube funkcionalno pomembnih genov in celične smrti. Zato na koncu pride ena RNA in doda zaporedje, da se zaključi še to.

Organizacija genov v jedrnem genomu:

Primer človeškega kromosoma 12, analiza 50 kb:

1) 4 geni: PKP2 (plakofilin 2), SYB1 (membranski protein), FLJ10143 (funkcija?), CD27 (celična smrt)

2) 88 genomskih pogosto ponavljajočih zaporedij: LINE (long interspersed nuclear elements), SINE (short interspersed nuclear elements), LTR (long terminal repeat), DNA transpozoni.

3) 7 mikrosatelitov

4) 30 % od 50 kb je negenskih, neponavljajočih, enojnih kopij DNA brez poznane funkcije.

Iz te delitve je vidno, da je le malo takega zaporedja, ki ima neposredno vlogo kot jo ima gen. Natančnejša analiza je pokazala, da eksoni, ki vsebujejo biološko informacijo predstavljajo 4745 bp (9,5% celotne dolžine). Vsi eksoni pri človeku so dolžine 48 Mb, le 1,5 % celotnega zaporedja.

Genome-wide repeats oz. Mobilne sekvence: LINEs, LTR elements, SINEs, DNA transpozoni.



bolj kompleksni evkarionti imajo manj kompaktne genome. Na splošno velja: večji genomi so manj kompaktni.

Človek ima 30 000-40 000 genov. Zaradi alternativnega splicinga, ko se eksoni iz pre-mRNA reorganizirajo, tako da en gen določa več proteinov.

Večina genov kodira proteine, 2.500 različne funkcionalne RNA, skoraj četrtnina protein kodirajočih genov je vključenih v ekspresijo, replikacijo in ohranjanje genoma, 21 % pa določa komponente signalne transdukcije, ki regulirajo ekspresijo genoma. 17,5% genov določa splošne biokemijske reakcije, ostali so vključeni v aktivnosti kot so transport v in iz celice, imunski odziv, sintezo strukturnih proteinov (mišice, skelet),...

## GENSKE DRUŽINE

**Multigenske družine** so skupine genov z identično ali zelo podobno sekvenco in so pogoste pri številnih genomih. Imajo skupen ancestralni gen. (npr. imamo 2000 genov za 5S rRNA, vsi na kr. 1, ker so komponente rRNA potrebne v velikih količinah.

Nekatere družine so **kompleksne multigenske družine**, ki kodirajo podobne, a ne identične proteine, ki pa imajo drugačno funkcijo (npr. hemoglobin  $\alpha$  in  $\beta, \epsilon$ ).

Nekateri geni se izrazijo v različnih razvojnih obdobjih.

## PSEVDOGENI:

Psevdogeni, pri globinu, so geni, ki niso dolgo aktivni. Psevdogeni so v bistvu nefunkcionalne kopije gena. So evolucijski ostanek.

- **navadni psevdogeni**: gen, ki je inaktiviran zaradi mutacije, spremembe sekvence. Mutacija lahko privede do nefunkcionalnosti gena, s časom tak gen postane genski ostanek, kjer se akumulirajo nove mutacije.
- **Procesiran psevdogen**: ni ostanek evolucije, temveč je posledica dodatne abnormalne genske ekspresije. Nastane iz mRNA kopije gena pri sintezi cDNA, ki se vključi v genom. Ker je kopija mRNA, ne vsebuje intronov, prav tako nima zgornje sekvence, ki je pomembna za začetek ekspresije, kar pomeni, da je tak gen nedelujoč.

- Okrnjeni geni (truncated genes): preostanek evolucije, odsotnost večjega ali manjšega dela na enem delu gena.
- Fragmenti gena: kratke, izolirane regije iz notranjosti gena.

Ponavljajoča (repetitive) DNA v evkariontskem genomu: Cca. 62% genoma naj bi bilo intergenskega. To so deli, ki ležijo med geni in nimajo poznane funkcije. Rečemo tudi **junk DNA**. Velikokrat je ta sestavljena iz ponavljajočih se zaporedij. Delimo jih na **pogosto ponovljive sekvence**, ki so navidezno razpršene po genomu in **tandemsko ponavljajoča DNA**, ko se enote nizajo ena za drugo. Veliko se je nahaja na centromerah, kjer imajo strukturno vlogo in drugod.. Posamezen genom vsebuje različna tandemsko zaporedja z različnimi dolžinami, enote, ki se ponavljajo so lahko dolge manj kot 5 bp pa vse do 200 bp. Tudi satelitna DNA: poznamo **mikrosatelite** in **minisatelite**. **Minisateliti** so klastri, daljši od 20kb z enoto 25bp. Povezani so s strukturnimi lastnostmi kromosoma. **Mikrosateliti** so krajši, do 150kb, enota motiva do 13bp; so zelo variabilni. Nahaja se blizu telomer, vloge pa še ne poznajo? VNTR: Variable Number or Tandem Repeats. STR: Short tandem repeats; SSR: Simple sequence repeats. Polimorfizem mikrosatelitov: Velik polimorfizem je posledica spremembe v številu ponovitev osnovnega motiva, za kar sta odgovorna predvsem dva mehanizma, ki se po verjetnosti dopolnjujeta:

- i) **Model SSM (Slip strand mispairing)** Model nepravilnega parjenja zdrsnjenih verig med replikacijo DNA predvideva mutacijo, ki jo povzroči zdrs DNA v kompleksu s polimerazo, kar povzroči nekomplementarnost matrične in nove sintetizirane verige. Če popravljali mehanizmi DNA polimeraze napake ne odpravijo, ostane poravnava obeh verig nepravilna. Taka veriga se hitro izvije iz vijačnice, kar bo ob naslednjih replikacijah spremenilo dolžino, kar se kaže v nastanku ali izgubi ponovitev.
- ii) **Model UCO (Unequal crossing-over)** nastane kot rezultat rekombinacije med homolognima kromosomoma, ki nista bila popolno poravnana. Če so prisotni mikrosateliti je dogodek bolj verjeten.

Mutacijska stopnja vseh mikrosatelitskih lokusov ni enaka.

Dognano je bilo, da na njen nivo vplivajo:

1. število ponovitev
2. nukleotidno zaporedje osnovnega motiva,
3. dolžina ponavljajoče se enote,
4. DNA zaporedje obrobnihih regij,
5. prekinitve v mikrosatelitu,
6. stopnja rekombinacije in transkripcije.

Glede na tip ponovitve osnovnega motiva, Chambers in MacAvoy (2000) predlagata naslednjo razdelitev mikrosatelitov:

- popoln mikrosatelit[1] je sestavljen iz enega samega motiva baz, ki se tandemsko ponavlja in ni prekinjen z nobeno drugo bazo, npr.  $-(AC)_{14}$ ;
- popoln in prekinjen mikrosatelit[2] ima osnovni motiv prekinjen z insercijo enega nukleotida ali več baznih parov, ki so različni od osnovnega motiva, npr.  $-TA-(CA)_4-TA-(CA)_7$ ;
- sestavljen mikrosatelit[3] sestavljata vsaj dva različna osnovna motiva baz, npr.  $-(CT)_{22}-(CA)_6$ ;
- sestavljen in prekinjen mikrosatelit[4] ima poleg vsaj dveh različnih osnovnih motivov še krajšo insercijo baznih parov, ki se razlikujejo od osnovnih motivov, npr.  $-(AC)_{14}-AG-AA-(AG)_{12}$ ;
- kompleksen mikrosatelit[5] je širši izraz za popolne in sestavljene mikrosatelite, ki nastanejo zaradi insercij baz, ki predstavljajo kratko ponovitev, npr.  $(TTTC)_3-(T)_6-CT-(CYKY)_n-CTCC-(TTCC)_2$ ,
- prekinjen kompleksen mikrosatelit[6] predstavlja alele na nekem lokusu, pri katerih znotraj osnovnih motivov prihaja do prekinitve.

[1] Angl. pure microsatellite

• [2] Angl. interrupted pure microsatellite

• [3] Angl. compound microsatellite

• [4] Angl. interrupted compound microsatellite

• [5] Angl. complex microsatellite

• [6] Angl. interrupted complex microsatellite

Poznamo tudi izraz prikrita enostavnost, ki opredeljuje zaporedja, ki spominjajo na tandemsko ponavljajoča, vendar to niso, ker imajo veliko vmesnih točkovnih mutacij. Nakazujejo propadajoče tandemske mikrosatelite. Procesa izginjanja in nastajanja novega mikrosatelita se ne izključujeta. Kratki mikrosateliti (imenovani tudi protomikrosateliti) nastajajo po naključju, najprej s točkovnimi mutacijami, katerim sledijo še redki zdrsji vijačnice med replikacijo.

Številne raziskave so pokazale, da nukleotidna zaporedja minisatelitov in mikrosatelitov niso prisotna samo v nekodirajočih regijah genoma kot je bilo dolgo mišljeno, temveč se nahajajo tudi v zgornjih promotorskih regijah kodirajočih DNA zaporedij evkariontskih genomov, kjer imajo funkcionalno vlogo regulatornih elementov. Številne mikrosatelitske ponovitve odkrite pri človeku so bile najdene tudi pri primatih, potemtakem ohranjanje specifičnih zaporedij DNA med različnimi vrstami nakazuje na njihovo biološko funkcionalnost. Mikrosateliti v promotorskih regijah kodirajočih zaporedij DNA delujejo kot ojačevalci ekspresijskih vektorjev. Pokazalo se je, da lahko odsotnost mikrosatelitske ponovitve zmanjša transkripcijsko sposobnost promotorja. V nadaljevanju so s študijami ugotovili, da lahko kratki nukleotidni in ponavljajoči se motivi v zgornjih aktivnih mestih ekspresijskih vektorjev služijo kot mesto vezave regulatornih proteinov. Predstavljene so bile tudi študije o vplivu dolžine mikrosatelitov na fenotipsko raznolikost (Kashi in Soller, 1999). Mikrosateliti kot funkcionalni elementi v genomu lahko predstavljajo glavni vir genetske raznolikosti pomembne za prilagoditev populacij v evoluciji, s pomočjo katerih se nadomeščajo polimorfizmi izgubljeni s selekcijskim pritiskom (King in sod., 1997).

#### VLOGA MIKROSATELITOV:

Mikrosateliti so pri rastlinah uporabljajo kot markerji DNA.

- Najpogosteje so uporabljeni za genotipizacijo, identifikacijo sort in klonov ter za ugotavljanje genetske sorodnosti med posamezniki, kar omogoča rekonstrukcijo nastanka sortne strukture nekega pridelovalnega območja.
- Ker se dedujejo kodominantno, so idealno orodje za starševske analize in analize rodovnikov.
- S pomočjo mikrosatelitov se lahko pridobivajo informacije o žlahtnjenju neke rastline in o strukturi populacij.

## FORENZIKA

Aplikacija genetskih analiz omogoča identifikacijo oseb osumljenih kriminalnih dejanj

- Tehnike, ki jih forenziki uporabljajo: DNA fingerprinting (prstni odtis, popularen izraz), DNA profiliranje.
- Tehnike & metode za identifikacijo posameznikov ali pa za potrditev, da je posameznik član neke družine danes temeljijo na uporabi verižne reakcije s polimerazo (PCR) in pomnoževanju mikrosatelitov ali drugih regij v genomu.

Pomembnejši markerji s katerimi lahko proučujemo variabilnost so:

- RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms, dolžinski polimorfizem restriksijskih fragmentov),
- STRs (Short Tandem Repeats),
- SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms, polimorfizem posameznega nukleotida).

Ti markerji se lahko nahajajo med geni (intergenske regije v genomu). V človekovem organizmu je več milijonov polimorfnihih mest, SNP pa so najpogostejši.

Najprej so za metodo uporabljali hibridizacijo, z razvojem tehnike PCR pa smo pridobili eno najboljših orodij za genotipizacijo oseb. V forenziki se uporablja tehnika STRs (angl. Short Tandem Repeats, kratka tandemska ponovljiva zaporedja). STR so kratke sekvence, dolge od 1- 13 baz, ki se večkrat ponovijo v tandemskem vzorcu. Pri človeku je najpogostejši vzorec  $(CA)_n$ , kjer je  $n$  število ponovitev, običajno med 5 in 20. Polimorfizem se kaže v število ponovitev ( $n$ ) vzorca, en osebek ima lahko 20 ponovitev, drugi 25, tretji 17, itd. Te razlike nastanejo, ker se lahko ponovitve dodajajo, nekoliko manj pogosto je odzemanje, ki nastane zaradi napak pri replikaciji DNA.

Da so rezultati zanesljivi, je potrebno opraviti profiliranje DNA na 9 lokusih. Enak postopek se uporablja pri ugotavljanju očetovstva.

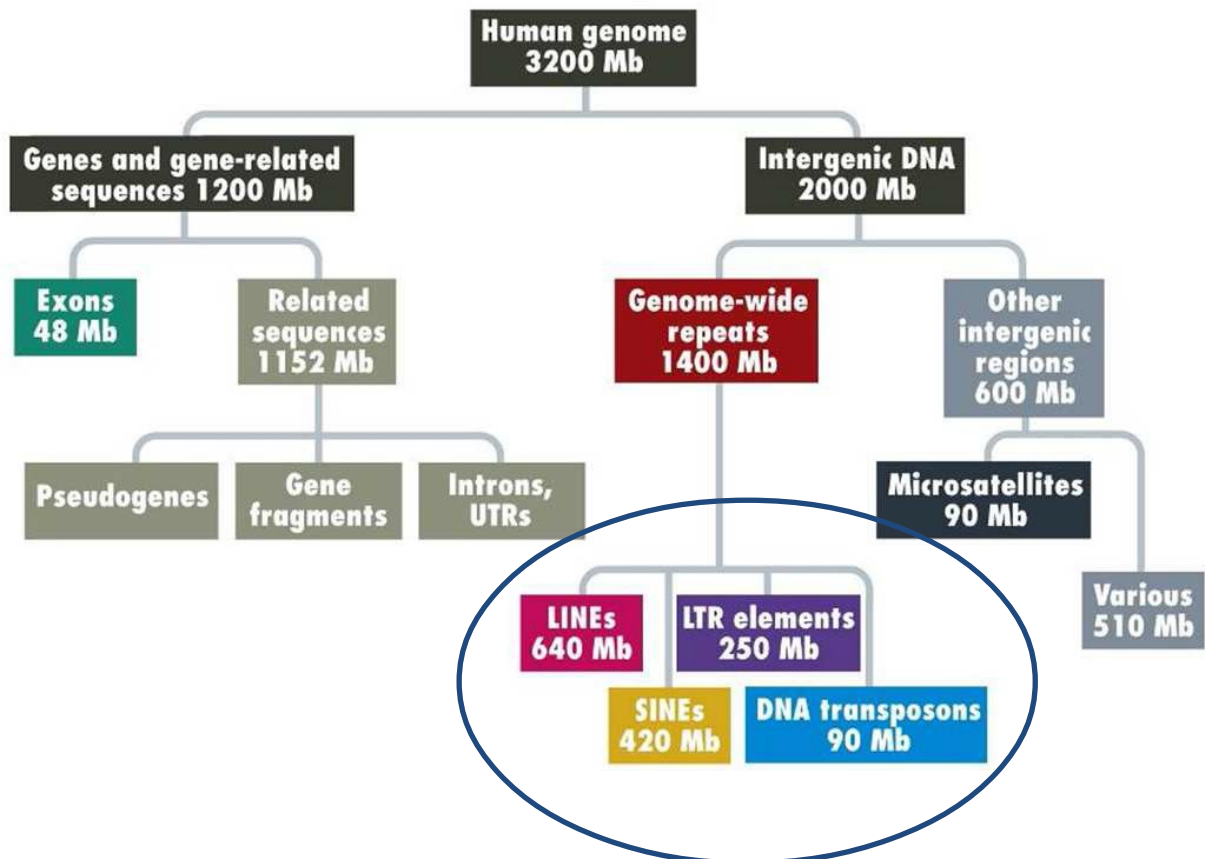
Več lokusov analiziramo, večjo stopnjo zaupanja lahko dosežemo z rezultati. Pri analizi od 5 do 10 lokusov, je verjetnost, da bosta dve osebi imeli identičen profil DNA 1: 10 milijonov.

## DOLOČANJE SPOLNA Z ANALIZO DNA

Najlažje določimo spol z reakcijo PCR, da namnožimo del na kromosomu Y. Med X in Y je nekaj regij nehomolognih. Pri Y so nekatere regije, ki jih ima samo moški, kar pomeni, da bomo v reakciji namnožili marker samo pri moškemu, pri ženski pa ne.

Problem je, če so ostanki trupla močno degradirani, največkrat je to v primerih pokopanih trupel, kjer na dednino vplivajo inhibitorji (huminske kisline), ki preprečujejo delovanje encima Taq polimeraze, ki je ključen za sintezo DNA. Zato so razvili še eno metodo za detekcijo spola, ki temelji na **pomnoževanju amelogenin gena** (kodira protein, ki se nahaja v sklenini). Gen se nahaja na Y kromosomu, kopija pa je tudi na X kromosomu, vendar se gena na X in Y rahlo razlikujeta (v deleciji majhnega dela zaporedja), kar pomeni, da bodo produkti v reakciji PCR različne dolžine ter, da bo pri ženskem osebku namnožen samo en fragment, pri moškemu pa dva.

## PREDAVANJE\_9: MOBILNI ELEMENTI V GENOMU



Genome-wide repeats: Razpršene sekvence

Nekatera zaporedja se v kopijah pojavijo daleč od mesta nastanka. To je pojav **transpozicije**. Lastnost nekaterih virusov, ki vključijo svoj genom v gostiteljsko celico in se nara premikajo iz enega mesta na genomu na drugo. Ti mobilni elementi DNA se imenujejo **transpozoni**. Poznamo dva mehanizma:

- i) **Konzervativen proces**: vključuje izrez sekvence iz prvotne pozicije na DNA, sledi insercija kjer koli na genomu. Pri tem ne pride do povečanja števila kopij originalne sekvence.
- ii) **Replikativna transpozicija**: poveča se število kopij originalne sekvence. Pri tem procesu pride do vključevanja transpozona na razpršene pozicije po genomu.

Poznamo replikativne transpozone, ki se delijo glede na to, kako se prenašajo: preko RNA ali preko DNA. Tisti, ki se prenašajo preko RNA so **retrotranspozoni**. Napjprej se zgodi normalna transkripcija s sintezo RNA kopije transpozona. Nato se RNA kopije transpozona prepisejo nazaj v DNA s pomočjo encima reverzne transkriptaze. Nekaj časa je tako neodvisna molekula izven genoma, dokler ne se vključim nekam - lahko na isti,

lahko pa tudi na čisto drugi kromosom. Tako dobimo dve kopiji transpozona na različnih mestih.

- **retrotranspozoni** \_ prenos preko intermedijata RNA po mehanizmu “kopiraj-in-prilepi”
- **DNA transpozoni** \_ prenos preko intermedijata DNA po mehanizmu “izreži-in-prilepi”

Poznamo **retrotranspozone z LTR** (long terminal repeats) in tiste **brez LTR**.

RNA transpozoni z LTR (daljšimi terminalnimi ponovitvami) so povezani z virusnimi retroelementi. Kopija se reverzno prepriše v dvojno DNA. Prisotni bolj pri rastlinah, pri sesalcih oz. človeku so prisotni, vendar bolj preostanek virusnih retroelementov kot pa pravi transpozoni. Večina jih vsebuje mutacije, delecije in ima neaktivne sekvence.

RNA transpozoni brez LTR se imenujejo tudi retropozoni in vključujejo LINE (long) in SINE (short interspread nuclear elements) ter DIRSs in PLEs. Nimajo dolgih končnih ponovitev. Predstavljajo 34% človeškega genoma, večina jih je neaktivnih.

#### MOŽNI VPLIVI RETROTRANSPOZONOV NA GENOMSKO STABILNOST

- \_ insercijska mutagenaza (npr. hemofilija A, mišična distrofija, rak debelega črevesa)
- \_ inaktivacija genov
- \_ spremenjena ekspresija genov
- \_ popravijo pretrganje dvovertične DNA
- \_ prenos drugih zaporedij DNA

- Če se transpozon vključi v delujoč gen, ga lahko ‘pokvari’. Insercija v ekson, intron ali v obrobno regijo gena (ki vsebuje promotorska in pospeševalna mesta) lahko uniči ali spremeni delovanje gena.
- LINE in SINE pri človeku povzročajo le majhen del mutacij, vendar so odkrili z njimi povezanost bolezni hemofilije A in B, predispozicija za tvorbo polipov in raka kolona (APC gen), Duchenova mišična distrofija,...

#### DNA transpozoni



Vsi transpozoni ne potrebujejo kot medij RNA molekulo, lahko se premikajo direktno iz DNA na DNA. Pri evkariontih so manj pogosti kot retrotranspozoni, vendar imajo v genetiki posebno mesto.

- **Primer Ac/Ds elementi pri koruzi** so bili prvi odkriti transpozoni, odkrila jih je **Barbara McClintock** 1950. leta. Njeni zaključki so bili: obstajajo geni, ki so mobilni in imajo sposobnost premikanja iz enega kromosoma na drugi. Poskus na molekularnem nivoju so razumeli šele v 70-ih.

## **Aktivni DNA transpozoni pri rastlinah**

- Ac/Ds transpozoni, koruza
- Zanimivo je dejstvo, da delujejo skupaj kot družina
- **Ac elementi** določajo aktivnost transpozaze, ki prepoznajo Ac in Ds sekvence.
- **Ds element** je verzija Ac z notranjo delecijo, ki odstrani del gena za transpozazo, kar pomeni da Ds ne morejo sintetizirati svoje lastne transpozaze.
- Aktivnost Ac elementov med normalnim ciklom pri koruzi v somatskih celicah rezultira v spremenjeni ekspresiji genov npr. za pigmentacijo zrn.
- Interakcija genov Ac, Ds in C
- C gen je inaktiviran, če se v njegovo sekvenco vključi Ds
- Veriga z c-Ds in brez Ac: brez pigmenta, ker se Ds ne more premakniti, ostane v C genu.
- Veriga z c-Ds in Ac: točkasto obarvanje, saj Ac aktivira Ds v nekaterih celicah, da zapusti C gen, kar C genu povrne funkcijo.

- Kasneje so genetiki uvedli nove elemente genoma; Ac denimo je avtonomni element, ker za svojo mobilnost ne potrebuje drugih elementov. Ds je neavtonomni element. Avtonomni elementi nosijo informacijo, ki je potrebna za mobilnost neavtonomnih elementov.

**DNA transpozoni so pogosti pri prokariontih:** pri E.Coli (encim transpozaza omogoča transpozicijo)

- Tn10 rezistenca na tetracikline (ki so sestavina antibiotikov)
- Tn5 in Tn903 rezistenca na kanamicin

**DNA transpozoni so manj običajni za evkarionte**

Človeški genom ima 350.000 DNA transpozonov različnega tipa, vsi imajo obrnjene ponovitve na terminalnih koncih in gen za transpozazo, ki jim omogoča premikanje. Večina je inaktivnih, ker je gen za transpozazo neaktiven ali pa ker je sekvenca na koncu transpozona mutirana ali pa je sploh ni.

## Transpozicija - povzetek

Transpozicijski mehanizmi

- DNA transpozoni se premikajo **replikativno**, izvorni transpozon ostane v primarni poziciji, nova kopija se vključi v genom kjerkoli.
- DNA transpozoni se premikajo **konzervativno**, izvorni transpozon se premakne na novo mesto z izrezom in kopiranjem, copy/paste mehanizem
- Retroelementi se premikajo replikativno s pomočjo RNA kot medij.