Vukosava Diklić Marija Kosanović
Smiljka Dukić Jovanka Nikoliš

BIOLOGIJA

SA

HUMANOM GENETIKOM

BIOLOGIJA
SA HUMANOM GENETIKOM

Autori
Prof. dr Vukosava Diklić
Prof. dr Marija Kosanović
Prof. dr Smiljka Dukić
Prof. dr Jovanka Nikoliš

Izdavač
GRAFOPAN
Beograd, Vojvode Stepe 8
Tel: 011/495-578

Za izdavača
Milisav Pantić

Recenzenti
Prof. dr Bogoslav Soldatović
Prof. dr Verica Božić-Krstić

Lektor
Jovana Jeremić

Tiraž 300.

Štampa
GRAFOPAN
Beograd, Vojvode Stepe 8

MEDICINSKI FAKULTET
INSTITUT ZA BIOLOGIJU I HUMANU GENETIKU

Vukosava Diklić Marija Kosanović
Jovanka Nikoliš Smiljka Dukić

BIOLOGIJA
SA
HUMANOM GENETIKOM

Reprint izdanja 1997.

GRAFOPAN

Beograd, 2001.

CIP - Каталогизација у публикацији
Народна библиотека Србије, Београд

57(075.8)
61:575(075.8)

BIOLOGIJA sa humanom genetikom / Vukosava Diklić, Jovanka Nikoliš, Marija Kosanović, Smiljka Dukić. - Reprint izd. iz 1997. - Beograd : Grafopan, 2001 (Beograd : Grafopan). - 327 str. : ilust. ; 25 cm

Na vrhu nasl. str. : Medicinski fakultet, Institut za biologiju i humanu genetiku. - Tiraž 300. - Bibliografija: str. 324-327.

ISBN 86-83615-03-0
1. Диклић, Вукосава
а) Биологија
COBISS-ID 94394636

Sadržaj

Predgovor 9

1. Biologija ćelije 11
EVOLUCIJA ĆELIJE 11
Evolucija energetskih sistema 13
Evolucija eukariota 14
HEMIJSKI SASTAV ĆELIJE 17
Biološki važni hemijski elementi 17
Voda 17
Organske molekule 18
Četiri osnovne organske molekule 18
UGLJENI HIDRATI: ŠEĆERI I POLIMERI ŠEĆERA 19
LIPIDI 20
Lipidi – depoi energije 20
Strukturni lipidi 20
Regulatorni lipidi 21
PROTEINI 22
Strukturni proteini 22
NUKLEOTIDI 23
RAZLIKA IZMEĐU ĆELIJA PROKARIOTA I EUKARIOTA 23
ORGANIZACIJA ĆELIJA EUKARIOTA 24
Ćelijska membrana (plazma-membrana) 25
Unutrašnje membrane (organele) 26
Citosol 27
Endoplazmatički retikulum (ER) 27
Goldžijev aparat (Goldžijeve vezikule) 30
Lizosomi 31
Peroksisomi 33
Organele sa duplom membranom 33
Jedro (nukleus) 33
Mitohondrije 35
Hloroplasti 36
Flagele i cilije 37
Bazalna telašca i centrioli 39

TRANSPORT KROZ ĆELIJSKE MEMBRANE 39
Transport malih molekula kroz membranu 39
Transport makromolekula i čestica kroz membranu; endocitoza i egzocitoza . . 42
HEMIJSKE REAKCIJE, ENZIMI I ŽIVI SISTEMI 43
Enzimi kao katalizatori 44
Struktura enzima 44
Kofaktori u dejstvu enzima 44
Regulacija atkivnosti enzima 47
Energetski faktor: ATP 48
GLIKOLIZA I ĆELIJSKO DISANJE: stvaranje molekula ATP 49
Glikoliza 50
Ćelijsko disanje 50
Krebsov ciklus 51
Transportni lanac elektrona 52
Mehanizam oksidativne fosforilacije 52
Kontrola oksidativne fosforilacije 53
Ukupni energetski bilans 53
Kataboličkі putevi 53
FOTOSINTEZA 54
Svetla faza (reakcije zavisne od svetlosti) 54
Tamna faza (tamne reakcije) 56
Produkti fotosinteze 57

2. Struktura i funkcija gena 59
NASLEDNA OSNOVA 59
HROMOSOMI EUKARIOTA 62
HROMOSOMI ČOVEKA 65
REPLIKACIJA DNK MOLEKULA 69
Denaturacija i renaturacija DNK – hibridizacija 74
REPLIKACIJA JEDNOLANČANIH DNK- I RNK-VIRUSA 74
DNK MITOHONDRIJA 77
Genetičko inženjerstvo 80
SINTEZA PROTEINA 82
GENETSKA ŠIFRA ILI KOD 83
TRANSKRIPCIJA (enzimska sinteza RNK) 84
Četiri stadijuma u sintezi RNK 85
Informaciona RNK (iRNK) 86
Ribosomska RNK (rRNK) 87
Transportna RNK (tRNK) 91
Vezivanje tRNK za aminokiselinu 93
TRANSLACIJA 94
Etape u procesu translacije 94
REGULACIJA SINTEZE PROTEINA U PROKARIOTA 97

3. Reprodukcija i seksualitet 101
REPRODUKCIJA 101
Mitoza – kariokineza 105
SEKSUALITET 109
Reprodukcija pomoću gameta 110
Gametogeneza 110
Značaj mejoze 114

Spermatogeneza sisara 114
Ultrastruktura spermatozoida sisara 115
Biologija spermatozoida sisara 115
Aktivnost spermatogeneze 116
Oogeneza sisara 117
Biologija jajne ćelije sisara 118
Seksualni ciklus 119
Oplođenje 122
Oplođenje kod sisara 123
Modifikacija procesa oplođenja 124
Androgeneza i partenogeneza kod čoveka 124

4. Aberacije hromosoma 127
UVOD 127
NUMERIČKE ABERACIJE HROMOSOMA 128
Aneuploidija 129
Miksoploidija – mozaicizam 130
Etiologija aneuploidija 131
Genetički uzroci neodvajanja 131
STRUKTURNE ABERACIJE HROMOSOMA 132
Uzroci prekida hromosoma 133
Indukovani prekidi i prerasporedi 133
Prekidi indukovani hemijskim supstancijama 133
Prekidi hromosoma indukovani virusima 133
Genetički uzroci prekida hromosoma 133
Delecija ili parcijalna monosomija 134
Ring-hromosom 134
Duplikacija ili čista parcijalna trisomija 136
Izohromosomi i telocentrični hromosomi 138
Dicentrični hromosomi 139
Inverzije 142
Medicinski značaj inverzije 144
Paracentrična inverzija 145
Translokacije 147
Recipročne translokacije 148
Robertsonova translokacija 152
Insercije 155
HROMOSOMSKE ABERACIJE U SPONTANIM POBAČAJIMA 156
HROMOSOMOPATIJE U ŽIVOROĐENOJ POPULACIJI 157
Trisomija hromosoma 21 (Downov sindrom) 158
Trisomija hromosoma 18 (Edwardsov sindrom) 158
Trisomija hromosoma 13 (Patauov sindrom) 158
Trisomija hromosoma 8 159
Parcijalne trisomije 161
Delecije ili parcijalne monosomije hromosoma 161

5. Determinacija i diferencijacija pola 163
Ponašanje X- i Y-hromosoma u mejozi 168
Diferencijacija gonada 168
Diferencijacija testisa 169
Diferencijacija ovarijuma 170
Faktori diferencijacije pola 170

Diferencijacija polnih odvoda 174
Diferencijacija spoljašnjih polnih organa 175
Aberacije polnih hromosoma 179
45,X – Turnerov sindrom 179
Mozaicizam 45,X/46,XX 180
Strukturne aberacije X-hromosoma 180
Delecije X-hromosoma 180
Polisomije polnih hromosoma 183
Polisomije polnih X-hromosoma u ženskom polu: 47 XXX 181
Polisomije polnih X-hromosoma u muškom polu:
47 XXY – Klinefelterov sindrom 183
Polisomije X-hromosoma: 47,XYY, 48,XYYY i 49,XYYYY 183
Reverzija pola 184
46,XX muškarci 184
45,XO-muškarci 184
46,XY-žene 185
PRAVI HERMAFRODITIZAM 186
PSEUDOHERMAFRODITIZAM 187
Muški pseudohermafroditizam 187
Ženski pseudohemafroditizam 188
INCIDENCIJA HROMOSOMSKIH ABERACIJA 188

6. Mutacije gena 189
MUTACIJE 189
Somatske mutacije i germinativne mutacije 189
Tipovi mutacija 190
Genetička baza mutacija 191
Hemijski mutageni 195
Fizički mutageni 197

7. Rekombinacije 201
Crossing over 201
Transformacija 206
Konjugacija 209
Transdukcija 213

8. Reparacija, mehanizmi popravke DNK, repair – mehanizmi 215
Opravke in situ 215
Postreplikativna reparacija pogrešno spojenih baza 218
Postreplikativna rekombinativna reparacija 218

9. Nasleđivanje u čoveka 221
Autosomno dominantno nasleđivanje 224
Recesivno nasleđivanje 226

Nasleđivanje pola 228
Nasleđivanje vezano za X-hromosom 229
Nasleđivanje vezano za Y-hromosom 230
Nasleđivanje ograničeno polom 230
Multipni aleli 231
Pleiotropni geni 232
Letalni geni 232
Dihibridno ukrštanje 233
Poligenija 234
VEZANI GENI 236
GENEALOŠKA (RODOSLOVNA) STABLA 239
Dominantno nasleđivanje 240
Recesivno nasleđivanje 242
Nasleđivanje vezano za X-hromosom 243
Nasleđivanje vezano za Y-hromosom (holandrično nasleđivanje) 245

10. Genetičko savetovanje i prevencija naslednih oboljenja 247
Prenatalna dijagnoza naslednih oboljenja 247
DNK dijagnoza 249

11. Genetička kontrola, determinacije i diferencijacije embrionalnih ćelija 251
BIOLOGIJA RAZVIĆA 251
Morula 252
Blastula 252
Gastrula 252
Derivati klicinih listova 254
Embrionalno razviće sisara 254
Embrionalni zavoji sisara 257
Determinacija i diferencijacija embrionalnih ćelija 259
Oplođenje 263
Kontrola transkripcije 266
Embrionalne indukcije 269
Obrada primarnog prepisa (posttranskripcija) 272
Stabilizacija iRNK 273
Kontrola posttranslacije 274
RAST 274
Kontrola rasta 275
POREMEĆAJI RAZVIĆA 276

12. Imunogenetika 279
Kompleksni genski lokusi 279
Familije gena 280

13. Onkogenetika 283
Klonalno poreklo tumora 283
Faktori sredine i kancerogeneza 284
Numeričke aberacije hromosoma u maligno transformisanoj ćeliji 285

Aberacije hromosoma karakteristične za određen tip maligne ćelije 287
Virusi kao onkogeni činioci 289
Protoonkogeni – onkogeni ćelije 291
Humani retrovirusi 292
Zašto protoonkogen postaje onkogen? 292
Fragilna mesta 293
Genske mutacije protoonkogena 293
Genski produkti protoonkogena i onkogena 294
Da li je jedna genska mutacija dovoljna da izazove malignu transformaciju? 296
Rak kao multifaktorijalna bolest 296

14. Genetika starenja 299
Epimutacije 303
Sistemi popravki DNK (repair-sistemi) u toku starenja ćelije 303
Aberacije hromosoma u procesu starenja 304

15. Populaciona genetika 309
Izračunavanje frekvencije gena 312
MUTACIJE 315
SELEKCIJA 316
Selekcija štetnih dominantnih gena 317
Selekcija štetnih recesivnih gena 318
Migracija 320
Genetički drift 321
Inbriding i autbriding 321

Literatura 325

Predgovor

Na današnjem stupnju razvoja biomedicinskih nauka ukazala se potreba da studenti medicine i drugih srodnih fakulteta steknu ne samo elementarna saznanja iz različitih oblasti biologije i humane genetike, već da se upoznaju i sa najnovijim dostignućima, koja će im omogućiti da sagledaju čoveka kao integralnu celinu. Zato ova knjiga glavni akcenat stavlja na one oblasti biologije bez kojih se ne može izučavati humana genetika, a koje se nedovoljno obrađuju u srednjoj školi.

Jedna oblast humane genetike, medicinska genetika, svojim brzim razvojem značajno je obogatila saznanjima humanu genetiku.

Danas je humana genetika važan integralni deo preventivne medicine. Zato studenti već na I godini, treba da se upoznaju sa frekvencijom naslednih oboljenja i poremećajima u humanim populacijama, sa tipovima poremećaja, što će im olakšati dalje studije i koristiti u budućoj lekarskoj praksi.

Istovremeno vodilo se računa u ovoj knjizi da studenti shvate značaj poznavanja pojedinih oblasti humane genetike pre svega za prevenciju, pravilnu dijagnozu i prognozu ponavljanja naslednih poremećaja u porodici i populaciji.

Autori se nadaju da će ovaj udžbenik u punoj meri moći da koriste pored studenata medicine i stomatologije i studenti farmacije, a u znatnoj meri i studenti veterine.

Materijal za izradu udžbenika velikim delom uključuje iskustva i rezultate ispitivanja njegovih autora i ostalih članova Kolegijuma Instituta za biologiju i humanu genetiku Medicinskog i Stomatološkog fakulteta u Beogradu.

Autori zahvaljuju svojim kolegama i saradnicima citogenetičarima na nesebičnoj pomoći u izradi ovog udžbenika.

AUTORI

1

Biologija ćelije

EVOLUCIJA ĆELIJE

Veruje se da su svi organizmi i ćelije koje ih čine nastali evolucijom od zajedničkog pretka. Evoluciju čine dva osnovna procesa: 1) pojava slučajne promene u genetskoj informaciji (mutacija) koju jedinka prenosi na svoje potomstvo i 2) selekcija one genetske informacije koja omogućava nosiocu informacije da preživi i da se umnožava. Evolucija je glavni princip biologije koji nam pomaže da razumemo ogromnu raznolikost u živom svetu.

Iako postoje velike praznine u našem znanju o evoluciji koje mogu biti popunjene samo spekulacijama (verovatno pogrešnim u mnogim detaljima), ipak ima i dosta podataka koje nam pružaju fosili i komparativne studije današnjih organizama i molekula, i oni nam dozvoljavaju da pretpostavimo glavne stadijume u evoluciji života.

Kosmolozi su izračunali da su Sunce i planete Sunčevog sistema, uključujući Zemlju, nastali pre oko 4,6 milijardi godina, kada je Univerzum, verovatno, bio star 15 milijardi godina. Poznato je da od 9 planeta Sunčevog sistema život postoji samo na Zemlji, mada nije isključeno da i na drugim planetama u galaksiji postoji neki oblik života.

Izgleda da je Zemlja u našem Sunčevom sistemu bila najpogodnija za nastanak života jer nije ni suviše blizu a ni predaleko od Sunca, što ima značaja za hemijske reakcije od kojih zavisi život. Ove reakcije se prekidaju na vrlo niskim temperaturama, dok su na visokim temperaturama složena hemijska jedinjenja suviše nestabilna. Veličina i masa Zemlje su takođe imali značaja. Planete manje od Zemlje nemaju dovoljnu gravitacionu silu da zadrže zaštitnu atmosferu, a neka planeta mnogo veća od Zemlje verovatno ima toliko gustu atmosferu da Sunčeva svetlost ne može dopreti do njene površine.

Interesantnu hipotezu o događajima koji su prethodili nastanku života postavio je ruski biohemičar A. I. Oparin 1922. god. Prema ovoj hipotezi, pojavi života je prethodio dugi period *hemijske evolucije,* koji obuhvata skoro 1/3 Zemljine istorije. Tokom ovog perioda u atmosferi nije bilo – ili je bilo veoma malo – kiseonika, i to uglavnom u obliku vodene pare. Atmosfera je obilovala vodonikom (H_2), amonijakom (NH_3), metanom (CH_4) i drugim ugljovodoničnim gasovima. Znači da su u primitivnoj atmosferi bili prisutni vodonik, kiseonik, ugljenik i azot – 4 ključna elementa, čije

međusobne kombinacije čine više od 95% živih sistema.

Mlada Zemlja je obilovala i energijom (toplotna energija, električna energija munja, ultraljubičasto zračenje Sunca, radioaktivni elementi sa Zemlje itd.) neophodnom za razlaganje jednostavnih gasova i njihovo pretvaranje u organske molekule. Oparin je pretpostavio da su se pod takvim uslovima, najverovatnije, stvarale jednostavne organske molekule i sakupljale u tanku "kašu" u morima i jezerima.

Američki naučnik S. Miller je pedesetih godina ovoga veka testirao Oparinovu hipotezu laboratorijskim eksperimentima. On je pokazao da se pod uslovima koji simuliraju one za koje se veruje da su postojali pre neke 3-4 milijarde godina stvaraju aminokiseline iz vodonika, amonijaka, metana i vodene pare. Različitim modifikacijama u eksperimentalnim uslovima dobijene su 4 glavne klase organskih molekula koje nalazimo u ćelijama: šećeri, nukleotidi, masne kiseline i gotovo sve aminokiseline.

Iako ovakvi eksperimenti ne mogu u potpunosti da reprodukuju rane uslove na Zemlji, oni pokazuju da do formiranja organskih molekula dolazi iznenađujuće lako. Zemlja je u svom razvoju imala čak ogromne prednosti nad eksperimentom jer je zbog velikih dimenzija mogla imati široki spektar uslova, a imala je i mnogo više vremena (oko 100 miliona godina). U takvim uslovima izgleda vrlo verovatno da su se u nekom momentu i na nekom mestu akumulirali u velikim koncentracijama mnoge jednostavne organske molekule koje se nalaze i u današnjim ćelijama.

Sa povećanjem koncentracije ovih molekula stvarali su se agregati u kojima su se molekule držale na okupu hidrofobnim interakcijama, vodoničnim vezama i drugim slabim silama, pri čemu su najstabilnije hemijske kombinacije, verovatno, imale veću šansu da prežive. Stoga je i u hemijskoj evoluciji, kao i u biološkoj evoluciji koja je sledila, značajnu ulogu imao jedan oblik prirodne selekcije. Poznato je da se jednostavne organske molekule, kao što su aminokiseline i nukleotidi, mogu povezivati formiranjem peptidnih odnosno fosfodiestarskih veza u velike polimere, polipeptide odnosno polinukleotide. Prvi polimeri su se mogli formirati na različite načine. Na primer, četiri tipa nukleotida su mogla gubitkom vode spontano da se polimerizuju u polinukleotide različite dužine i redosleda. Zahvaljujući komplementarnom vezivanju C–G- i A–U- parova nukleotida pomoću relativno slabih hemijskih veza, jednom formirani polinukleotid bio je sposoban da posluži kao matrica za određivanje redosleda nukleotida u novim polinukleotidnim lancima. Specifično sparivanje komplementarnih nukleotida je, verovatno, igralo ključnu ulogu u nastanku života.

Smatra se da su negde na Zemlji pre 3,5-4 milijarde godina ovi polinukleotidi, sposobni za autoreplikaciju, započeli proces evolucije. Da bi izgradili svoje kopije, polimeri sa različitim brojem i redosledom nukleotida su se, verovatno, takmičili za dostupne prekursorske molekule, a uspeh je zavisio od brzine sinteze kopija i njihove stabilnosti. Međutim, struktura polinukleotida izgrađena od samo četiri različita nukleotida bila je povoljna samo za čuvanje genetičke informacije, ali ne i da obezbedi sve strukture i funkcije ćelije. Druge molekule, polipeptidi, sastavljeni od mnogo većeg broja (20) različitih aminokiselina, a imaju i različite trodimenzionalne forme koje često obiluju reaktivnim mestima, bili su mnogo pogodniji za široki opseg strukturnih i hemijskih zadataka.

Čak i slučajni polimeri aminokiselina, stvoreni prebiotičkim mehanizmima sinteze, verovatno su imali katalitička svojstva. Neki od ovih polimera su mogli

pospešiti replikaciju molekula RNK i tako biti od velike koristi replikacionom sistemu. S druge strane, polinukleotidi koji su mogli kontrolisati sintezu specifičnih polipeptida u svojoj okolini imali su veliku prednost u evolutivnoj borbi za preživljavanje.

Još uvek je velika zagonetka kako su polinukleotidi mogli da uspostave takvu kontrolu, odnosno kako je tako kompleksan mehanizam, koji u savremenih organizama upravlja sintezom proteina, nastao u toku evolucije. Genetski kod pomoću koga tripleti nukleotida određuju redosled aminokiselina u polipeptidnom lancu, a koji je u osnovi isti u svim živim sistemima, morao se uspostaviti i ustaliti na veoma ranom stadijumu evolucije. Verovatno da u njemu leže tragovi načina na koji je postizana primordijalna translacija.

Bez obzira na to koji su bili početni koraci, kada su jednom molekuli RNK postali sposobni da upravljaju sintezom proteina, bilo je u principu moguće sintetizovati enzime koji su mogli katalizovati širok opseg hemijskih reakcija, uključujući sintezu više proteina i RNK.

Pojava ***sinteze proteina***, koju kontrolišu nukleinske kiseline, bila je svakako jedan od ključnih procesa koji su doveli do formiranja prve ćelije. Drugi odlučujući događaj je morao biti razvitak ***spoljašnje membrane.*** Selekcija molekula RNK na osnovu kvaliteta proteina koje stvaraju nije mogla da otpočne dok nisu evoluirali neki oblici membrana koje bi obuhvatile i zadržale proteine koji su formirani na osnovu jedne RNK. Tako je omogućeno da ovi proteini prvenstveno služe samoj ćeliji.

Sve današnje ćelije su okružene plazma-membranom sastavljenom od dva sloja fosfolipida i u njima uronjenih proteina. Fosfolipidi se u vodi spontano organizuju u dva sloja, a pod odgovarajućim uslovima zaokružuju se u zatvorene vezikule. Lako je zamisliti da su ovakvim zatvaranjem oko posebnih populacija molekula mogli formirati prostorno izolovanu funkcionalnu jedinicu.

Pretpostavlja se da se ***prva ćelija*** formirala kada su se fosfolipidne molekule spontano organizovale (u prebiotičkoj kaši) u takvu membranoznu strukturu koja je zatvarala mešavinu samoreplikujućih RNK i proteinskih molekula. Jednom zatvorene membranom, molekule RNK su mogle otpočeti evoluciju ne više samo na osnovu svoje vlastite strukture nego i na osnovu proteina koje su mogle proizvoditi.

Iako je sve navedeno spekulativno jer nema fosilnih tragova koji bi ukazali na poreklo prve ćelije, ipak nam današnji organizmi i eksperimenti pružaju ubedljive dokaze da su glavne postavke evolutivne "priče" korektne. Prebiotička sinteza malih molekula, autoreplikacija molekula RNK, translacija sekvenci RNK u aminokiselinske sekvence i sakupljanje lipidnih molekula, da bi formirale odeljke okružene membranom – sve se to moralo odigrati da bi nastala prva ćelija pre, otprilike, 3,5 ili 4 milijarde godina. Na nekom kasnijem stupnju u evolucionom procesu, DNK je zamenila RNK kao nasledni materijal. Male hemijske razlike su učinile da ove dve vrste molekula budu podesne za različite funkcije.

Najstariji do sada otkriveni fosili nađeni su u stenama starim 3,4 milijarde godina u Južnoj Africi. Ovi mikrofosili, čija je struktura vidljiva samo pomoću elektronskog mikroskopa, slični su današnjim bakterijama i modrozelenim algama. Na osnovu ovih nalaza možemo pretpostaviti da je život počeo veoma rano, verovatno u prvoj milijardi godina Zemljine istorije.

Evolucija energetskih sistema

Logično je pretpostaviti da su prve žive ćelije bile heterotrofi koji su se

hranili organskim molekulama iz vode u kojoj su živeli. Verovatno su posedovale i nekoliko enzima i izvodile nekoliko anaboličkih reakcija.

Sa povećanjem broja primitivnih prokariotskih heterotrofa otpočela je kompeticija za hranljivim molekulima. Veću šansu da prežive imale su ćelije sa većim anaboličkim sposobnostima, koje su bile u stanju da najefikasnije koriste sve ograničenije izvore energije. S vremenom su evoluirale ćelije koje su bile sposobne da sintetišu organske molekule (autotrofi) od jednostavnih neorganskih materija. Bez evolucije ovih autotrofa, život na Zemlji bi uskoro prestao.

Najuspešniji autotrofi su bili oni koji su razvili sistem za direktno korišćenje Sunčeve energije – proces fotosinteze. Sa evolucijom fotosintetskih ćelija koje su proizvodile kiseonik atmosfera je polako počela da se menja. Kao posledica fotosinteze, u atmosferi je počeo da se akumulira kiseonik, što je, opet, omogućilo evoluciju organizama koji su obezbeđivali najveći deo svoje hemijske energije ćelijskom respiracijom.

Pretpostavlja se da je, s obzirom na transformaciju energije, prvo nastala anaerobna glikoliza, zatim fotosinteza i, konačno, sa akumulacijom kiseonika, respiracija.

Evolucija eukariota

Smatra se da su svi organizmi koji danas žive na Zemlji proizašli od jedne jedine primordijalne ćelije nastale pre nekoliko milijardi godina. Na ovakav zaključak navodi velika sličnost između svih organizama. Nalazi mikrofosila ukazuju da je verovatno pre oko 1,6 milijardi godina došlo do prelaska od malih ćelija sa relativno jednostavnom unutrašnjom strukturom – ***prokariota*** – ka većim i znatno složenijim eukariotskim ćelijama.

Prokariote, koje uključuju različite tipove bakterija, najjednostavniji su organizmi koji se nalaze u većini prirodnih sredina. Često imaju otporni zaštitni omotač, zvan ćelijski zid, ispod kojeg plazma-membrana zatvara jedan citoplazmatični odeljak koji sadrži DNK, RNK, ribosome, proteine i male molekule. Bakterije su male i mogu se brzo razmnožavati jednostavnom, binernom deobom. Sposobnost brze deobe omogućava populaciji bakterija brzu adaptaciju na promene u okolini. Razlikuju se dve grupe, koje su u udaljenom srodstvu: *eubakterije*, uobičajene forme koje naseljavaju zemlju, vodu i žive organizme, i *arhebakterije*, koje naseljavaju neobična staništa kao što su močvare, okeanske dubine, slane vode.

Eukariote su veći od prokariota, imaju nasledni materijal odvojen od citoplazme jedrovim omotačem, kompleksno organizovanu DNK i niz složenih organela.

Korak od prokariota ka prvim eukariotama bio je jedan od velikih evolutivnih prelaza koji se može meriti samo sa nastankom života. Pitanje kako se ovo odigralo predmet je aktuelnih i živih diskusija. Interesantna i najprihvatljivija je ***simbiotska hipoteza***, koja objašnjava nastanak današnjih ćelija, eukariotskog tipa, na sledeći način:

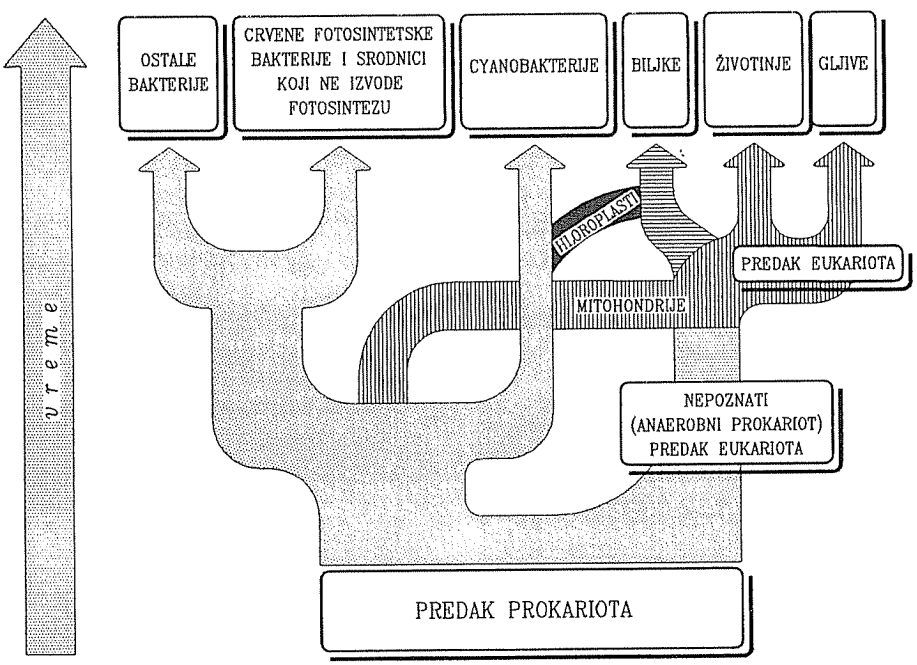
Kada se molekularni kiseonik akumulirao u atmosferi, organizmi koji su bili sposobni da pređu na aerobnu oksidaciju molekula hrane (respiraciju) i tako oslobođenu energiju koriste za sintezu ATP-a, odnosno da koriste kiseonik za sintezu ATP-a, dobili su znatnu selektivnu prednost. Neki od njih su evoluirali u današnje oblike aerobnih bakterija, dok su drugi, po ovoj teoriji, ušli u simbiotske odnose sa većim anaerobnim ćelijama i evoluirali u mitohondrije.

Za razliku od prokariotskih, eukariotske ćelije imaju jedro ("karyon" na grč-

kom) koje sadrži najveći deo ćelijske DNK koja je dvostrukom membranom odvojena od citoplazme, u kojoj se odvija većina metaboličkih procesa ćelije. U citoplazmi se nalaze i mnoge jasno uočljive organele,među kojima su posebno interesantne mitohondrije i hloroplasti. Mitohondrije su univerzalna karakteristika eukariotskih ćelija, dok se hloroplasti nalaze samo u onim eukariotskim ćelijama koje su sposobne za fotosintezu – dakle, u biljkama. Za obe organele se smatra da su simbiotskog porekla, odnosno da su potomci specijalizovanih bakterija. Nekoliko dokaza ide u prilog ovoj hipotezi.

Mitohondrije pokazuju mnoge sličnosti sa prokariotskim organizmima: slične su veličine i oblika, sadrže vlastitu DNK u obliku jedne prstenaste molekule; mnogi enzimi koje sadrži ćelijska membrana bakterije nalaze se i u membrani mitohondrije; ribosomi mitohondrija podsećaju na bakterijske po veličini i po nekim detaljima hemijskog 'sastava; mitohondrije se reprodukuju binernom deobom unutar ćelije domaćina (premda je i DNK ćelije domaćina neophodna za sintezu mitohondrijalnih struktura, jer DNK mitohondrije, izgleda, nije dovoljna za kodiranje svih mitohondrijalnih proteina). Razdvajanjem sastavnih delova eukariotske ćelije moguće je pokazati da su mitohondrije odgovorne za respiraciju i da se ovaj proces ne javlja na drugom mestu u ćeliji. Bez mitohondrija, ćelije životinja i gljiva bile bi anaerobni organizmi, zavisni od relativno neefikasnog i starog procesa glikolize za dobijanje energije. U mnogih današnjih bakterija proces respiracije se vrši pomoću mehanizma koji u velikoj meri podseća na onaj u mitohondrijama.

S obzirom na navedeno, izgleda verovatno da eukariotske ćelije potiču od primitivnih anaerobnih organizama koji



Slika 1.1 – Hipoteza o nastanku eurokariota putem simbioze aerobne i anaerobne prokariotske ćelije

su, zahvaljujući udruživanju sa aerobnim organizmima, preživeli u svetu koji je postao bogat kiseonikom. Na taj način je nastala simbioza u kojoj je anaerobna ćelija domaćin obezbeđivala hranu, a aerobna ćelija je zauzvrat, koristeći atmosferski kiseonik, obezbeđivala domaćinu potrebnu energiju. Neki današnji organizmi pružaju ubedljiv dokaz da se ovako nešto moglo odigrati u toku evolucije : npr., ameba Pelomyxa palustris nema mitohondrije i umesto njih drži u stalnom simbiotskom odnosu aerobne bakterije.

Hloroplasti, opet, pokazuju sličnosti sa cijanobakterijama – prokariotama sposobnim za fotosintezu. Slične su veličine i imaju slične slojevite membrane sa hlorofilom, te na isti način vrše foto-

Tabela 1.1

		PROKARIOTI	EUKARIOTI
ĆELIJSKA VELIČINA		OBIČNO 1-10 μm LINEARNO I NE VIŠE OD NEKOLIKO μm^3 U VOLUMENU	OBIČNO 10-100 μm LINEARNO I OD NEKOLIKO μm^3 DO NEKOLILO mm^3 U VOLUMENU
ĆELIJSKI ZID		NEMA CELULOZU U SVOM SASTAVU	U BILJNIH ĆELIJA I IMA CELULOZU U SVOM SASTAVU
PLAZMA MEMBRANA		NEMA HOLESTEROLA	PRISUTAN HOLESTEROL
CITOPLAZMA		STRUJANJE CITOPLAZME NE POSTOJI	STRUJANJE CITOPLAZME POSTOJI
		NEMA CITOSKELETA	IMA CITOSKELET (mikrotubuli Ø25 nm, aktinski mikrofilamenti Ø 7 nm i intermedijalni filamenti Ø 10 nm)
ORGANELE	ENDOMEMBRANE (gER, aER, Golgi)	ODSUTNE	PRISUTNE
	MITOHONDRIJE	RESPIRATORNI I FOTOSINTETSKI ENZIMI SE NALAZE U PLAZMA MEMBRANI	PRISUTNE
	RIBOSOMI	70S (50S, 30S)	80S (50S, 40S)
	HLOROPLASTI	ODSUTNI	PRISUTNI U BILJNIM ĆELIJAMA
RNA I PROTEINI		SINTEZA U ISTOM ODELJKU	RNA SE SINTETIŠE I PROCESUJE U NUKLEUSU, A PROTEINI SE SINTETIŠU U CITOPLAZMI
JEDARNA MEMBRANA		ODSUTNA	PRISUTNA
NUKLEOLUS		ODSUTAN	JEDAN ILI VIŠE
HROMOSOMI		JEDAN	DVA ILI VIŠE
DNA		OGOLELA	KOMBINOVANA SA PROTEINIMA (histoni)
GENI		NEMAJU INTRONE	VEĆINA SADRŽI INTRONE
METABOLIZAM		ANAEROBAN ILI AEROBAN	AEROBAN
ĆELIJSKA DEOBA		BINARNA FISIJA	MITOZA ILI MEJOZA
EGZOCITOZA I ENDOCITOZA		NE POSTOJI	POSTOJI
LOKOMOCIJA		FIBRIL, FLAGELUM	CILIJE, FLAGELE

sintezu. Sem toga, hloroplasti se razmnožavaju deobom i sadrže DNK. Sve ovo govori u prilog pretpostavci da su hloroplasti evoluirali od cijanobakterija koje su u eukariotskim ćelijama vršile fotosintezu i proizvodile organske materije za svoje domaćine. Slika 1.1 prikazuje evolutivno poreklo eukariota prema simbiotskoj teoriji.

Simbioza fotosintetskih ćelija sa drugim ćelijskim tipovima je, zapravo, uobičajen fenomen, jer brojne savremene eukariotske ćelije sadrže prave cijanobakterije. Međutim, mora se naglasiti da mitohondrije i hloroplasti, pored sličnosti, pokazuju i važne razlike u poređenju sa današnjim aerobnim bakterijama i cijanobakterijama. Na primer, sadrže vrlo malu količinu vlastite DNK, koja nije u mogućnosti da obezbedi većinu molekula od kojih su ove organele sastavljene. Stoga, ako su nastale putem simbioze, morale su pretrpeti velike evolutivne promene koje su ih učinile veoma zavisnim od njihovih domaćina.

Zasad nam nedostaju sigurni dokazi da bismo odgovorili na pitanje da li je uključivanje mitohondrije u neku primitivnu anaerobnu ćeliju bio krucijalni korak u genezi eukariota, koji je omogućio evoluciju i drugih specifičnih karakteristika. Savremene eukariote imaju ne samo mitohondrije, već i niz drugih karakteristika koje ih razlikuju od prokariota (tab. 1.1). Ove karakteristike zajedno daju eukariotskim ćelijama obilje različitih sposobnosti i nemoguće je reći koja je od njih prva evoluirala.

Većina današnjih eukariota (protisti) veoma malo liči ili uopšte ne liči na prve eukariotske ćelije. Pretpostavlja se da svaka od glavnih grupa višećelijskih organizama (gljive, biljke i životinje) potiče od jednog (a možda i više) posebnog tipa jednoćelijskih eukariota, no za ovo nema fosilnih dokaza. Prvi fosili višećelijskih organizama su nađeni u sedimentima starim samo 0,6 milijardi godina, a njihova raznolikost i složenost ukazuju da su eukarioti do tada postojali već milionima godina.

HEMIJSKI SASTAV ĆELIJE

Biološki važni hemijski elementi

Od 92 prirodna elementa, samo 6 elemenata – C, H, N, O, P i S – ulazi u sastav i čini oko 99% živog tkiva. Ovi elementi, iako se ne nalaze u najobilnijim količinama na Zemlji, odabrani su tokom stvaranja života zbog svojih povoljnih karakteristika: svi njihovi atomi su mali i laki, u njima su elektroni blizu nukleusa, sposobni da formiraju čvrste i stabilne veze. Sem toga, svi oni formiraju kovalentne veze i, sa izuzetkom vodonika, mogu formirati veze sa dva ili više atoma.

Gotovo svi ovi elementi se javljaju u sastavu jedinjenja.

Voda

Jedna od glavnih komponenti živih sistema je voda, koja čini čak 50-95% težine živog sistema. Voda, inače najuobičajenija tečnost u biosferi, ima niz svojstava koja pogoduju živim sistemima. Ova svojstva su posledica molekularne strukture vode.

Molekula vode, iako u celini neutralnog naboja, zbog veće elektronega-

tivnosti kiseonika od vodonika ima polaritet. Zahvaljujući zonama sa pozitivnim i negativnim nabojem (polaritetu), voda je adhezivna i ima sklonost ka kapilarnom kretanju. Takođe, polaritet čini vodu dobrim rastvaračem za jone i druge molekule sa polaritetom (nabojem), kao što je, npr., glukoza. Ove molekule se označavaju kao hidrofilne za razliku od molekula bez polariteta (ili naboja) koje vodene molekule aktivno isključuju iz rastvora, a koje se označavaju kao hidrofobne (npr., masti). Ove slabe sile – vodonične veze i hidrofobne sile – imaju važnu ulogu u oblikovanju velikih biomolekula i, kao posledica, u određivanju njihovih svojstava.

Voda ima svojstvo da se jonizuje. U čistoj vodi broj jona H^+ je jednak broju jona OH^-. Rastvor koji sadrži više jona H^+ nego jona OH^- je kiseo, dok je rastvor koji sadrži više jona OH^- bazan. Skala koja odražava odnos jona H^+ i OH^- naziva se pH-skala. Kiseli rastvor ima pH manji od 7, bazni iznad 7, dok je čista voda neutralna i ima pH 7.

Sve hemijske reakcije u živim sistemima se odvijaju u uskom rasponu pH, između 6 i 8 (sa izuzetkom hemijskih procesa u želucu čoveka i životinja, koji se odvijaju pri pH oko 2).

Krv čoveka, npr., ima skoro konstantan pH od 7,4 uprkos činjenici što prenosi veliki broj različitih hranljivih i hemijskih materija do ćelija, kao i materije koje izlaze iz ćelija, od kojih su mnoge kiseline i baze.

Održavanje konstantnog pH (primer homeostaze) važno je, jer pH u velikoj meri utiče na hemijske reakcije. Velikim i iznenadnim promenama pH u krvi i drugim telesnim tečnostima organizam se suprotstavlja puferima koji se vezuju za jone H^+ kada njihova koncentracija raste, a otpuštaju ih kada njihova koncentracija opada.

Organske molekule

U proseku 60-70% živog sistema čini voda, ne više od 1% otpada na jone kao što su K^+, Na^+ i Ca^{++}, a skoro ceo ostatak, u hemijskom smislu, sastavljen je od organskih molekula, odnosno molekula koje sadrže ugljenik. Ugljenik ima centralnu ulogu u hemiji živih sistema zbog činjenice što je najlakši atom koji je sposoban da formira 4 kovalentne veze. Atom ugljenika može, kombinujući se sa C^- atomima i drugim atomima, da formira vrlo različita, jaka i stabilna lančana i prstenasta jedinjenja. U principu, organske molekule dobijaju svoj oblik prvenstveno zahvaljujući skeletu koji formiraju ugljenikovi atomi.

Međutim, mnoga specifična hemijska svojstva organskih molekula zavise od funkcionalnih grupa vezanih za ovaj skelet.

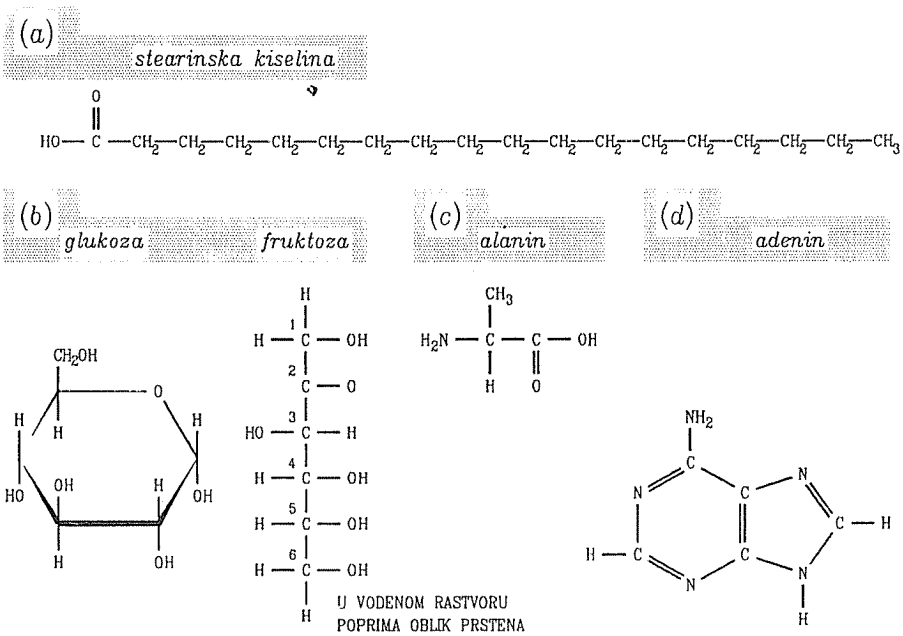
Četiri osnovne organske molekule

Slika 1.2. pokazuje četiri glavna tipa organskih molekula koji su najzastupljeniji u živim sistemima.

1. ***Masne kiseline***: sastoje se od dugog lanca koji sadrži samo atome ugljenika i vodonika i stoga je nepolaran i hidrofoban. Karboksilna grupa na jednom kraju čini ovaj ugljovodonični lanac kiselinom. Masne kiseline su glavne strukturne komponente većine lipida.

2. ***Šećeri:*** sadrže skelet od ugljenikovih atoma za koji su vezani atomi vodonika i kiseonika u odnosu 1:2:1 (CH_2O), kao i keto-grupu, karakteristično za šećere. U vodenom rastvoru lanac formira prsten. Zbog hidroksilnih grupa rastvara se u vodi. Prosti šećeri – monosaharidi – i njihovi polimeri čine grupu ugljenih hidrata.

3. ***Aminokiseline:*** svaka aminokiselina se sastoji od jednog centralnog atoma ugljenika za koji su vezani jedan atom



Slika 1.2 – Masna kiselina (a), šećer (b), aminokiselina (c), azotna baza (d)

vodonika i tri funkcionalne grupe. Jedna od ovih grupa je uvek karboksilna grupa koja daje molekuli svojstva kiseline, dok je druga uvek amino-grupa, zbog koje je aminokiselina takođe i slaba baza. Treća funkcionalna grupa varira od aminokiseline do aminokiseline. Aminokiseline su osnovni gradivni elementi peptidnih lanaca ili proteina.

4. *Azotne baze:* ove prstenaste molekule, pored ugljenika, sadrže i azot, a bazom ih čini amino-grupa. Takva baza je i adenin, koji je jedna od glavnih molekula u živim sistemima; važna je komponenta DNK i brojnih drugih jedinjenja.

Navedene molekule čine osnovne komponente – monomere – u sastavu složenijih i većih jedinjenja – polimera.

UGLJENI HIDRATI: ŠEĆERI I POLIMERI ŠEĆERA

Opšta karakteristika svih organskih jedinjenja je da oksidacijom daju energiju. Ugljeni hidrati su glavni izvor hemijske energije u većini živih sistema. Sem toga, oni formiraju i različite strukturne komponente ćelija (ćelijski zid biljaka je uglavnom sastavljen od celuloze). Ugljeni hidrati se javljaju u formi običnih šećera (monosaharidi) i u obliku polimera šećera (oligosaharidi i polisaharidi).

Monosaharidi, kao što je rečeno, imaju opštu formulu $(CH_2O)_n$, pri čemu n može biti od 3 do 8. Karakterišu ih hidroksilne grupe i jedna aldehidna ili keto-grupa. Oksidacijom daju ugljen-dioksid i vodu: $(CH_2O)_n + nO_2 \rightarrow (CO_2)_n + (H_2O)_n$, uz oslobađanje energije. Glavni izvor energije u vertebrata je monosaharid glukoza, koja je i osnovni transportni oblik šećera u organizmu. Pri intravenskoj ishrani pacijenta daje se vodeni rastvor glukoze koja krvotokom dospeva do svih ćelija, gde se odvijaju reakcije u kojima se oslobađa energija.

Disaharidi se sastoje od dva kovalentno vezana monosaharida. Iako je glukoza uobičajena transportna forma šeće-

ra u vertebrata, u drugim organizmima šećeri se često transportuju u obliku disaharida. Na primer, u biljkama šećer se transportuje u formi saharoze od fotošintetičkih ćelija, gde se proizvodi, do drugih delova tela biljke. Da bi se koristio kao izvor energije, ovaj disaharid se prethodno mora razdvojiti putem hidrolize na monosaharide glukozu i fruktozu. Jedan drugi disaharid, laktoza, javlja se samo u mleku, a sastoji se iz glukoze i galaktoze. Polisaharidi su sastavljeni od monosaharida međusobno povezanih u duge lance putem kondenzacije (otklanjanjem molekula vode). Neki predstavljaju rezervne oblike šećera, kao što je, npr., skrob kod većine biljaka. Skrob se javlja u obliku amiloze i amilopektina. Obe forme su polimeri glukoze.

Glavni rezervni oblik šećera kod viših životinja je glikogen, koji je po strukturi veoma sličan amilopektinu, samo što je više razgranat. U vertebrata, glikogen je deponovan u jetri i mišićima. Kada se pojavi višak glukoze u krvotoku, jetra od glukoze sintetiše glikogen.

Kada koncentracija glukoze u krvi padne, hormon pankreasa glukagon se oslobađa u krvotok i stimuliše jetru da hidrolizuje glikogen u glukozu, koja zatim ulazi u krvotok.

Hidrolizom polisaharida se oslobađa energija koja se koristi za rad ćelija.

Polisaharidi formiraju i strukturne komponente ćelija. U biljaka to je celuloza, koja čini fibrozni deo ćelijskog zida, a u koju je ugrađena zapravo polovina celokupnog organskog ugljenika u biosferi. Drvo sadrži oko 50% celuloze, a pamuk je skoro čista celuloza. Celuloza je polimer sastavljen takođe od monomera glukoze, ali nešto drugačije strukture nego što su skrob i glikogen, tako da samo neki mikroorganizmi mogu izvršiti njenu hidrolizu.

Hitin, takođe strukturni polisaharid, glavna je komponenta egzoskeleta insekata i ćelijskih zidova mnogih biljaka.

LIPIDI

Pod pojmom lipida podrazumevamo grupu supstancija u koju se svrstavaju masti (loj, ulja, voskovi), složeni lipidi (fosfolipidi) i derivati lipida (steroidi).

Lipidi su, za razliku od ugljenih hidrata, hidrofobne organske molekule, ali, slično ugljenim hidratima, imaju važnu ulogu kao skladište energije i kao strukturne komponente ćelije.

Lipidi – depoi energije

Masti su rezervni oblik masnih kiselina i predstavljaju veliko skladište energije. Molekula masti se sastoji od tri molekule masnih kiselina, koje su vezane za jednu molekulu glicerola. Masti koje sadrže nazasićene masne kiseline (sa dvostrukim vezama između ugljenikovih atoma) zapravo su ulja, karakterističnija za biljke nego za životinje. Molekule masti, kao izvor energije, deponuju se u masnim (adipoznim) ćelijama, koje sadrže mnoge lipidne kapljice. Pod dejstvom hormona, kao što je adrenalin, adipozne ćelije vrše hidrolizu molekula masti u slobodne masne kiseline. Masne kiseline se oslobađaju u krvotok, odakle ih ćelije koriste kao izvor energije. Masti poseduju više hemijske energije od ugljenih hidrata jer sadrže više energijom bogatih C-H veza. Višak ugljenih hidrata se prvo privremeno deponuje kao glikogen, a zatim trajnije kao mast. Obrnuto, kada se energetski zahtevi organizma ne mogu zadovoljiti neposrednim uzimanjem hrane, prvo se razlaže glikogen, a zatim masti.

Strukturni lipidi

Fosfolipidi su glavne strukturne komponente ćelijskih membrana. Slično mastima, sastoje se od masnih kiselina i glicerola. Međutim, treća masna kiselina je zamenjena fosfatnom grupom negativnog naelektrisanja, za koju je obično vezana još neka polarna grupa (sl. 1.3a). Fosfatna grupa čini hidrofilnu glavu mo-

lekule, za razliku od hidrofobnih repova masnih kiselina. Zahvaljujući ovakvoj strukturi, fosfolipidi su amfipatične molekule, koje spontano u vodi obrazuju dvoslojni film u kome su glave orijentisane prema spolja – dakle, prema vodi, a repovi prema unutra, što predstavlja osnovu strukture ćelijskih membrana.

Voskovi su takođe jedan od oblika strukturnih lipida. Oni formiraju zaštitni sloj na koži, krznu, perju, lišću i plodovima viših biljaka i na egzoskeletu mnogih insekata.

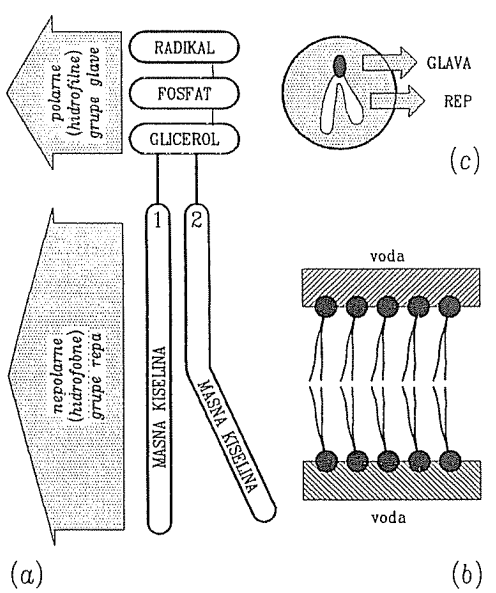
U strukturne lipide ubrajaju se i neki oblici masti kao što su, npr. masno tkivo koje okružuje bubrege sisara (štiti ih od fizičkog šoka) i potkožni sloj masti (termička izolacija).

Holesterol pripada grupi jedinjenja poznatih kao steroidi. Steroidi, premda se po strukturi razlikuju od drugih lipida, svrstani su u ovu grupu zato što su nerastvorljivi u vodi.

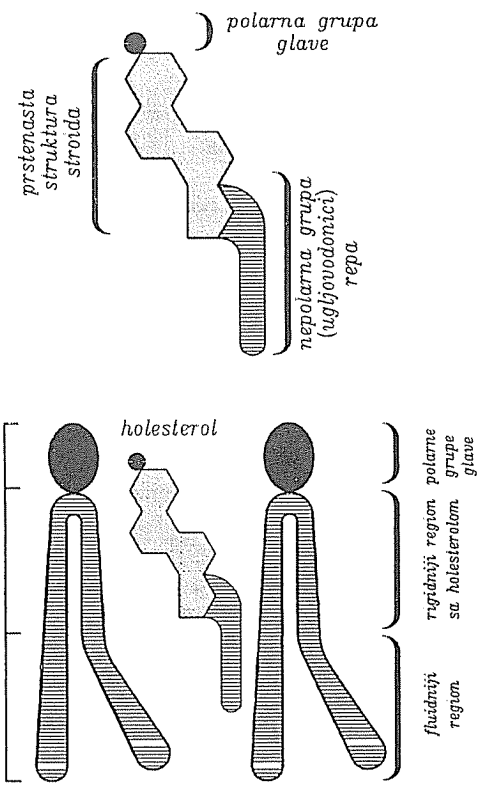
Svi steroidi imaju četiri povezana prstena sastavljena od ugljenika, a neki od njih, kao holesterol, imaju ugljovodonični lanac (rep). (sl. 1.3b). Holesterol je prisutan u svim ćelijskim membranama, sem u bakterijskim. Oko 25% suve težine membrana crvenih krvnih zrnaca čini holesterol; on je takođe glavna komponenta mijelinskog omotača nervnih vlakana. U starijih ljudi holesterol formira masne naslage u unutrašnjosti krvnih sudova, što smanjuje njihovu elastičnost, zatvara ih i dovodi do povećanog krvnog pritiska, srčanog i moždanog udara.

Regulatorni lipidi

U steroide se takođe ubrajaju polni hormoni i hormoni korteksa nadbubrega koji se stvaraju iz holesterola.



Slika 1.3a – Šematski prikaz molekule fosfolipida (A), simbol fosfolipida (B) dva sloja fosfolipida u vodenoj sredini (C).



Slika 1.3b – Šematski prikaz molekule holesterola (A) i interakcija holesterola i fosfolipida u jednom sloju membrane (B).

PROTEINI

Proteini se svrstavaju među najzastupljenije organske molekule; u većini živih sistema čine 50% i više suve težine (izuzetak su biljke zbog celuloze). Postoje mnoge funkcionalno vrlo različite proteinske molekule: enzimi, hormoni, antitela, transportni proteini (hemoglobin), rezervni proteini (u jajima, semenkama), kontraktilni proteini (mišići) i mnogi različiti tipovi strukturnih proteina. Mada je njihova funkcionalna različitost ogromna, u strukturi svi imaju isti plan građe: polimeri su linearno povezanih aminokiselina.

Aminokiseline, iako imaju istu osnovnu strukturu, razlikuju se međusobno u bočnim grupama (radikali ili R-grupe). Bočna grupa sadrži atom ili grupu atoma i u zavisnosti od sastava može imati pozitivan ili negativan naboj, može biti polarna (sa pozitivnim ili negativnim jonima) ili potpuno bez naboja (hidrofobna).

Teoretski je moguće postojanje velikog broja aminokiselina, ali samo 20 aminokiselina, i to uvek istih, ulazi u sastav proteina različitih organizama.

U proteinima su aminokiseline povezane peptidnim vezama (kovalentne veze formirane kondenzacijom između karboksilne grupe jedne aminokiseline i amino-grupe druge aminokiseline). Redosled aminokiselina u lancu određuje biološki karakter molekule proteina. Proteinske molekule su velike, često sadrže više stotina aminokiselina. Stoga je broj različitih aminokiselinskih sekvenci beskrajan, a samim tim i moguća varijabilnost proteinskih molekula, koliko su beskrajne i mogućnosti da se napišu različite reči i rečenice na osnovu 30 slova azbuke.

Od svih mogućih proteina organizmi sadrže samo mali deo. Escherichia coli, npr., sadrži 600-800 različitih vrsta proteina, dok viši organizmi imaju najmanje nekoliko hiljada različitih proteina, svaki sa svojom jedinstvenom prirodom i svaki sa posebnom funkcijom.

Linearni raspored aminokiselina u polipeptidnom lancu čini primarnu strukturu proteina. Različiti proteini imaju različitu primarnu strukturu (zavisno od broja, vrste i redosleda aminokiselina), koju određuje nasledna osnova svakog organizma.

Svaki lančasti molekul dobija dalje (zahvaljujući interakcijama između amino- i karboksilnih grupa aminokiselina u lancu, kao i različitim međusobnim interakcijama bočnih grupa aminokiselina) specifičnu konfiguraciju, od koje zavisi karakteristika proteina. Polipeptidni lanci izuvijani helikoidno su fibrilarni proteini. Takvi, su npr., kolagen, fibrin, keratin, elastin. Mnogi polipeptidni lanci su tako izuvijani da podsećaju na zamršeno klupko. Ovakva trodimenzionalna konfiguracija je karakteristična za globularne proteine, kao što je npr., većina enzima, proteinskih hormona, krvnih proteina i dr.

Strukturni proteini

Strukturni proteini imaju veliku ulogu u životu ćelija i organizama. Unutarćelijski proteini formiraju filamente ili ravne slojeve koji daju ćeliji veličinu i oblik i učestvuju u ćelijskim pokretima i kretanju ćelija. Vanćelijski strukturni proteini povezuju na različite načine ćelije da bi ojačali tkiva i organe i obezbeđuju matriks u kome ćelije mogu da rastu.

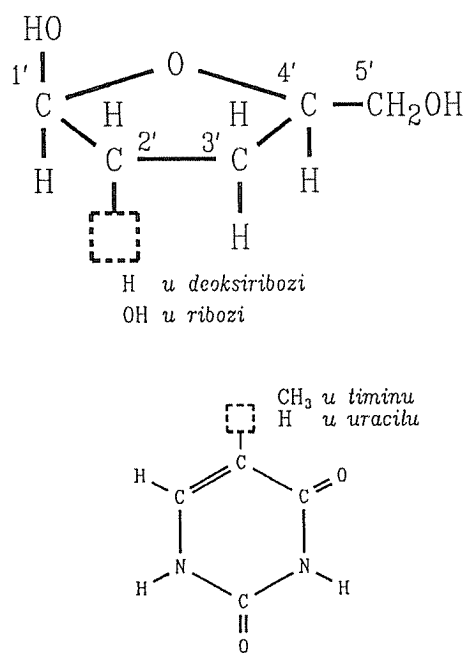
Većina strukturnih proteina su pravilni agregati pojedinačnih polipeptidnih lanaca međusobno povezanih specifičnim kovalentnim ili nekovalentnim vezama. Mnogi su fibrilarne građe. Fibrilarni proteini, uopšte, imaju pravilnu strukturu u kojoj se ponavlja redosled aminokiselina. Dugački polipeptidni lanci su često u

interakciji sa drugim sličnim ili istim polipeptidnim lancima formirajući vlakna ili slojeve. Neki strukturni proteini su globularne građe i helokoidno su poslagani u niz gradeći šuplje cevčice ili vlakna (npr., tubulin, aktin).

Za razliku od strukturnih proteina, većina proteina ima krajnje složene i nepravilne sekvence aminokiselina, koje im daju visok stepen specifičnosti. Većina visokospecifičnih proteina, kao što su enzimi, hormoni, krvni proteini (antitela), jesu globularni proteini.

NUKLEOTIDI

Nukleotidi se sastoje od šećera pentoze, na čiji je prvi C-atom vezana jedna azotna baza, a za peti C-atom organska fosfatna grupa (Sl. 1.4). Dve vrste šećera, koji se neznatno međusobno razlikuju, ulaze u sastav nukleotida: riboza i deoksiriboza. Šećer riboza karakteriše ***ribonukleotid,*** a šećer deoksiriboza ***deoksiribonukleotid.*** Azotna baza u nukleotidu može biti purinska ili pirimidinska. Purinske baze, adenin i guanin, sastoje se od dva prstena i komplementarne su pirimidinskim bazama, timinu, citozinu i uracilu, koji sadrže jedan prsten. Pirimidinska baza timin se javlja samo u deoksiribonukleotidu, dok je uracil prisutan isključivo u ribonukleotidu. Adenin, guanin i citozin javljaju se u obe vrste nukleotida.



Slika 1.4 – Razlike u strukturi između riboze i deoksiriboze i između timina i uracila.

Šećer i azotna baza (bez fosfatne grupe) čine nukleozid (npr., adenin i riboza se označavaju kao adenozin), koji sa fosfatnom grupom predstavlja nukleotid (npr., adenin, riboza i fosfat čine adenozin-monofosfat ili AMP).

Nukleotidi u živoj materiji vrše tri značajne funkcije: prenose energiju (ATP), ulaze u sastav koenzima (FAD, NAD, NADP, CoA) i predstavljaju osnovne komponente genetskog materijala ćelije (DNK, RNK).

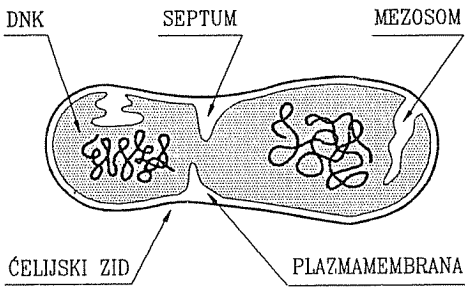
RAZLIKA IZMEĐU ĆELIJA PROKARIOTA I EUKARIOTA

Pre nego što je elektronski mikroskop ušao u upotrebu pretpostavljalo se da sve ćelije imaju iste osnovne principe organizacije. Iako su bakterijske ćelije znatno manje od tipične životinjske, biljne, pa čak i ćelije gljive, bojenje bakterija Feulgenom (boja za DNK), koje je pokazivalo centralnu masu jedra, navodilo je na pretpostavku da sve ćelije (biljne, životinjske, bakterijske) imaju jedro i unutrašnje odeljke. Sem toga, sve ćelije su pokazivale neke ključne metaboličke sposobnosti; npr., sve ćelije koriste isti metabolički put za dobijanje hemijske energije preko razlaganja glukoze do CO_2.

Međutim, ograničena rezolucija svetlosnog mikroskopa nije omogućavala tačno sagledavanje unutrašnje strukture bakterijske ćelije. Problem ćelijske strukture nije rešen sve do pedesetih godina ovoga veka, kada su različite biohemijske

i genetičke studije utvrdile da postoje dva radikalno različita tipa ćelije, koji su se nezavisno održali možda milijardu ili više godina tokom biološke evolucije. Ta dva tipa ćelije su prokariotska ćelija (ona bez diferenciranog jedra) i eukariotska ćelija (ona sa jedrom). Međutim, prokarioti i eukarioti su evoluirali očigledno od istog tipa ćelije, iako je priroda ovog pretka nepoznata. Prokarioti uključuju bakterije i modrozelene alge (fotosintetičke bakterije), dok su svi drugi organizmi eukarioti. Osnovna razlika između prokariotske i eukariotske ćelije je u tome što nasledni materijal prokariota nije izolovan od ostalog dela citoplazme posebnom membranom i što nije organizovan u kompleksne hromosome. Sem toga, citoplazma prokariota nije izdeljena unutrašnjim membranoznim sistemom u pojedinačne izdvojene oblasti u kojima mogu da se vrše različite specifične aktivnosti. U eukariota se diferencirao složen sistem citomembrana, koje odvajaju materijal jedra od citoplazme i obrazuju čitav niz organela ćelije. Eukariotske ćelije su skoro uvek veće od prokariotskih ćelija.

Prokarioti su jednoćelijski organizmi kod kojih se javljaju samo tri ćelijske diferencijacije: plazma-membrana, nukleoid i ribosomi (sl. 1.5). Ostale citoplazmatske strukture se mogu naći samo pojedinačno i samo kod retkih vrsta prokariota. Tako, samo izvesne vrste poseduju bičeve kojima se kreću, ali je njihova struktura znatno prostija u poređenju sa bičevima eukariota; samo izvesni prokarioti stvaraju gasne vakuole ili stvaraju spore, ali većina nema ta svojstva.



Slika 1.5 – Prokariotska ćelija.

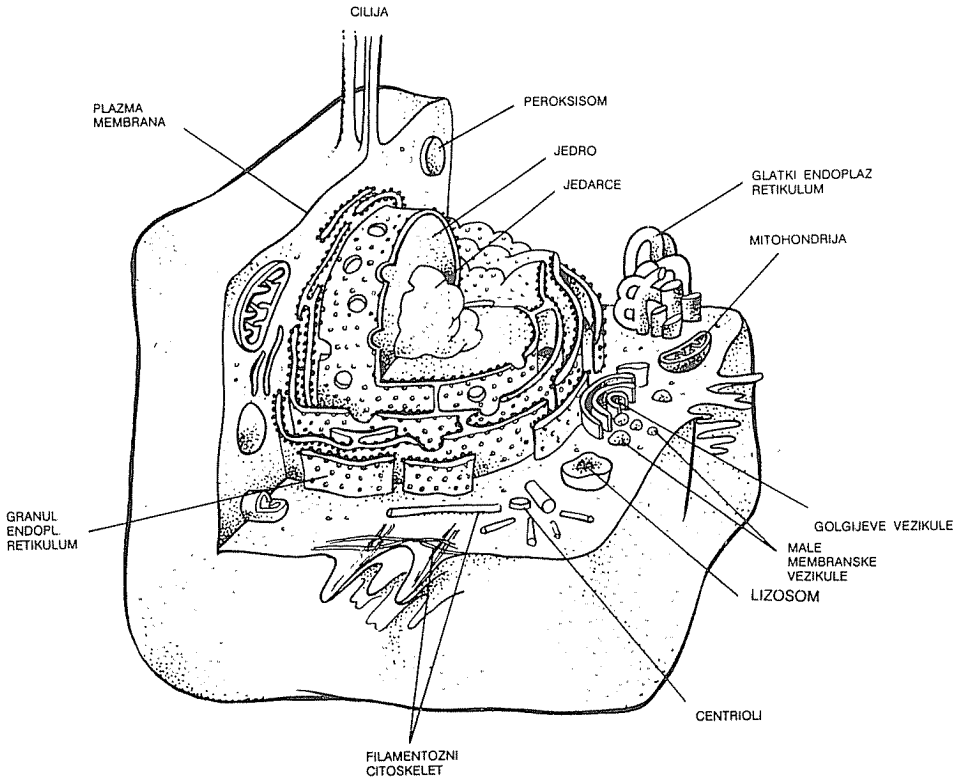
Plazma-membrana je slična plazma-membrani eukariota, ali je najčešće obuhvaćena polučvrstim ili čvrstim ćelijskim zidom. U mnogih prokariota plazma-membrana se na raznim tačkama višestruko uvija u unutrašnjost ćelije, ali nikad ne prožima celu citoplazmu. Kod fotosintetičkih bakterija ovi izuvijani delovi sadrže pigmente i enzime fotosinteze. Druge vrste izuvijanih delova plazma-membrane izgleda da imaju funkciju u raznim aktivnostima ćelije, kao što su respiracija i ćelijska deoba, i tada se ove strukture nazivaju mezosomi.

U citoplazmi se nalaze gusto raspoređeni ribosomi, koji su manji od ribosoma eukariota i sadrže svoje specifične RNK i proteine. Region citoplazme nepravilnog oblika, nukleoid, sadrži dvostruku helikoidnu DNK u obliku prstena koji je vezan za membranu, a predstavlja jedini hromosom prokariota.

Jedna od karakteristika prokariota je i odsustvo ciklozisa, odnosno odsustvo strujanja citoplazme; takođe, nije zapaženo ni ameboidno kretanje. Izuzev fotosintetičara, većina prokariota apsorbuje organske molekule iz spoljašnje sredine.

ORGANIZACIJA ĆELIJA EUKARIOTA

Iako su eukariotske ćelije veoma raznolike po veličini, strukturi i funkciji (samo u organizmu čoveka ima preko 100 različitih tipova ćelija), u osnovi sve su one zapravo veoma slične (sl. 1.6). Svaka ćelija sadrži diferencirano jedro sa naslednim materijalom i kontrolnim centrima, kao i različite, membranom okružene strukture – organele, koje su slične ili identične od ćelije do ćelije, u širokom rasponu ćelijskih tipova. I konačno, sve su sastavljene od istih, i to samo nekoliko vrsta atoma i molekula.



Slika 1.6 – Animalna ćelija

Ćelijska membrana (plazma-membrana)

Sve biološke membrane, uključujući plazma-membranu i unutrašnje membrane eukariotskih ćelija, imaju zajedničku opštu strukturu. Na osnovu elektronskih snimaka i biohemijskih podataka, predložen je "fluidno-mozaički" model, koji je danas opšte prihvaćen: membrana se sastoji od kontinualnog duplog sloja lipidnih molekula u koji su ugrađeni različiti proteini (sl. 1.7. a).

Lipidi membrane su amfipatične molekule sa hidrofilnom (polarnom) "glavom" i hidrofobnim (nepolarnim) "repom". Zahvaljujući ovom svojstvu, lipidi spontano formiraju dva sloja u membrani tako što se hidrofobni repovi grupišu u sredini, a hidrofilne glave se orijentišu prema spolja. Svi lipidni dvoslojevi su dinamične, fluidne strukture u kojima lipidne molekule brzo difunduju u okviru svoga sloja.

Dok dva sloja lipida određuju osnovnu strukturu bioloških membrana, proteini omogućavaju različitim ćelijskim membranama da funkcionišu na specifičan način. Različite proteinske molekule, koje se nekovalentnim interakcijama održavaju u dva sloja lipida, služe kao receptori (prihvataju i odašilju hemijske signale iz ćelijske okoline), nosači (prenose specifične molekule u ćeliju i iz ćelije), enzimi (katalizuju reakcije vezane za membranu) i kao strukturne veze između citoskeleta i ekstracelularnog matriksa.

Lipidni i proteinski sastav dva sloja membrane se razlikuje, što odražava raz-

ličite funkcije dve površine. Sem toga, i različite membrane u okviru jedne eukariotske ćelije imaju različite lipidne i proteinske molekule, ali osnovni plan građe je isti za sve intraćelijske membrane, kao i za plazma-membranu.

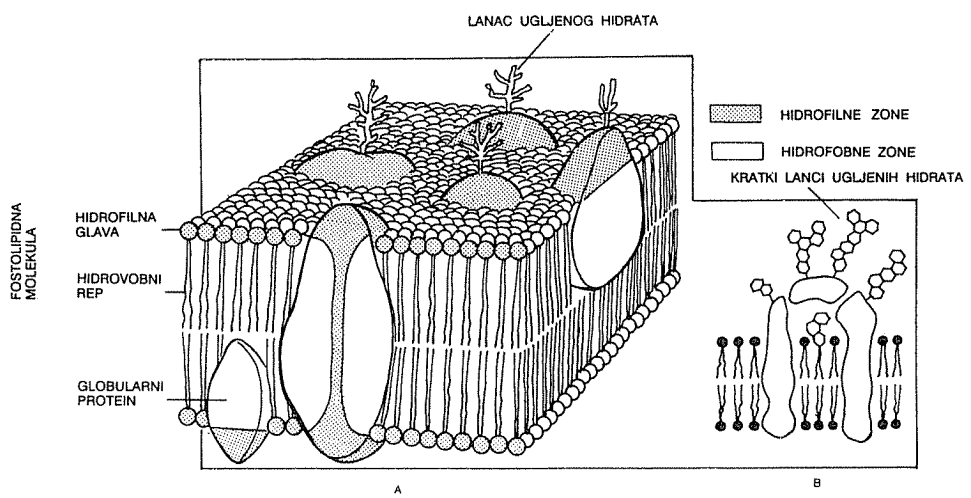
U plazma-membrani svih eukariotskih ćelija, većina proteina koji izlaze na površinu ćelije i neke od lipidnih molekula u spoljašnjem lipidnom sloju imaju kovalentno vezane lance oligosaharida. Iako njihova funkcija još nije poznata, veruje se da barem neki od ovih oligosaharidnih lanaca igraju ulogu u procesu ćelijskog prepoznavanja, odnosno u interćelijskoj komunikaciji.

Šećerne grupe glikolipida i glikoproteina plazma-membrane i unutrašnjih membrana su locirane isključivo na površini membrane koja nije uz citoplazmu: u plazma-membrani prema spolja, a u unutrašnjim membranama prema lumenu odeljka okruženog membranom. Zona na površini ćelije bogata ugljenim hidratima koji polaze sa glikoproteina adsorbovanih na površinu naziva se ***glikokaliks*** (sl. 1.7. b).

Unutrašnje membrane (organele)

Mnogi vitalni biohemijski procesi (kao što su oksidativna fosforilacija, fotosinteza, sinteza novih komponenti membrane) odvijaju se u membrani ili na njenoj površini. U odnosu na volumen eukariotske ćelije, plazma-membrana je suviše mala da bi sama mogla obezbediti dovoljnu površinu ili smestiti dovoljno membranskih enzima za izvođenje vitalnih funkcija. Stoga unutrašnjost ćelije sadrži veliku količinu dodatnih membrana koje se hemijski i fizički razlikuju od plazma-membrane, kao i međusobno. Unutrašnje membrane dele ćeliju na funkcionalno različite odeljke označene kao ***ćelijske organele.*** Svaki odeljak ograničen zatvorenom, selektivno propustljivom membranom snabdeven je posebnim setom enzima, koji im omogućavaju izvođenje specijalizovanih funkcija.

Čak i najsloženije eukariotske ćelije sadrže samo nekoliko glavnih unutarćelijskih odeljaka. Odeljak koji sadrži najveći deo DNK – jedro – odvojen je dvostrukom membranom od ostalog sadržaja ćelije-citoplazme, u kojoj se odvija



Slika 1.7 – Model ćelijske membrane (A), glikokaliks (B)

većina metaboličkih reakcija i u kojoj se nalaze odeljci sa različitim funkcijama: citosol, endoplazmatički retikulum, Goldžijev aparat, mitohondrije, lizosomi i peroksisomi. Biljne ćelije sadrže i dodatni odeljak – organelu, hloroplast.

Citosol

Pod ovim pojmom se podrazumeva deo citoplazme van ćelijskih organela koji zauzima oko 55% ukupnog ćelijskog volumena. U citosolu se odvija najveći deo ***intermedijarnog metabolizma***, kojeg čini veliki skup hemijskih reakcija kroz koje ćelija degradira neke male molekule (zadržavajući najveći deo njihove hemijske energije u vidu ATP-a), a sintetiše druge molekule kao prekursore za makromolekule neophodne za strukturu, funkciju i rast ćelije. Citosol je ispunjen hiljadama enzima koji katalizuju reakcije glikolize i biosinteze ključnih molekula (šećera, masnih kiselina, nukleotida i aminokiselina).

Sem toga, citosol sadrži niz različitih proteinskih vlakana, koja održavaju oblik ćelije, omogućavaju pokrete citoplazme i verovatno obezbeđuje mesta za koja će se pričvrstiti druge ćelijske strukture. Ova vlakna predstavljaju ćelijski skelet ili ***citoskelet*** (sl. 1.6). Citoskelet sačinjavaju debeli filamenti – mikrotubule (sastavljene od tubulina), tanki filamenti – mikrofilamenti (sastavljeni uglavnom od aktina) i najmanje pet različitih tipova intermedijarnih filamenata (svaki je sastavljen od drugog tipa proteina).

U citosolu se nalaze i ***inkluziona telašca*** (granule) kao što su granule glikogena u ćelijama jetre i mišića ili velike kapljice masti (rezervna forma masnih kiselina) u masnim ćelijama adipoznog tkiva.

Zbog velike koncentracije proteina (20% težine citoskeleta čini protein) citosol je želatinozna masa isprepletena fibrilama citoskeleta. Veruje se da je citosol visoko organizovan, sa većinom proteina vezanih za fibrile i/ili lokalizovanih u specifičnim regionima.

U citosolu se takođe nalazi i veliki broj ***ribosoma***. Ribosomi su velike ribonukleoproteinske partikule na kojima se odvija sinteza proteina. Svaki ribosom se sastoji iz velike i male subjedinice, koje se reverzibilno razdvajaju nakon svakog kruga sinteze proteina. Mala subjedinica, čiji je ukupni koeficijent sedimentacije 40S (S je oznaka za Svedbergove jedinice koje predstavljaju meru brzine sedimentacije različitih ribosomskih komponenti kada se centrifugiraju pod standardnim uslovima), sastoji se od jedne molekule rRNK (18S) koja je vezana za oko 33 različita ribosomska proteina. U sastav velike subjedinice, 60S, ulaze tri različite molekule rRNK (5,8S, 28S, 5S) i više od 40 različitih ribosomskih proteina. Molekule rRNK, kojih je po težini nešto više nego proteina, formiraju kostur na koji se spontano skupljaju različiti proteini, svaki prisutan u jednoj kopiji po ribosomu (sl. 1.8).

Na ribosomima citosola sintetišu se proteini citosola, kao i enzimi koji katalizuju hemijske reakcije intermedijarnog metabolizma.

Endoplazmatički retikulum (ER)

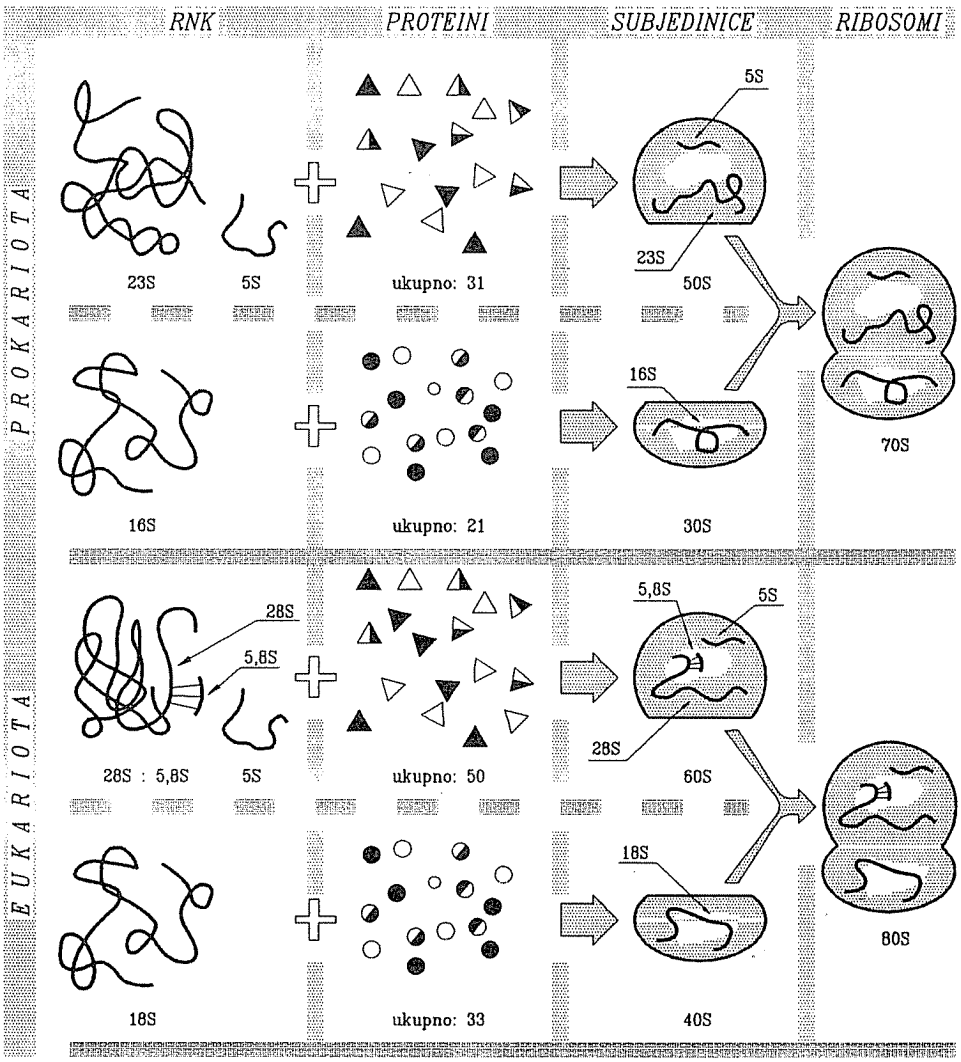
Sve ćelije sadrže ER, na čiju membranu obično otpada više od polovine ukupnih membrana ćelije. Ova membrana je veoma izuvijana, tako da izgleda kao niz međusobno povezanih kesica i kanala. Membrana razdvaja lumen ER od citosola i posreduje u komunikaciji između ova dva odeljka.

U pogledu funkcije i oblika postoje dva različita regiona ER: ***granulirani ER***, na čijoj se površini nalaze ribosomi i glatki ili ***agranulirani ER*** (sl. 1.6) koji je fizički deo iste membrane, ali nema ribosome na svojoj površini. U ER se sintetišu proteini (na ribosomima), lipidi, složeni ugljeni hidrati, koji se dalje transportuju u Goldžijev aparat, lizosome,

plazma-membranu ili van ćelije. Stoga razumevanje biohemije ER ima presudan značaj za razumevanje mnogih drugih ćelijskih struktura.

Granulirani ER izgleda kao niz, naslaganih jedna na drugu, spljoštenih kesica (cisterne). Prisutan je u svim ćelijama sem u spermatozoidima, a posebno je obilan u ćelijama specijalizovanim za proizvodnju sekretornih proteina, kao što su, npr., acinozne ćelije pankreasa, koje luče digestivne enzime, ili plazma-ćelije, kóje produkuju antitela. Sem sekretornih proteina, u granuliranom ER sintetišu se i neki proteini koji ulaze u sastav membrana (plazma-membrane i unutarćelijskih membrana), kao i glikoproteini.

Po današnjem shvatanju, ribosomi vezani za ER ustvari su slobodni ribosomi



Slika 1.8 – Građa ribosoma prokariota i eukariota.

citosola, koje signalna sekvenca na amino- kraju polipeptida koji nastaje usmerava na membranu ER. Signalna sekvenca prolazi kroz receptorni protein na membrani ER, čime se veća subjedinica ribosoma čvrsto vezuje za membranu.

Signalne sekvence imaju i neki proteini koji se sintetišu u citosolu, a zatim se, procesom koji zahteva energiju, unose u unutrašnjost mitohondrija i hloroplasta. Očigledno da na proteinima moraju da postoje mnogi različiti tipovi signalnih sekvenci, koji upravljaju proteine prema različitim odredištima.

Većina proteina sakupljenih u lumenu granuliranog ER glikoziliše se pre izlučivanja iz ćelije ili transportovanja u druga unutarćelijska odredišta (Goldžijev aparat, lizosomi ili plazma-membrana). Oligosaharid dodat peptidu u ER počinje sa modifikacijom, koja se nastavlja u Goldžijevom aparatu.

Glatki ER predstavlja fizički deo istog membranoznog sistema, ali bez ribosoma i u obliku mreže finih tubula. Količina ovog ER varira u različitim ćelijama. U većini ćelija, posebno u većini sekretornih ćelija, glatki ER predstavlja samo mali region granuliranog ER. Takvi regioni se obično označavaju kao *prelazni ER* i predstavljaju specijalizovane delove ER sa kojih se odvajaju vezikule koje transportuju novosintetisane proteine i lipide u unutrašnjost ćelije.

Međutim, glatki ER je veoma razvijen u ćelijama specijalizovanim za metabolizam lipida. Na primer, hepatociti (ćelije jetre) su glavno mesto proizvodnje lipoproteina koji se izlučuju iz ćelije, a enzimi koji sintetišu lipidnu komponentu lipoproteina nalaze se u membrani glatkog ER. Zatim, ovde se nalaze i enzimi koji modifikuju razna štetna jedinjenja (npr., pesticide, kancerogene materije) u jedinjenja rastvorljiva u vodi, koja se mogu izlučiti iz organizma putem urina. Ako se eksperimentalne životinje tretiraju ovakvim jedinjenjima (npr., fenobarbitolom) u hepatocitama dolazi do velike proliferacije glatkog ER.

I neki drugi tipovi ćelija imaju razvijen glatki ER – npr., ćelije u kojima se sintetišu steroidni hormoni iz holesterola, kao što je slučaj sa ćelijama testisa. U glatkom ER se nalaze enzimi neophodni za sintezu holesterola i za njegovu modifikaciju u steroidne hormone. Mišićne ćelije takođe imaju bogat i specijalizovan glatki ER nazvan sarkoplazmatički retikulum, koji pomoću enzima Ca^{++}–ATP-aze (glavni protein ove membrane) upumpava Ca jone iz citosola. Otklanjanje Ca^{++} iz citosola omogućava opuštanje miofibrila nakon svake mišićne kontrakcije.

Jedna od glavnih funkcija glatkog ER je proizvodnja lipida. Fosfolipidi i holesterol, osnovni gradivni elementi svih membrana, sintetišu se na glatkom ER. Zapravo se svi ćelijski lipidi, sem masnih kiselina koje se sintetišu u citosolu i nekih fosfolipida mitohondrija, sintetišu u ovim membranama.

Lipidi i proteini koji ulaze u sastav membrana Goldžijevog aparata, lizosoma i plazma-membrane transportuju se zajedno sa endoplazmatičnog retikuluma u obliku malih vezikula, koje se odvajaju sa membrane ER i zatim se spajaju sa membranama ovih organela, omogućavajući njihov rast.

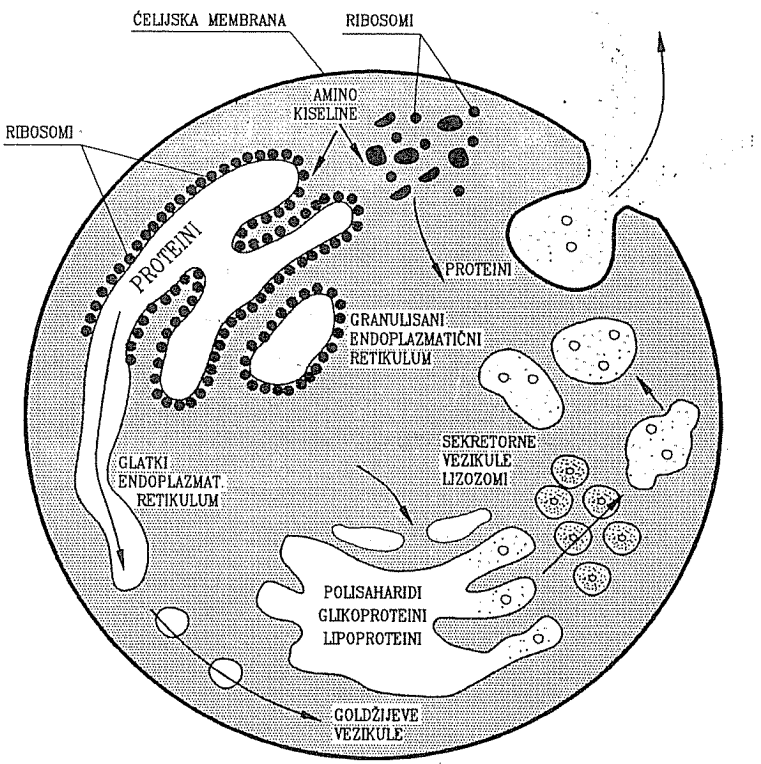
Proteini i lipidi iz lumena ER (npr., sekretorni proteini, različiti enzimi namenjeni drugim organelama, steroidni hormoni) koji se izlučuju iz ćelije ili su namenjeni drugim organelama u ćeliji pakuju se takođe u male transportne vezikule, obložene jednim fibrilarnim proteinom. Ove vezikule se odvajaju pupljenjem sa prelaznog dela ER. Kada se ove vezikule fuzionišu sa membranama unutrašnjih organela ili plazma-membranom, postaju sastavni deo ovih membrana uz istovremeno oslobađanje sadržaja u lumen organele, odnosno izlučivanje van ćelije.

Goldžijev aparat (Goldžijeve vezikule)

Nakon sinteze u granuliranom ER sekretorni proteini prelaze u lumen jednog drugog membranom okruženog odeljka, koji se sastoji od kontinualne serije spljoštenih, diskoidalnih, membranoznih cisterni, a koji se označava kao Goldžijev aparat (sl. 1.6). Ova struktura podseća na naslagane tanjire i obično se nalazi u blizini jedra, a broj ovih struktura može da varira od jedne do nekoliko stotina u zavisnosti od tipa ćelija.

Goldžijev aparat ima dva različita regiona: cis-region u blizini glatkog, prelaznog dela granularnog ER, sa kojim se fuzionišu vezikule koje dolaze sa ER, i *trans*-region, koji je bliži plazma-membrani i uz koji su vezane velike sekretorne vezikule. Oko celog aparata se nalazi niz malih vezikula, od kojih su neke obložene proteinom. Ove vezikule, izgleda, transportuju proteine ka Goldžijevom aparatu i iz njega. Smatra se da proteini ulaze u Goldžijev aparat iz ER sa cis-strane, a izlaze prema različitim odredištima sa trans-strane. Nije još jasno kako se proteini kreću od lumena ER ka lumenu Goldžijevog aparata, ali se pretpostavlja da ovaj transport obavljaju male membranozne vezikule koje se sa svojim sadržajem odvajaju od ER i zatim fuzionišu sa Goldžijevom vezikulom.

Goldžijev aparat je, verovatno, glavni upravljač kretanja makromolekula u ćeliji (sl. 1.9). Mnogi tipovi molekula prolaze kroz njegove strukture ubrzo nakon sinteze u ER: proteini i glikoproteini koji



Slika 1.9 – Interakcija organela u sintezi proteina i u "pakovanju" makromolekula koje se izlučuju

se izlučuju, glikolipidi i glikoproteini plazma-membrane, proteini (enzimi) lizosoma. Goldžijev aparat ima ključnu ulogu u modifikaciji i sortiranju ovih molekula i upravljanju ka odgovarajućem odredištu. Ovu funkciju obavlja Goldžijev aparat pomoću brojnih enzima koji modifikuju makromolekule najčešće menjanjem oligosaharida koji su vezani za proteine još u ER, zatim novom glikozilacijom određenih aminokiselina u proteinu, sulfacijom, dodavanjem masnih kiselina i proteolizom. Svrha ovih modifikacija je, izgleda, sazrevanje i obeležavanje proteina, kako bi mogli biti sortirani i transportovani prema pravom odredištu u ćeliji. Proteini visokospecijalizovanih sekretornih ćelija koncentrišu se i deponuju u sekretornim vezikulama koje su povezane sa Goldžijevim aparatom. Ove vezikule se egzocitozom prazne u međućelijski prostor, kada je ćelija stimulisana specifičnim signalom. Na primer, stimulans za egzocitozu u acinoznim ćelijama pankreasa (egzokrine ćelije koje luče različite digestivne enzime) ili je acetil-holin (neurotransmiter), ili holecistokinin (hormon). Ove signalne molekule oslobađaju nervi, odnosno ćelije creva, kada su za varenje potrebni enzimi pankreasa.

Membrane svih transportnih vezikula (uključujući i sekretorne vezikule) nakon pražnjenja svog sadržaja (kroz fuziju sa ciljnom membranom) ponovo se izdvajaju i fuzionišu sa organelom od koje potiču.

Glavnu ulogu u sortiranju unutarćelijskih proteina, izgleda, imaju obložene vezikule proteinom. Obložene vezikule transportuju proteine od ER do Goldžijevog aparata i od Goldžijevog aparata do plazma-membrane. Izgleda da su neophodne različite vrste obloženih vezikula za izvođenje niza različitih funkcija.

Ove vezikule su obložene poliedralnim omotačem koji je primarno sastavljen od strukturnog (fibrilarnog) proteina klatrina i manjih polipeptida, koji su povezani sa različitim akcesornim proteinima membrane transportne vezikule. Akcesorni proteini imaju, izgleda, dve važne funkcije: vezuju specifične molekule koje treba transportovati na lumenskoj (necitosolnoj) površini i prepoznaju komplementarne receptore na ciljnim membranama. Omotač vezikule, izgleda, omogućava njeno izdvajanje putem pupljenja membrane, zajedno sa odgovarajućim sadržajem, a selektivnost omogućavaju akcesorni proteini u membrani vezikule, koji hvataju određene molekule za transport i isporučuju ih određenim membranama.

Lizosomi

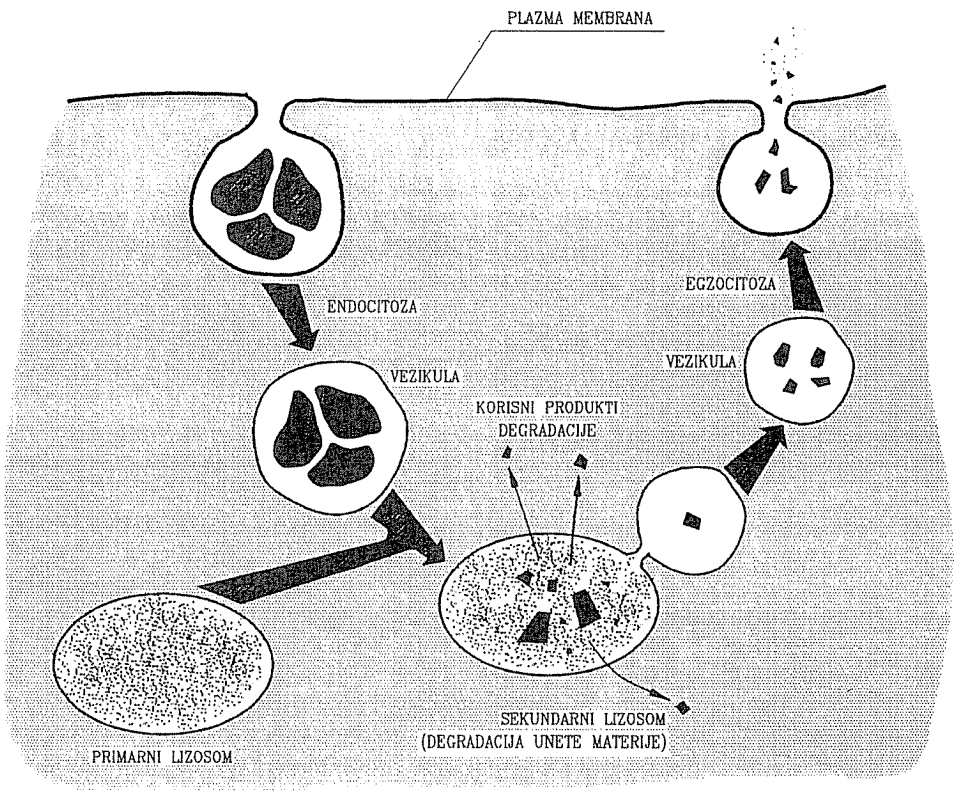
Lizosomi su membranozne kesice (sl. 1.6) koje sadrže hidrolitičke enzime, koji se koriste u kontrolisanom unutarćelijskom varenju makromolekula. Danas je poznat veliki broj hidrolitičkih lizosomskih enzima (proteaze, nukleaze, glikozidaze, lipaze, fosfolipaze, fosfataze i sulfataze), koji su optimalno aktivni blizu pri pH oko 5 i stoga se nazivaju kisele hidrolaze. Citoplazma je zaštićena od njihovog dejstva jer je membrana lizosoma normalno nepropustljiva za ove enzime, a i njihova aktivnost je uslovljena kiselim pH.

Kao i ostale ćelijske organele, lizosomi poseduju jedinstvenu membranu, koja dozvoljava finalnim produktima varenja makromolekula da izađu, tako da mogu biti izlučeni ili ponovo korišćeni u ćeliji. Sem toga, smatra se da membrana sadrži specijalne transportne proteine koji, koristeći energiju dobijenu hidrolizom ATP-a, pumpaju H^+ u lumen lizosoma i na taj način održavaju nizak pH u lumenu. Membrana mora, takođe, sadržati proteine (receptore) na osnovu kojih je prepoznaju specifične transportne vezikule pre fuzije.

Za razliku od relativno ujednačene ultrastrukture ostalih ćelijskih organela, lizosomi su veoma raznoliki po obliku i veličini. Obično se razlikuju dve opšte klase lizosoma: ***primarni lizosomi,*** koji su novoformirani i stoga još ne sadrže supstrat za varenje, i ***sekundarni lizosomi,*** koji imaju različitu morfologiju i sadrže supstrat (sl. 1.10). Supstrat (krupnije čestice i molekule) ulazi u ćeliju tako što biva obuhvaćen plazma-membranom (fagocitoza, endocitoza), pri čemu se formira jedna vezikula. Vezikula sa supstratom se zatim spaja sa primarnim lizosomom koji sadrži enzime i formira se sekundarni lizosom u kome se vrši varenje unetih materija. Morfologija sekundarnog lizosoma zavisi će od vrste supstrata; veliki će biti posledica fagocitoze, a mali endocitoze.

Postoje citološki dokazi da primarni lizosomi nastaju "pupljenjem" i zatim odvajanjem od trans-strane Goldžijevog aparata. Postoje i indirektni dokazi da se enzimi lizosoma – kisele hidrolaze – sintetišu na granuliranom ER, u čijem se lumenu glikozilišu i zatim prenose u Goldžijev aparat. Receptori u membrani Goldžijevog aparata prepoznaju specifični oligosaharid glikoproteina i omogućavaju pakovanje specifičnih hidrolaza u obložene vezikule koje postaju primarni lizosomi.

U lizosomima se degradiraju i različite membrane, proteini i drugi sastavni delovi ćelije, koji joj više ne koriste ili su defektni, ali još nije poznato na koji način se označavaju za degradaciju i prenose u lizosome.



Slika 1.10 – Degradacije unete materije pomoću lizosoma.

U čoveka postoje brojni *nasledni poremećaji lizosomskog metabolizma,* od kojih su mnogi praćeni teškim kliničkim manifestacijama. Za ove poremećaje je karakterističan nedostatak neke od specifičnih kiselih hidrolaza, a kao posledica se javlja nagomilavanje njenog supstrata u lizosomu. U zavisnosti od toga koji enzim nedostaje, bilo koja od različitih supstancija može da se akumulira (mukopolisaharidi, glikoproteini, glikogen, lipidi, glikolipidi). Lizosomi sa akumuliranim supstancijama onemogućavaju normalno funkcionisanje ćelije i izazivaju kliničke manifestacije specifičnog oboljenja.

Jedan tip lizosomskih poremećaja je mukopolisaharidoza koju karakteriše ogromna akumulacija mukopolisaharida u lizosomima. Primer mukopolisaharidoze je Hurlerovo oboljenje, pri kome se razvijaju karakteristične deformacije kostiju.

Primer nedostatka hidrolaza koje degradiraju sastavne delove ćelijske membrane je autosomno recesivno Tay-Sachsovo oboljenje. Ovo nasledno oboljenje rezultira mentalnom retardacijom, poremećajem centralnog nervnog sistema i smrću oko pete godine života. U normalnih ljudi se konstantno sintetiše i degradira glikolipid, gangliozid G_{M2}, koji se nalazi u sastavu plazma-membrane mnogih sisarskih ćelija, posebno nervnih ćelija. Kod osoba sa Tay-Sachsovim oboljenjem, zbog odsustva specifične lizosomske hidrolaze, ovaj gangliozid se akumulira u membranama moždanih ćelija.

Peroksisomi

Peroksisomi su male, membranom okružene organele (sl. 1.6), prisutne u svim animalnim ćelijama (glioksisomi su slične organele biljnih ćelija). Sadrže enzime za oksidaciju (pomoću molekularnog kiseonika) masnih kiselina i aminokiselina, pri čemu se kao nusprodukt stvara vodonik-peroksid (H_2O_2). Potencijalno štetan efekat vodonik-peroksida sprečava velika količina enzima katalaza, koje ga razlažu na vodu i kiseonik:

$$2\ H_2O_2 \xrightarrow{\text{katalaza}} 2\ H_2O + O_2.$$

Prava uloga peroksisoma u ćelijskom metabolizmu nije još jasna, jer se mnoge reakcije razlaganja katalizovane enzimima javljaju i u drugim organelama, ali bez sinteze i razlaganja H_2O_2. Pretpostavlja se da je jedna od funkcija peroksisoma oslobađanje toplotne energije (a ne sinteza ATP-a) kao produkta katabolizma molekula bogatih energijom, npr. masnih kiselina.

Peroksisomi nastaju pupljenjem glatkog ER, a njegovi enzimi se sintetišu na ribosomima u citosolu, odakle se transportuju u peroksisom (u toku njegovog formiranja) procesom koji uključuje specifično prepoznavanje njegove membrane.

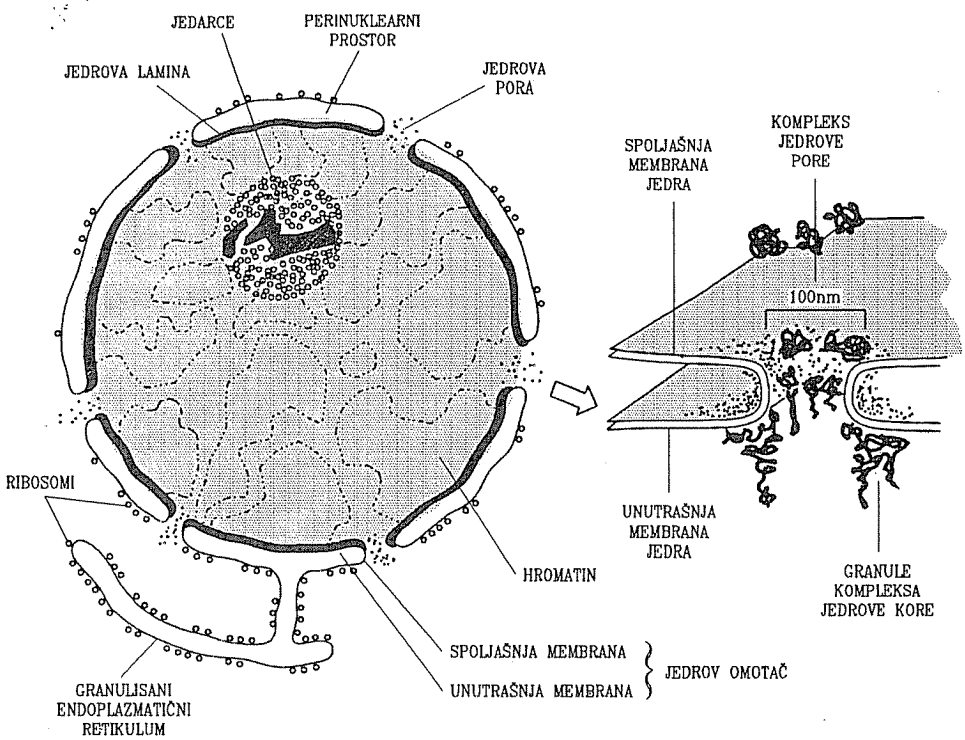
Organele sa duplom membranom

Jedro, mitohondrije i hloroplasti su organele okružene sa dve odvojene membrane koje čine *omotač organele.* Svaka od ove dve membrane se sastoji od dva sloja lipida, ali proteini koji ulaze u njihov sastav vrlo su različiti, što odražava njihove različite funkcije. Između spoljne i unutrašnje membrane nalazi se *intermembranski prostor.*

Jedro (nukleus)

Jedro eukariotske ćelije je najupadljivija, velika, često okrugla organela. Sadržaj jedra – *nukleoplazma* – odvojen je od citoplazme membranama *jedrovog omotača* (sl. 1.11). Jedrov omotač se sastoji od dve membrane (svaka sadrži dva sloja lipida) odvojene *perinuklearnim prostorom.*

Spoljašnja membrana je u kontinuitetu sa membranom ER i često se na njoj nalaze ribosomi uključeni u sintezu proteina. Pošto je lumen ER u kontinuitetu sa perinuklearnim prostorom, spoljašnja



Slika 1.11 – Poprečni presek jedra i trodimenzijski prikaz kompleksa jedrove pore u jedrovom omotaču.

membrana i perinuklearni prostor mogu se smatrati malim i specijalizovanim regionima ER.

Unutrašnja membrana je povezana sa spoljašnjom u određenim regionima – *jedrovim porama.* Dakle, dve membrane su u fizičkom kontinuitetu, iako su funkcionalno i biohemijski različite. Zahvaljujući kontinuitetu sa ER, membrana jedra može brzo da se širi i skuplja direktnom razmenom materija sa membranom ER, što olakšava brze promene u membrani, koje prate dezintegraciju i ponovno formiranje membrane u toku mitoze. Membrana se takođe veoma mnogo širi kada jedro započne sintezu RNK i DNK.

Sve RNK i ribosomi sintetišu se u jedru da bi zatim prešli u citosol, dok se proteini koji funkcionišu u jedru sintetišu u citosolu i moraju biti uneseni u jedro. Smatra se da se ova razmena odvija preko jedrovih pora. Svaka pora je okružena na obe strane omotača sa osam velikih granula. Ova struktura se naziva ***kompleks jedrove pore*** i ona, verovatno, selektivno transportuje velike čestice: iznosi mehanizmom aktivnog transporta nove ribosomske subjedinice i RNK, koje su se prethodno vezale za posebne proteine u ribonukleoproteinske komplekse, a unosi velike molekule (npr., DNK- i RNK-polimeraze) koje se izduže i tako difunduju, ili ih neki protein sa ivice pore transportuje kroz poru šireći kanal. Često se viđa pora zatvorena ***centralnom granulom,*** za koju se pretpostavlja da je novi ribosom ili druga molekula zatečena u prolazu.

U nukleoplazmi se nalazi sva hromosomska DNK, koja je povezivanjem sa jednakom masom histonskih proteina

spakovana u hromosomska vlakna. O hromatinu i hromosomima biće mnogo više reči u jednom od sledećih poglavlja.

U interfaznom jedru hromosomi su izduženi i nevidljivi pod svetlosnim mikroskopom, ali se dobro uočava *jedarce* (nukleolus). Nukleolus(i) se organizuje oko posebnog regiona, jednog ili više hromosoma označenog kao ***organizator nukleolusa.*** Ovaj region sadrži brojne kopije gena za ribosomsku RNK, koji su poređani u tandemskom nizu. Primarni prepis rRNK se odmah povezuje sa ribosomskim proteinima i daljom obradom (isecanjem) daje gotove (ili polugotove) ribosomske subjedinice koje napuštaju nukleolus i prolaze kroz jedrove pore u citoplazmu. Dakle, nukleolus predstavlja akumulaciju prekursora rRNK (povezanih sa ribosomskim proteinima) i polugotovih ribosomskih subjedinica, oko organizatora nukleolusa.

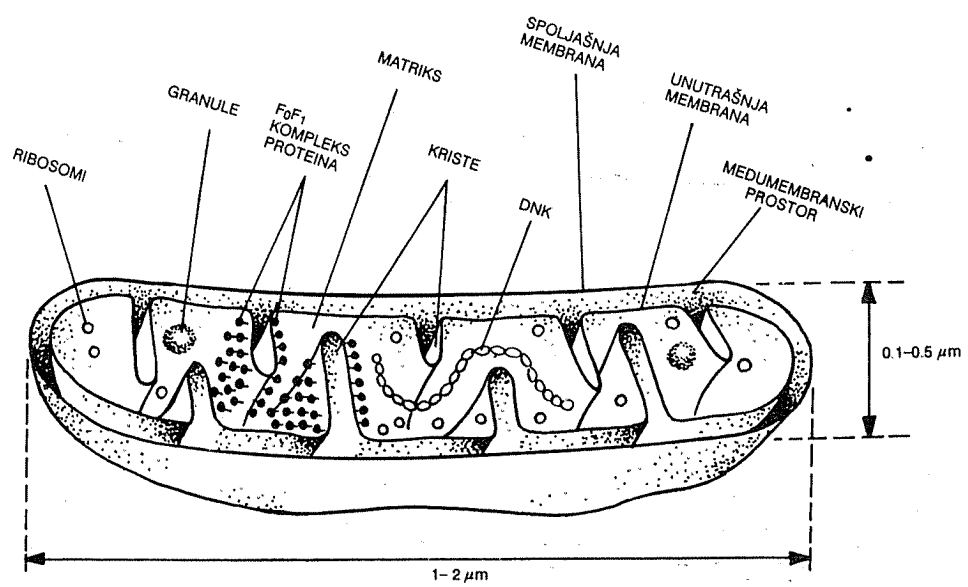
Glavna fiziološka uloga jedra je da upravlja sintezom RNK. U ćelijama koje rastu ili se diferenciraju jedro je mesto intenzivne metaboličke aktivnosti.

Mitohondrije i hloroplasti

Mitohondrije i hloroplasti su organele u kojima se proizvodi ATP, samo što za taj proces koriste različite izvore energije: mitohondrije šećere i masne kiseline, a hloroplasti svetlost. Stoga su obe organele organizovane na istim opštim principima i obe sintetišu ATP mehanizmima koji su u osnovi isti. Mitohondrije su skoro univerzalna karakteristika eukariotskih ćelija, dok se hloroplasti nalaze samo u onim eukariotskim ćelijama koje su sposobne za fotosintezu – dakle, biljkama. Za obe organele se smatra da su simbiotskog porekla.

Mitohondrije

Većina eukariotskih ćelija sadrži veliki broj mitohondrija. Spadaju među najveće organele u ćeliji i mogu zauzimati skoro 25% volumena citoplazme (sl. 1.12). Uočavaju se i pod svetlosnim mikroskopom, ali detalji njihove strukture su vidljivi samo pod elektronskim mikroskopom.



Slika 1.12 – Građa mitohondrije.

Dve membrane mitohondrija veoma se razlikuju. Spoljašnja sadrži oko 50% lipida i 50% proteina; među njima su i *porini,* proteini koji čine ovu membranu veoma propustljivom za velike molekule.

Unutrašnja membrana sadrži znatno više proteina nego ostale ćelijske membrane (oko 80% proteina i 20% lipida) i znatno manje je propustljiva od spoljašnje membrane mitohondrije. Sem toga, unutrašnja membrana stvara veliki broj invaginacija ili ***krista*** koje ulaze u centralni prostor ili ***matriks.*** Na kristama prema matriksu nalaze se brojne kratke izbočine (čvorići), koje se zajedno označavaju kao F_0F_1 kompleks proteina, a predstavljaju enzimski sistem (ATP-sintetaze) koji sintetiše ATP iz ADP-a i Pi. U samoj unutrašnjoj membrani nalaze se enzimi koji učestvuju u vezivanju kiseonika i transportu elektrona i protona, kao i permeaze - proteini koji transportuju molekule, kao što su ADP, ATP, fosfat i citrat, tako što formiraju kanale kroz koje molekule mogu ulaziti i izlaziti iz mitohondrije. Matriks je ispunjen enzimima koji katalizuju brojne reakcije uključujući i konverziju acetil-CoA u CO_2, a sadrži i neke jone, posebno Ca^{++} i HPO_4^{++}.

U matriksu mitohondrije nalazi se nekoliko kopija relativno malih, cirkularnih molekula DNK, koje se označavaju kao mitohondrijalna DNK. Veličina DNK varira od organizma do organizma, ali obično ne sadrži više od male frakcije ukupne DNK u ćeliji; npr., mitohondrijalna DNK čoveka je zatvorena cirkularna molekula veličine 16.569 baznih parova. Mitohondrijalna DNK sadrži informaciju za 5 do 6 ključnih proteina unutrašnje membrane, kao i za mitohondrijalne ribosome, koji se takođe nalaze u matriksu i koji se razlikuju (manji su) od ribosoma citosola. Međutim, za većinu mitohondrijalnih proteina genetička informacija se nalazi u DNK jedra, a njihova sinteza se odvija na ribosomima citosola, nakon čega se transportuju u mitohondriju.

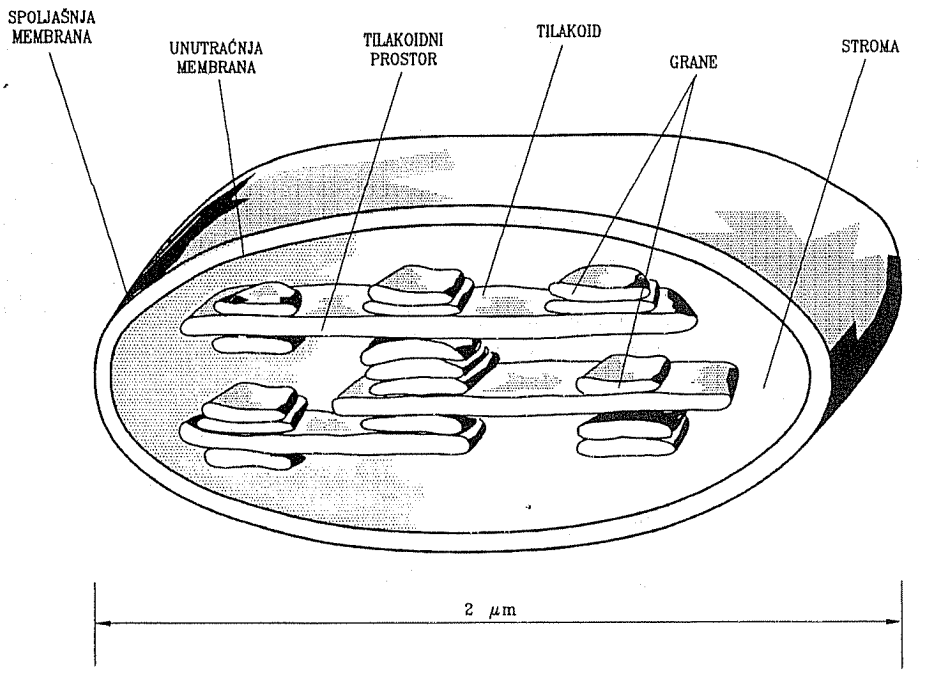
Zbog niza sličnosti sa bakterijama pretpostavlja se, kao što je već ranije rečeno, da su mitohondrije potomci aerobnih bakterija koje su unesene endocitozom u ćelije primitivnih anaerobnih organizama sa kojima su uspostavili simbiotske odnose. Smatra se da su iz ovakvih organizama evoluirale eukariotske ćelije.

Hloroplasti

Hloroplasti su, izuzimajući vakuole, najveće i najkarakterističnije organele ćelija zelenih biljaka i zelenih algi. Kao i mitohondrije, nemaju fiksirano mesto u ćeliji i često migriraju sa jednog mesta na drugo. Variraju u veličini i obliku u različitim ćelijama. Oko 35% suve težine čine lipidi, 5% proteini i 7% pigmenti, među kojima je najzastupljeniji hlorofil Q, koji hvata svetlost i daje hloroplastu zelenu boju.

Hloroplasti su slični mitohondrijama, s tim što sadrže i treću membranu (sl. 1.13). Okruženi su, kao i mitohondrije, spoljašnjom visokopermeabilnom i unutrašnjom manje permeabilnom membranom u koju su položeni specijalni transportni proteini - permeaze. U lumenu hloroplasta je stroma, koja je analogna matriksu mitohondrije i sadrži mnoštvo različitih solubilnih enzima. Treća membrana, nazvana ***tilakoidna membrana,*** formira kao disk spljoštene, paralelno postavljene kesice - ***tilakoide,*** koji su često naslagani jedan na drugi formirajući *grane.*

Tilakoidna membrana sadrži fotosintetičke sisteme za apsorpciju svetla, lanac za transport elektrona i ATP- sintetazu. Lumeni tilakoida su međusobno povezani i stvaraju zaseban unutrašnji odeljak - ***tilakoidni prostor,*** izdvojen od strome, nepropustljivom za jone, tilakoidnom membranom. Glukoza i druge molekule formirane u stromi tokom fotosinteze



Slika 1.13 – Građa hloroplasta

izlaze u citoplazmu pomoću permeaza – transportnih proteina u membrani, koji takođe omogućavaju i ulazak određenih hemijskih supstancija u hloroplast. Veliki deo glukoze, formiran tokom fotosinteze, deponuje se u obliku granula skroba u hloroplastu.

Tilakoidna membrana sadrži pigmente i enzime koji učestvuju u hvatanju svetlosne energije i stvaranju ATP-a u procesu fotofosforilacije. Na tilakoidnoj membrani nalaze se proteinske partikule (čvorići), slične F_0F_1-proteinima mitohondrije, na kojima se stvara ATP iz ADP-a i Pi. Drugi važan produkt fotofosforilacije je redukovani nikotinamid-adenin-dinukleotid (NADPH), koji zajedno sa ATP-om učestvuje u konverziji CO_2 u međuprodukte u sintezi glukoze. Ovaj proces, označen kao fiksacija CO_2, odvija se u stromi. Na osnovu biohemijskih dokaza, smatra se da su hloroplasti potomci cijanobakterija koje su se nastanile u primitivnim eukariotskim ćelijama.

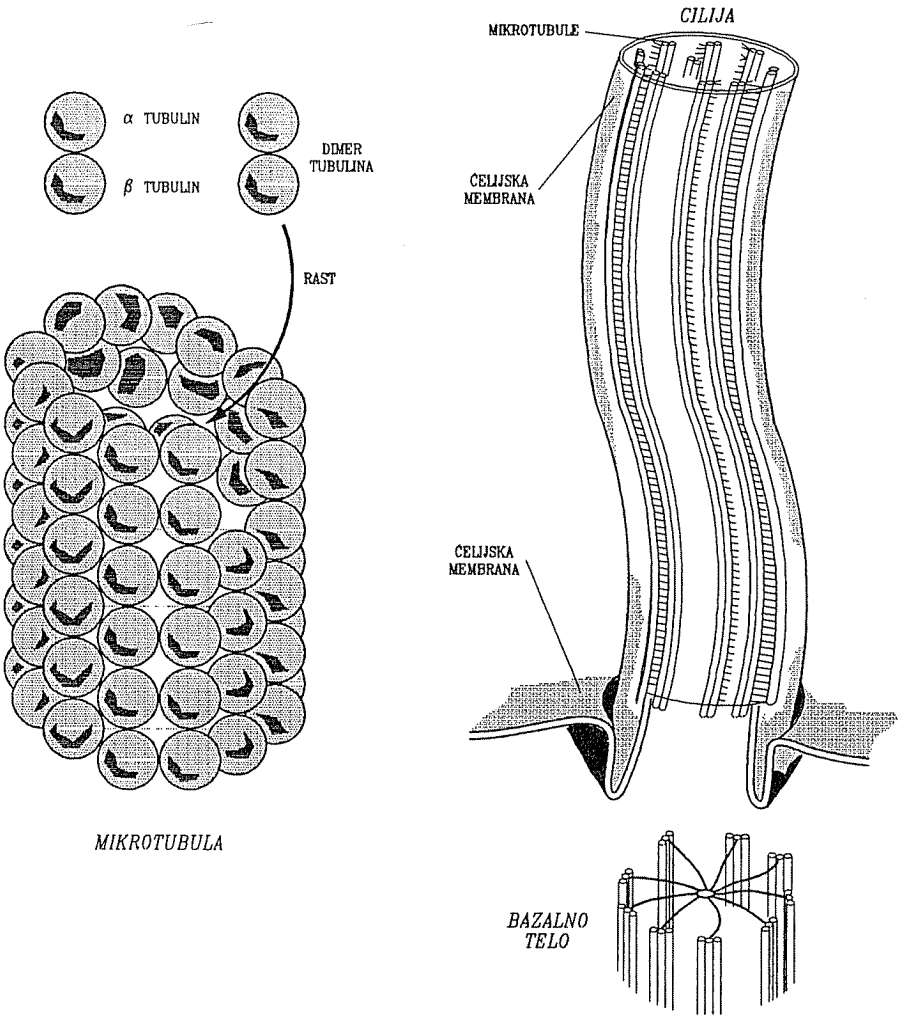
Flagele i cilije

Sve ćelije pokazuju neki oblik kretanja, bilo da je reč o strujanju citoplazme (ciklozis), kretanju hromosoma i promeni u obliku ćelije za vreme deobe ili o kretanju same ćelije, kao što je slučaj npr., sa embrionalnim ćelijama koje migriraju u toku razvića, ili sa jednoćelijskim organizmima koji se kreću prema fizičkim i hemijskim nadražajima ili u suprotnom pravcu od njih. Postoje dva različita molekularna mehanizma ćelijskog kretanja. Jedan se bazira na sakupljanju fibrilarnih proteina aktina i miozina (proteini mišića), a drugi na sakupljanju mikrotubula u cilijama i flagelama.

Cilije (treplje) i *flagele (bičevi)* su dugačke i tanke strukture koje polaze sa

površine mnogih eukariotskih ćelija. Struktura im je ista a razlikuju se samo u dužini; flagele su duže. Prokarioti takođe imaju flagele, ali drugačije strukture. Cilije i flagele su prisutne u celokupnom živom svetu: pomoću njih se kreću jednoćelijski organizmi, sitne životinje kao što su neki pljosnati crvi, kao i spermatozoidi mnogih životinja pa i čoveka.

Sve flagele i cilije eukariota imaju istu strukturu: devet parova mikrotubula formira prsten u čijem su centru dve dodatne mikrotubule (sl. 1.14). Mikrotubule se sastoje od velikog broja subjedinica, a svaka od njih sadrži dva globularna proteina α i β tubulin), koji se helikoidno slažu gradeći šuplju cevčicu do potrebne dužine, da bi se nakon obavljenog zadatka opet razdvojile. Na jednoj iz svakog para spoljašnjih mikrotubula nalaze se brojni enzimi koji razlažu ATP u ADP pretvarajući hemijsku energiju u kinetičku.



Slika 1.14 – Građa cilije, bazalnog telašca i mikrotubule

Bazalna telašca i centrioli

U osnovi svake cilije je struktura označena kao bazalno telašce, koje je istog promera kao i cilija. Sastoji se takođe od mikrotubula, ali raspoređenih u 9 tripleta na periferiji bez mikrotubula u centru (sl. 1.14). Cilije i flagele izrastaju iz bazalnog telašca slaganjem mikrotubula. Bazalno telašce prenosi i ATP i, verovatno, hranljive materije u cilije i flagele. Identičnu strukturu kao bazalna telašca, samo drugu lokaciju u ćeliji, imaju centrioli. Donedavno se smatralo da im se i funkcije razlikuju i stoga se označavaju različitim imenima, iako je elektronska mikroskopija pokazala identičnu strukturu. Centrioli su mali cilindri, koji obično leže u parovima (pod pravim uglom jedan u odnosu na drugi) u citoplazmi blizu jedrove ovojnice, a sadrže 9 tripleta mikrotubula. Centrioli imaju ulogu u organizaciji deobnog vretena, koje se javlja u ćelijskoj deobi, a omogućava kretanje hromosoma; stoga su i centrioli i bazalna telašca, izgleda, organizatori mikrotubula. Međutim, i ćelije bez centriola, kao što je slučaj sa nekim biljnim ćelijama, takođe formiraju deobno vreteno.

TRANSPORT KROZ ĆELIJSKE MEMBRANE

Transport malih molekula kroz membranu

Živi sistemi vrše konstantnu razmenu materija sa okolinom preko plazma-membrane koja se nalazi na površini svake ćelije. Ova membrana određuje veličinu i oblik ćelije, i obezbeđuje održavanje suštinskih razlika između ćelijskog sadržaja i sredine u kojoj se nalazi ćelija. Ova membrana nije samo pasivna prepreka već je i visokoselektivni filtar koji održava različitu koncentraciju jona u ćeliji i van nje, dozvoljava hranljivim molekulama da ulaze u ćeliju, a produktima metabolizma, nepotrebnim ili štetnim materijama da izlaze iz ćelije. Dakle, ćelija je zahvaljujući selektivnoj propustljivosti plazma-membrane sposobna da kontroliše razmenu materija, čime štiti svoj integritet i održava vrlo uske uslove pH i koncentracije jona, pri kojima mogu da se odvijaju metaboličke aktivnosti. I unutrašnje membrane ćelije, kao što su one koje okružuju mitohondrije, hloroplaste i jedro, kontrolišu putem selektivne propustljivosti prolaz materija među unutarćelijskim odeljcima i na taj način održavaju konstantnom unutrašnju sredinu ćelije.

Kontrola ovih razmena kroz membrane zavisi od fizičkih i hemijskih svojstava membrana i molekula koje prolaze kroz njih.

Dva lipidna sloja membrane su, zbog hidrofobne unutrašnjosti (repovi masnih kiselina), izrazito nepropustljiva barijera za većinu polarnih molekula, što onemogućava izlazak ćelijskog sadržaja (koji je najvećim delom rastvorljiv u vodi) iz ćelije. Stoga su ćelije morale razviti specijalne načine za prenos molekula sa polaritetom kroz svoje membrane, jer moraju unositi esencijalne hranljive materije, a izlučivati nepotrebne ili štetne produkte metabolizma. Takođe moraju regulisati unutarćelijsku koncentraciju jona, što znači transportovati određene specifične jone u ćeliju ili iz nje. Transport ovakvih molekula kroz lipidne slojeve postiže se specijalizovanim transmembranskim proteinima, od kojih je svaki odgovoran za prenos određene molekule ili grupe bliskih molekula. Ćelije su takođe razvile mehanizme za transport makromolekula (kao što su proteini) pa i velikih čestica kroz plazma-membranu, koji se veoma razlikuju od onih za prenos malih molekula.

Selektivna propustljivost bioloških membrana za jednostavne jone stvara veliku razliku u sastavu jona unutraš-

njosti ćelije u odnosu na vanćelijsku tečnost. Time je u ćelijskim membranama sadržana potencijalna energija u obliku jonskog gradijenta. Transmembranski jonski gradijent se koristi za sintezu ATP-a za izvođenje različitih transportnih procesa i sprovođenje električnih signala. Pre razmatranja specifičnih transportnih proteina i jonskog gradijenta koji stvaraju neki od njih neophodno je upoznati se sa permeabilnim svojstvima samog lipidnog dvosloja, odnosno sa svojstvima veštačke membrane.

Kroz arteficijalnu membranu, sastavljenu samo od dva sloja fosfolipida i holesterola, difunduju mnoge molekule zahvaljujući gradijentu koncentracije (u pravcu niže koncentracije). Međutim, brzina difuzije varira u velikoj meri u zavisnosti od veličine molekule i njene relativne rastvorljivosti u ulju. Uopšte, što su molekule manje i rastvorljivije u ulju (odnosno što su hidrofobnije i nepolarnije), brže će difundovati kroz dvosloj. Voda, što je veoma važno, difunduje veoma brzo kroz lipidni dvosloj, iako su molekule vode relativno nerastvorljive u ulju. Brza difuzija je delom rezultat činjenice da su molekule vode male i bez naboja, a delom nastaje zbog dipolarne strukture molekule vode koja joj omogućava prolaz kroz regione lipida koji sadrže polarne (hidrofilne) grupe, koje čine glave fosfolipidnih molekula.

Suprotno tome, lipidni dvosloj je veoma nepropustljiv za sve molekule sa nabojem (jone), bez obzira na to koliko su male, kao i za većinu molekula rastvorljivih u vodi (kao što su glukoza, ATP, nukleotidi, aminokiseline i proteini). Naboji i visok stepen hidratacije takvih molekula sprečavaju ih da prođu kroz hidrofobnu fazu (ugljovodonični repovi fosfolipidnih molekula) dva sloja lipida.

Slične veštačkim membranama, ćelijske membrane propuštaju jednostavnom difuzijom vodu i nepolarne molekule. Međutim, one su takođe permeabilne za različite molekule s nabojem i polaritetom (joni, šećeri, aminokiseline, nukleotidi i mnogi ćelijski metaboliti), koje prolaze veoma sporo kroz veštačku membranu. Danas je ovaj fenomen objašnjen. Poznato je da prenos ovakvih molekula kroz ćelijske membrane omogućavaju specifični *proteini membrane.* Ovi proteini, označeni kao *transportni proteini* ili *permeaze,* javljaju se u mnogo oblika i u svim tipovima bioloških membrana. Svaki od ovih, različitih, specifičnih proteina je takve strukture da transportuje samo određenu klasu molekula (kao što su joni, šećeri i aminokiseline), a često samo određenu vrstu molekula u jednoj klasi.

Transport kroz membranu može biti aktivan ili pasivan. U *pasivnom transportu* molekule bez naboja difunduju zahvaljujući gradijentu koncentracije, tako da se kreću iz područja veće koncentracije u područje manje koncentracije. Ako se transportuju molekule sa nabojem, onda na transport utiču i gradijent koncentracije i ukupni električni gradijent membrane (potencijal membrane). Oba gradijenta zajedno čine *elektrohemijski gradijent.* Zapravo sve plazma-membrane imaju električni potencijal koji je negativan u unutrašnjosti u odnosu na spoljašnjost. Ovaj potencijal olakšava ulazak jona sa pozitivnim nabojem, ali se suprotstavlja ulasku jona sa negativnim nabojem. U pasivni transport spada i *prosta difuzija* kojom ulaze gasovi, kao što su kiseonik i ugljen-dioksid, voda i male, relativno hidrofobne, ali rastvorljive u vodi molekule, kao što je etanol. Nešto veće molekule i one sa nabojem prolaze kroz membranu posebnim tipom pasivnog transporta koji se naziva *olakšana difuzija,* jer se odvija uz pomoć transportnih proteina. Neki od ovih proteina formiraju kanale, dok drugi, zvani *proteini nosači* ili transporteri, vezuju specifične molekule (npr., glukozu) i prenose ih kroz membranu. Sâm proces podseća na enzimsku reakciju i stoga se ovi proteini nazivaju još i *permeaze.* Međutim, za raz-

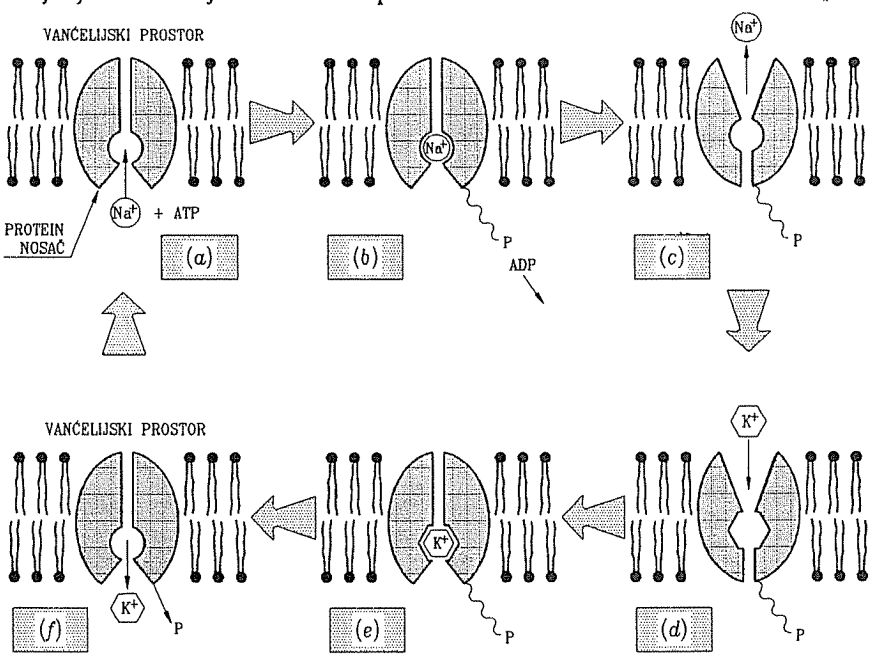
liku od enzima, permeaze obično ne izazivaju promene u molekulama sa kojima se privremeno vezuju. O samom procesu prenosa molekula se malo zna, ali se pretpostavlja da su nosači transmembranski proteini, koji reverzibilno menjaju konfiguraciju i time istiskuju molekule koje se transportuju kroz hidrofobno jezgro (kanal) proteina (sl. 1.7).

Pri ***aktivnom transportu*** proteini nosači funkcionišu kao pumpe koje aktivno pokreću specifične molekule protiv njihovog elektrohemijskog gradijenta. Najčešće ovo podrazumeva hidrolizu ATP-a pomoću proteina nosača ili kotransport K^+ u skladu sa njegovim elektrohemijskim gradijentom.

Jedan od najvažnijih i najbolje objašnjenih sistema aktivnog transporta je ***natrijum-kalijum pumpa,*** koja ima glavnu ulogu u stvaranju membranskog potencijala kroz plazma-membranu životinjskih ćelija.

Kod kičmenjaka i beskičmenjaka koncentracija jona Na^+ je oko 10-40 puta veća u krvi nego u ćeliji. Stoga joni Na^+ imaju tendenciju da ulaze, a joni K^+ da izlaze iz ćelije olakšanom difuzijom u skladu sa njihovim gradijentom koncentracije. Međutim, da bi ćelija održala nisku koncentraciju jona Na^+, a visoku jona K^+, ona aktivno ispumpava Na^+, a upumpava jone K^+ suprotno njihovom elektrohemijskom gradijentu, pomoću proteina nosača i energije koju dobija hidrolizom ATP-a. Enzimski sistem koji hidrolizuje ATP u ADP i fosfat deo je transportnog sistema za ove jone. Stoga se protein nosač naziva *Na^+ – K^+ ATP*-aza ili *Na^+ – K^+ pumpa.* Koliko je ovaj mehanizam važan za ćeliju, ukazuje činjenica da se više od 1/3 ATP-a mirujuće ćelije troši na Na^+ – K^+ pumpu.

Za ovaj protein nosač pretpostavlja se da ima dve alternativne konfiguracije. Jedna ima šupljinu i otvor prema unutrašnjosti ćelije u koju ulaze joni Na^+, a druga ima šupljinu i otvor prema spoljašnjosti u koju ulaze joni K^+ (sl. 1.15). Kada se Na^+ veže za nosač, ovaj se



Slika 1.15 – Model natrijum-kalijum pumpe.

fosforiliše (hidrolizom ATP-a), što dovodi do promena u njegovoj konfiguraciji, čime se Na^+ prenosi kroz membranu i oslobađa van ćelije. Nosač sada može da prihvati K^+ sa spoljašnje strane, defosforiliše se i vraća u početni oblik, čime se K^+ prenosi kroz membranu i oslobađa u citoplazmu.

Jonski gradijent se koristi u mnogim biološkim procesima. Transmembranski gradijenti koncentracije jona Na^+ i K^+ su bitni za sprovođenje električnog impulsa niz akson nervne ćelije. Takođe je važna razlika između koncentracije slobodnih jona Ca^{++} u ćeliji i u krvi; u krvi je veća nego u ćeliji. U mnogim ćelijama je povećanje koncentracije jona Ca^{++} važan regulatorni signal. Na primer, u mišićnim ćelijama ovakav signal otpočinje kontrakciju, a u egzokrinim ćelijama pankreasa otpočinje sekreciju digestivnih enzima.

Transport makromolekula i čestica kroz membranu; endocitoza i egzocitoza

Transportni proteini omogućavaju prolaz mnogih malih polarnih molekula, ali ne i makromolekula kao što su proteini, polinukleotidi ili polisaharidi. Ipak, kako su i ovi potrebni ćeliji, većina ćelija je u stanju da ih unosi kroz plazma-membranu. Mehanizmi kojima ćelije vrše unošenje specifičnih makromolekula, čak velikih partikula, veoma se razlikuju od onih kojima se transportuju male molekule i joni, jer uključuju sekvencijalno formiranje i fuziju membranoznih vezikula. Unošenje i izlučivanje makromolekula pomoću vezikula predstavljaju procese endocitoze i egzocitoze (sl. 1.10).

U ***endocitozi*** supstanciju koja treba da se unese u ćeliju opkoljava mali deo plazma-membrane, koji se prvo invaginiše, a zatim se odvaja od membrane formirajući unutarćelijsku vezikulu ispunjenu unetim materijalom. Razlikuju se dva tipa endocitoze na osnovu veličine formiranih vezikula, odnosno konzistencije materija koje se unose: *pinocitoza,* kojom se unose tečnosti i/ili rastvorene molekule pomoću malih vezikula, i *fagocitoza,* kojom se unose velike čvrste partikule, kao što su mikroorganizmi ili raspadnute ćelije, pomoću velikih vezikula.

Dok skoro sve vrste ćelija kontinualno unose tečnosti i rastvorene molekule pinocitozom, velike čestice unose uglavnom specijalizovane ćelije – fagocite (npr. leukociti fagocituju bakterije).

Endocitoza se odvija stalno u svim eukariotskim ćelijama. Za takav proces koji se neprekidno odvija kaže se da je konstitutivan. Vezikule nastale endocitozom su različite veličine i oblika i obično se uvećavaju međusobnom fuzijom ili fuzijom sa drugim intraćelijskim vezikulama. U većini ćelija ove vezikule se na kraju fuzionišu sa primarnim lizosomima, pri čemu formiraju sekundarne lizosome u kojima se odvija unutarćelijsko varenje.

Procesom ***egzocitoze*** se supstancije iznose iz ćelije posredstvom vezikula. Vezikula se kreće ka površini ćelije, njena membrana se fuzioniše sa plazma-membranom, a sadržaj se izručuje van ćelije. Na primer, ćelije pankreasa pakuju insulin u vezikule koje se fuzionišu sa plazma-membranom, otvaraju se prema vanćelijskom prostoru i oslobađaju insulin. Istim procesom se u svim ćelijama eukariota transportuju nove komponente plazma-membrane od Goldžijevog aparata do plazma-membrane.

Osnovna specifičnost oba opisana procesa je da su makromolekule koje se izlučuju ili unose u ćeliju odvojene membranama, pa se uglavnom ne mešaju sa drugim makromolekulama ili organelama u ćeliji. Svaka vezikula se fuzioniše samo sa određenim membranskim strukturama. Mehanizmi ove selektivne fuzije nisu

još jasni. Vezikularne strukture su, izgleda, univerzalni transportni sistemi ćelije. Vrlo sličnim procesom se prenose novosintetisane makromolekule između različitih odeljaka ćelije; vezikule "pupe" sa endoplazmatičkog retikuluma i Goldžijevog aparata, migriraju i fuzionišu se sa nekom drugom membranom u ćeliji.

Svi transportni sistemi su u osnovi slični po tome što svi zavise od sposobnosti membrane da prepozna određene molekule. Ova sposobnost je rezultat dugog evolutivnog procesa koji je otpočeo formiranjem prve membrane u obliku krhkog filma oko nekoliko organskih molekula koji je razdvajao ove molekule od spoljašnje sredine i omogućio im da održavaju posebnu vrstu organizacije koju prepoznajemo kao život.

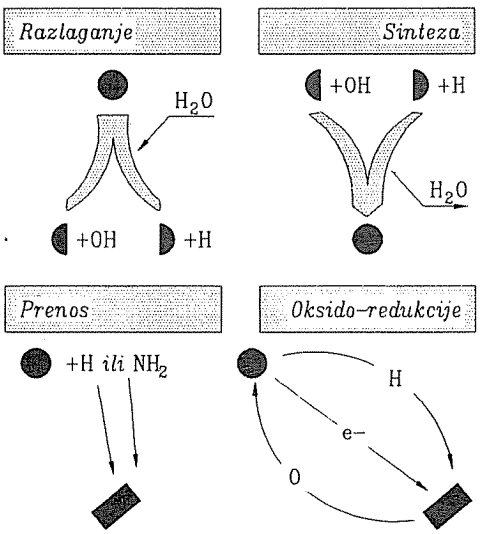
HEMIJSKE REAKCIJE, ENZIMI I ŽIVI SISTEMI

U svakom živom sistemu odigrava se na hiljade različitih hemijskih reakcija, mnoge od njih istovremeno. Sve hemijske reakcije dovode do promena u elektronskoj konfiguraciji atoma ili molekula i zahtevaju energiju da bi se jedna stabilna elektronska konfiguracija prevela u drugu. Ova energija se naziva energijom aktivacije. Radi lakšeg razumevanja ove procese možemo svrstati u nekoliko opštih tipova (sl. 1.17).

1. ***Razlaganje*** je proces razgradnje molekula na manje jedinice, često uz učešće vode (hidroliza), pri čemu se oslobađa energija.

2. ***Sinteza*** je proces sjedinjavanja manjih jedinica u složenije molekule uz korišćenje energije i, često, uz odvajanje molekula vode (dehidracija).

3. ***Reakcija*** prenosa grupa atoma sa jedne molekule (donor) na drugu (akceptor).



Slika 1.17 – Osnovne grupe hemijskih reakcija u ćeliji

4. ***Oksido-redukcija*** ili ***redoks-reakcija*** je prenos elektrona sa jedne molekule na drugu. ***Oksidacija*** predstavlja gubitak elektrona, pri čemu je kiseonik, zbog visoke elektronegativnosti, čest akceptor elektrona (razlog zbog kojeg se gubitak elektrona naziva oksidacijom). Obratno, ***redukcija*** je primanje elektrona (redukuje se naboj atoma ili molekule). Oksidacija i redukcija odvijaju se istovremeno, jer elektron kojeg gubi oksidovani atom biva prihvaćen od strane drugog atoma, koji se tada redukuje. Redoks-reakcije mogu uključiti samo elektron, kao u slučaju kada natrijum gubi elektron i postaje oksidovani Na^+, a hlor dobija elektron i time redukuje svoj naboj (Cl^-). Često oksidacija podrazumeva gubitak elektrona i protona, tj. vodonikovog atoma, a redukcija prihvatanje atoma vodonika. Oksidacija, u kojoj dolazi do gubitka 2 elektrona i 2 protona, tj. 2 H atoma, naziva se ***dehidrogenacija***. Na primer, kada se oksiduje glukoza, ona gubi vodonikove atome koji prelaze na kiseonik ($C_6H_{12}O_6 + 6\ O_2 \rightarrow 6\ CO_2 + 6\ H_2O$).

Zbir svih hemijskih reakcija u živom sistemu predstavlja ***metabolizam***. Postoje

neki osnovni principi koji omogućavaju bolje razumevanje kompleksnosti ćelijskog metabolizma. Prvo, sve hemijske reakcije koje se odvijaju u ćeliji uključuju *enzime* – velike proteinske molekule sa strogo određenim ulogama. Drugo, moguće je grupisati ove reakcije u serije stupnjeva, koje se nazivaju ***metabolički put;*** metabolički put često sadrži veliki broj reakcija ili stupnjeva koji slede jedan za drugim. Svaki metabolički put je u funkciji ukupnog života ćelije ili organizma. Štaviše, neki imaju mnoge zajedničke stupnjeve, kao što je slučaj sa metaboličkim putevima sinteze različitih aminokiselina ili različitih azotnih baza. Neki metabolički putevi konvergiraju: npr. metabolički put kojim se razlažu masti da bi se dobila energija dovodi do puta kojim se dobija energija razlaganjem glukoze (Krebsov ciklus).

Razlike među ćelijama i organizmima ne odražavaju se samo u njihovom obliku i funkciji, već i u njihovoj biohemiji. Mnogi živi sistemi imaju jedinstven, samo njima svojstven metabolizam, kao, npr., crvena krvna zrnca, koja su specijalizovana za sintezu hemoglobina, koji se ne proizvodi nigde drugde u životinjskom organizmu. Međutim, mnogi metabolički procesi su veoma slični i u organizmima koji se čak veoma razlikuju, a neki su zapravo univerzalni i odvijaju se u svim živim sistemima.

Suma hemijskih reakcija uključenih u sintezu molekula ćelije naziva se ***anabolizam.*** Hemijske reakcije koje dovode do razlaganja velikih molekula zajednički se označavaju kao ***katabolizam.*** Katabolizam oslobađa energiju za anaboličke procese i ćelijski rad, a služi i kao izvor sirovina za anaboličke procese.

Enzimi kao katalizatori

Mnogobrojne i kompleksne hemijske reakcije, koje se odigravaju u živim sistemima pri relativno niskoj temperaturi, moguće su zahvaljujući enzimima. Enzimi su katalizatori i regulatori svih procesa metabolizma u živim sistemima. Oni u velikoj meri, povećavaju brzinu bioloških reakcija, pri čemu ostaju nepromenjeni. Bez enzima, hemijske reakcije bi se odvijale tako sporo da praktično ne bi ni postojale. Samim tim ne bi bile moguće ni aktivnosti koje karakterišu život, jer bi visoka temperatura ili jaki agensi, koji mogu ubrzati hemijske reakcije, prouzrokovali smrt žive materije. Enzimi se odlikuju velikom selektivnošću u svom delovanju. Određeni enzim može da katalizuje reakcije samo među vrlo specifičnim reaktantima označenim kao *supstrat.* Tokom reakcije se ne troše i mogu opet da se koriste u novim reakcijama.

Struktura enzima

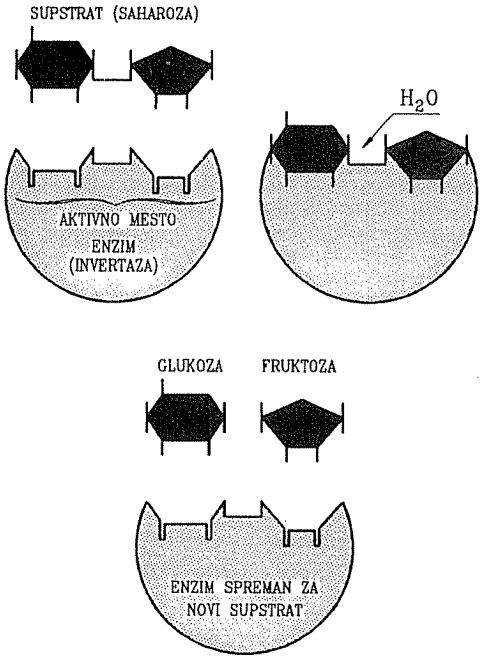
Enzimi su veliki i složeni globularni proteini koji sadrže jedan ili više polipeptidnih lanaca. Oni imaju takvu konfiguraciju da određene grupe aminokiselina formiraju udubljenje – ***aktivno mesto,*** u koje ulazi supstrat i u kome se odvijaju reakcije. Aktivno mesto je veoma precizno podešeno prema supstratu, slično kao ključ prema bravi (sl. 1.18).

Aminokiseline koje čine aktivno mesto ne moraju biti – i najčešće nisu – jedna pored druge u polipeptidnom lancu, posebno u enzimima sa kvaternarnom strukturom. One mogu biti čak i na različitim polipeptidnim lancima, ali će se naći zajedno u aktivnom mestu preciznim savijanjem i nabiranjem polipeptidnih lanaca.

Studije strukture enzima ukazale su da kontakt između enzima i supstrata menja konfiguraciju enzima indukujući tako međusobno podešavanje aktivnog mesta i reaktanta (sl. 1.19).

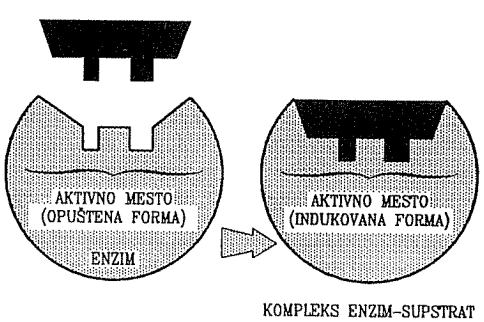
Kofaktori u dejstvu enzima

Katalitička aktivnost nekih enzima, izgleda, zavisi samo od fizičkih i he-



Slika 1.18 – Model enzimske aktivnosti prema hipotezi "ključ i brava"

mijskih interakcija. Međutim, mnogi enzimi, da bi funkcionisali, zahtevaju dodatne neproteinske supstancije, male molekulske težine. Takve supstancije, koje su esencijalne za funkciju enzima, nazivaju se ***kofaktori.*** Kofaktori određenih enzima su ***joni.*** Na primer, joni magnezijuma (Mg^{++}) neophodni su u svim enzimskim reakcijama u kojima se prenosi fosfatna grupa negativnog naboja sa jedne molekule na drugu, jer Mg sa svoja dva pozitivna naboja fiksira fosfatnu grupu negativnog naboja. Sličnu ulogu imaju joni K^+, Ca^{++} i drugi joni, u drugim reakcijama.



Slika 1.19 – Hipoteza indukovanog podešavanja enzima prema supstratu.

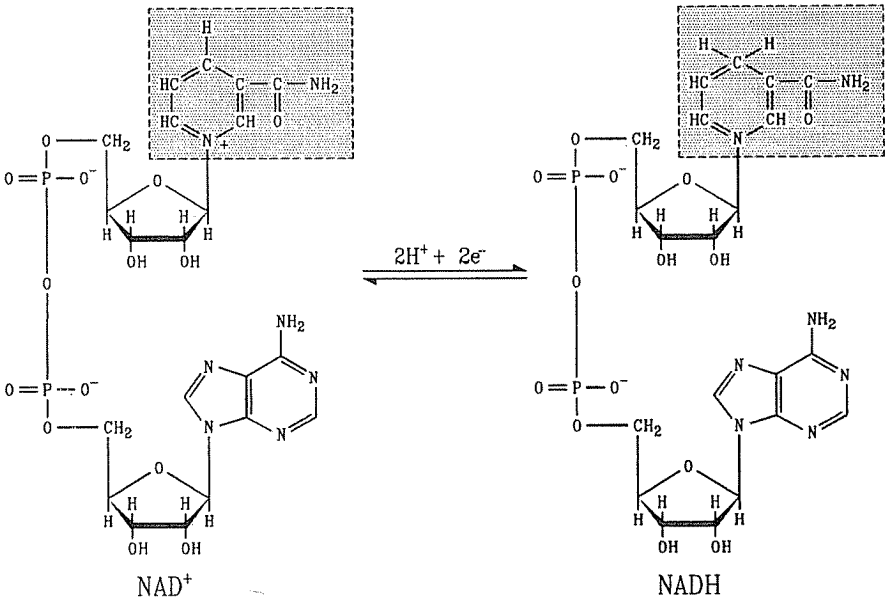
Organske molekule takođe mogu igrati važnu ulogu u enzimskim reakcijama. Takve molekule se nazivaju ***koenzimi.*** Na primer, enzimi dehidrogenaze (najznačajnija grupa oksidativnih enzima) ne mogu delovati bez svojih koenzima, koji prihvataju elektrone i protone (odnosno vodonikove atome) sa supstrata i predaju ih drugim jedinjenjima. U svakoj ćeliji postoji nekoliko različitih koenzima – akceptora elektrona – i svaki drži elektrone na nešto drugačijem energetskom nivou. Jedan takav koenzim je nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD^+), koji se sastoji od dve riboze međusobno povezane sa dve fosfatne grupe, pri čemu je za jednu ribozu vezana azotna baza adenin, a za drugu azotna baza nikotinamid (sl. 1.20). Ukratko, NAD^+ se sastoji iz dva nukleotida: adenozin-monofosfata (AMP) i nikotinamid-nukleotida. Prsten nikotinamida je onaj deo koenzima NAD^+ koji prihvata dva elektrona i jedan proton (stoga se oslobađa jedan proton tokom reakcije

$$NAD^+ \xrightarrow{+2\ e^- + 2\ H^+} NADH + H^+$$

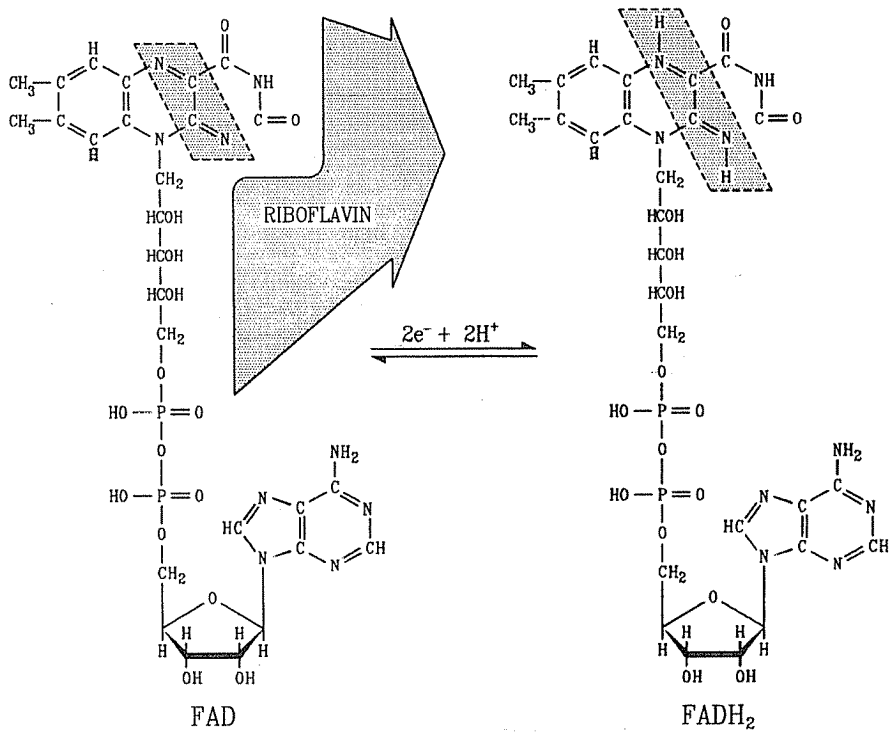
Nikotinamid je inače vitamin niacin. Mnogi koenzimi su ***vitamini*** ili u svom sastavu sadrže vitamine. Istog sastava je i koenzim *NADP*$^+$, samo što je za ribozu AMP-a vezana još jedna fosfatna grupa. Drugi jedan koenzim, flavin-adenin-dinukleotid *(FAD)* drži elektrone, koje je prihvatio sa NADH-a, na nešto nižem energetskom nivou

$$FAD \xrightarrow{+\ 2\ e^- + 2\ H^+} FADH_2$$

FAD se sastoji od flavin-mononukelotida (FMN) i AMP-a (sl. 1.21). Flavin sa ribozom čini riboflavin, odnosno vitamin B_2. Pomenućemo još koenzim A, koji takođe sadrži, kao deo nukleotida,



Slika 1.20 – Kofaktor nikotinamid adenin dinukleotid (NAD) u oksidovanom obliku (NAD^+) i redukovanom obliku (NADH)



Slika 1.21 – Kofaktor flavin adenin dinukleotid (FAD) u oksidovanom obliku (FAD) i redukovanom obliku ($FADH_2$); prihvata elektrone sa NADH u transportnom lancu elektrona

jedan vitamin iz kompleksa B-vitamina (pantotensku kiselinu).

Regulacija atkivnosti enzima

Reakcije katalizovane enzimima su pod strogom kontrolom ćelije. Svaka ćelija reguliše količinu i brzinu sinteze svojih produkata izbegavajući prekomernu produkciju, koja bi bila gubitak i energije i sirovina. Na brzinu enzimskih reakcija utiče temperatura. Kao i kod nekatalizovanih hemijskih reakcija, povišenje temperature povećava i brzinu reakcije, ali samo do izvesne tačke. Naime, kod oko 40°C brzina reakcije vrlo brzo opada jer se enzim ***denaturiše,*** a to znači da gubi svoju karakterističnu trodimenzionalnu konfiguraciju, jer dolazi do narušavanja vodoničnih veza i drugih relativno slabih veza koje povezuju aminokiseline u enzimu. Neki enzimi hlađenjem mogu da povrate prvobitni oblik i aktivnost (renaturišu se), dok drugi ostaju trajno inaktivni.

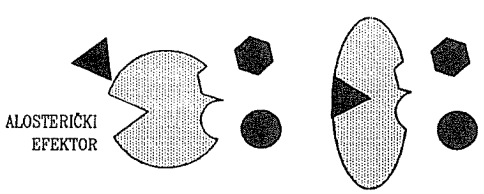
Na aktivnost enzima takođe utiče pH. Konfiguracija enzima, između ostalog, zavisi od privlačenja i odbijanja između aminokiselina sa negativnim nabojem (kisele aminokiseline) i pozitivnim nabojem (bazne aminokiseline). Sa promenom pH ovi naboji se menjaju, a time i oblik enzima, što ga čini nefunkcionalnim. Sem toga, menjaju se i naboji aktivnog mesta i supstrata, što utiče na sposobnost međusobnog vezivanja. Optimalan pH nije isti za sve enzime. Na primer, digestivni enzim, pepsin, aktivan je pri vrlo niskom (vrlo kiselom) pH želuca, pri kojem bi se većina drugih proteina trajno denaturisala. Neki enzimi su prisutni u sredini sa neoptimalnim pH, što ukazuje da bi ovo nepodudaranje moglo biti način ograničavanja enzimske aktivnosti.

Dostupnost reaktivnih molekula i kofaktora predstavlja, svakako, glavni faktor u ograničavanju enzimske aktivnosti, tako da većina enzima, verovatno, dejstvuje brzinom koja je ispod njihovog maksimuma.

Živi sistemi imaju i mnogo preciznije načine kontrole enzimske aktivnosti. Neki enzimi se proizvode samo u inaktivnom obliku (proenzimi) i aktiviraju se samo kada su potrebni, obično pomoću drugog enzima. Na primer, tripsinogen je proenzim koji se transformiše u aktivni enzim tripsin pomoću drugog enzima, crevne enterokinaze. Na sličan način je kontrolisan i pepsin. Na ovaj način su digestivni enzimi onemogućeni da izvrše digestiju proteina ćelija u kojima su sintetisani. Međutim, jednom aktivirani, ovi enzimi više ne mogu biti inaktivirani.

Mehanizam pomoću kojeg enzim može biti privremeno aktivan ili inaktivan poznat je kao ***alosterička interakcija.*** Alosterička interakcija se javlja kod enzima koji sem aktivnog mesta imaju i mesto koje odgovara molekuli koja nije supstrat, a označava se kao ***alosterički efektor.*** Vezivanjem efektora menja se oblik enzimske molekule, odnosno aktivnog mesta, čime se ono aktivira ili inaktivira (sl. 1.22).

Alosterička interakcija je često uključena u ***inhibiciju povratnom spregom,*** koja predstavlja uobičajen način biološke kontrole. U inhibiciji enzimske reakcije povratnom spregom jedan od produkata, obično poslednji u seriji, ponaša se kao efektor, inhibirajući funkciju jednog od enzima, obično prvog u seriji (sl. 1.23.a), ili, pak, u reakcijama koje se odvijaju u jednom od dva moguća pravca efektor



Slika. 1.22 – Alosterička interakcija između enzima i efektora (inhibitora)

može skrenuti reakciju na drugi metabolički put (sl.1.23.b).

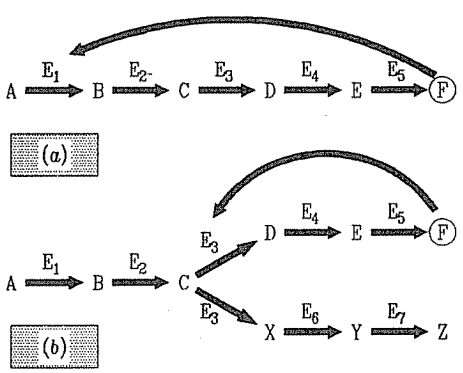
Regulacija može da se izvodi i putem *kompetitivne inhibicije,* koja se sastoji u tome da neko jedinjenje privremeno zauzme aktivno mesto enzima i tako inhibira njegovu aktivnost. Dakle, regulatorno jedinjenje i supstrat su u kompeticiji za aktivno mesto, a rezultat kompeticije zavisi od količine jednih i drugih molekula. Na primer, u seriji reakcija

$$A \xrightarrow{E1} B \xrightarrow{E2} C \xrightarrow{E3} D$$

finalni produkt D može biti veoma sličan po strukturi produktu B i može zauzeti aktivno mesto enzima E2 sprečavajući supstrat B da se veže za enzim. Kada ćelija potroši produkt D, aktivno mesto enzima E2 opet postaje dostupno produktu B.

Kompetitivna inhibicija nema, verovatno, značajnu ulogu u normalnom životu ćelije, ali je značajan mehanizam u dejstvu nekih lekova; oni se vezuju za neki bakterijski enzim i time zaustavljaju dalji metabolizam i dovode do smrti bakterije, a animalna ćelija ostaje neoštećena.

Inhibicija može biti i *nekompetitivna.* Pri nekompetitivnoj inhibiciji supstancije koje ne moraju biti slične supstratu vezuju se za aktivno mesto enzima ili za neko drugo mesto na enzimu i sprečavaju delovanje enzima. Na primer, mnogi enzimi sadrže aminokiselinu cistein za čiju se SH-grupu može kovalentno vezati olovo, čime se enzim trajno inaktivira (trovanje olovom). Slično deluju i otrovi kao što su arsen, živa, cijanidi i nervni gasovi, a i mnogi korisni lekovi, koji na ovaj način sprečavaju funkcionisanje vitalnih enzima bakterija.

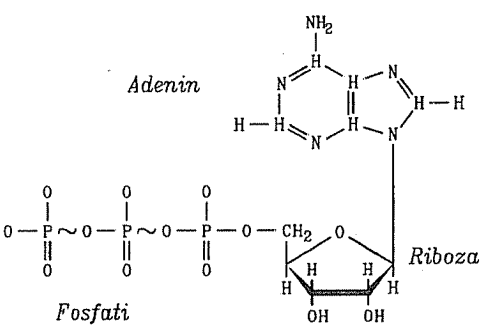


Slika 1.23 – Inhibicija enzimske reakcije povratnom spregom

Energetski faktor: ATP

Sve biosintetičke aktivnosti, kao i mnoge druge aktivnosti ćelije, zahtevaju energiju. Za većinu ćelijskih aktivnosti izvor energije je adenozin-trifosfat ili ATP. Molekula ATP-a, sastoji se od adenina, riboze i tri fosfatne grupe (sl. 1.24). Ove tri fosfatne grupe, sa jakim negativnim nabojem, međusobno su vezane sa dve kovalentne, visokoenergetske veze koje, kada se hidrolizuju, oslobađaju relativno veliku količinu energije. Ovo predstavlja važno svojstvo ATP-a.

Da bi se razumela uloga ATP-a, treba ukratko obnoviti koncept hemijskih veza i energije veza. Hemijska veza predstavlja zbir sila koje drže na okupu atome u molekuli. Pošto je hemijska veza stabilna konfiguracija, potrebna je energija (energija aktivacije) da bi se razbila stara veza i formirala nova. Iako enzimi znatno redukuju potrebu za energijom aktivacije, neophodno je udovoljiti još jednom



Slika 1.24 – Adenozin trifosfat (ATP).

zahtevu da bi se hemijske reakcije u živim sistemima odvijale: energija veza u proizvodima reakcije mora biti uvek manja od energije veza reaktanata. Ćelija rešava ovaj zahtev *parnim reakcijama,* u kojima su hemijske reakcije, koje zahtevaju energiju, vezane za reakcije koje oslobađaju energiju. Molekula koja najčešće učestvuje u ovakvim parnim reakcijama je ATP.

Unutrašnja struktura molekule ATP neobično je pogodna za ovu ulogu u živim sistemima. U laboratorijskim uslovima, otklanjanjem treće fosfatne grupe nastaju ADP i fosfat, a oslobađa se oko 7 kilokalorija (30 kilodžula) po molu ATP-a. Otklanjanje druge fosfatne grupe daje AMP i fosfat uz oslobađanje iste količine energije.

Energija koja se oslobađa otklanjanjem fosfatnih grupa ne potiče samo iz visokoenergetskih veza (označenih sa ≈) već je i rezultat prerasporeda orbita u molekulama ATP-a ili ADP-a. Svaka fosfatna grupa nosi negativni naboj i zato ima tendenciju da se odbija od druge takve grupe. Kada se otkloni fosfatna grupa, dolazi do promene u konfiguraciji elektrona, te nastaje struktura sa manje energije.

U živim sistemima se ATP takođe hidrolizuje u ADP. Hidroliza ATP-a je, npr., brzi način za stvaranje toplote kod životinja koje se bude iz zimskog sna (hibernacije). Međutim, obično terminalna grupa nije jednostavno otkinjena, već se prenosi pomoću enzima (kinaze) na drugu molekulu (fosforilacija). Ovakva reakcija prenosi i deo energije iz visokoenergetske veze na fosforilisano jedinjenje, koje ovako obogaćeno energijom učestvuje u reakciji.

Energija koja se oslobađa u reakcijama ćelijskog katabolizma, kao što je razlaganje glukoze, koristi se za ponovnu sintezu ATP-a iz molekule ADP-a. Stoga sistem ATP/ADP služi kao univerzalni sistem za razmenu energije, koji se kreće između reakcija u kojima se oslobađa energija i reakcija koje zahtevaju energiju.

GLIKOLIZA I ĆELIJSKO DISANJE: stvaranje molekula ATP

Glavna energetska molekula u živim sistemima je ATP. Ona učestvuje u različitim ćelijskim procesima, od hemijske biosinteze do kretanja cilija, kontrakcije mišića, aktivnog transporta molekula kroz ćelijsku membranu ili širenja električnog impulsa kroz nervno vlakno. Osnovni mehanizmi sinteze ATP-a u ćeliji su oksidativna fosforilacija, u procesu ćelijskog disanja, i fotofosforilacija, u procesu fotosinteze.

U nefotosintetskim ćelijama glavni izvor energije je glukoza. Razlaganjem glukoze (ili drugih ugljenih hidrata) putem oksidacije oslobađa se energija koju ćelija deponuje u obliku visokoenergetskih veza u molekulama ATP-a. Ovaj proces, iako komplikovan u detaljima, u globalu je jednostavan.

Treba se podsetiti da je oksidacija gubljenje elektrona, a redukcija primanje elektrona. Pošto u spontanim oksidoredukcionim reakcijama elektroni idu od viših ka nižim energetskim nivoima, molekula, kada je oksidisana, obično oslobađa energiju. Prilikom oksidacije glukoze veze ugljenik-ugljenik, ugljenik-vodonik i kiseonik-kiseonik se zamenjuju vezama ugljenik-kiseonik i vodonik-kiseonik, pošto izrazito elektronegativni atom kiseonika privlači i nagomilava elektrone. Globalna jednačina za ovu reakciju je:

glukoza + kiseonik → ugljen-dioksid + voda + energija

($C_6H_{12}O_6 + 6\ O_2 \rightarrow 6\ CO_2 + 6\ H_2O$, $\Delta G = -686$ kcal/mol (2868 kilodžula).

Živi sistemi su tako organizovani da se slobodna energija ne rasipa nego se hvata i koristi za rad ćelije. Razlaganje glukoze se odvija u dve faze. U prvoj, poznatoj kao *glikoliza*, molekula glukoze, koja sadrži 6 ugljenikovih atoma, razdvaja se na dve molekule jedinjenja sastavljenog od 3 ugljenikova atoma (pirogrožđana kiselina). Elektrone prihvata NAD, a ne kiseonik, pri čemu se oslobađa relativno mali deo od ukupne energije molekule glukoze. U drugoj fazi oksidacije glukoze, koja se naziva *ćelijsko disanje* ili respiracija, elektrone i protone, otklonjene kroz seriju reakcija sa ugljenikovih atoma, prihvata kiseonik, pri čemu se oslobađa relativno velika količina energije. Razlaganjem jedne molekule glukoze, tokom glikolize i ćelijskog disanja, nastaje 36 molekula ATP-a iz ADP-a.

Glikoliza

Razlaganje glukoze se odvija u citosolu u 9 etapa i svaka je katalizovana specifičnim enzimom. Na početku glikolize energija se troši prenošenjem 2 fosfatne grupe sa 2 molekule ATP-a na šećer. Ovo ulaganje energije dovodi do razgradnje jedinjenja sa 6 C-atoma (glukoza) na 2 molekule jedinjenja sa 3 C-atoma (fosfoglicerin-aldehid). U daljem procesu svaka od ove 2 molekule se oksidiše (a to znači otklanjaju se vodonikovi atomi sa njihovim elektronima) do pirogrožđane kiseline, a oslobođena energija se deponuje u NADH i ATP. Ukupno se u ovom procesu stvaraju 2 molekule NADH (iz 2 molekule NAD^+) i 4 molekule ATP-a (iz 4 molekule ADP-a). Međutim, pošto je za otpočinjanje glikolize neophodna energija iz fosfatnih veza 2 molekule ATP-a, čisti energetski dobitak po molekuli glukoze su 2 molekule ATP-a i 2 molekule NADH-a. Dve molekule pirogrožđane kiseline, dobijene na kraju glikolize, sadrže još uvek veliku količinu potencijalne energije, koja je bila deponovana u početnoj molekuli glukoze. Ova serija reakcija izvodi se u svim živim ćelijama, od prokariota do eukariota (sl. 1.25).

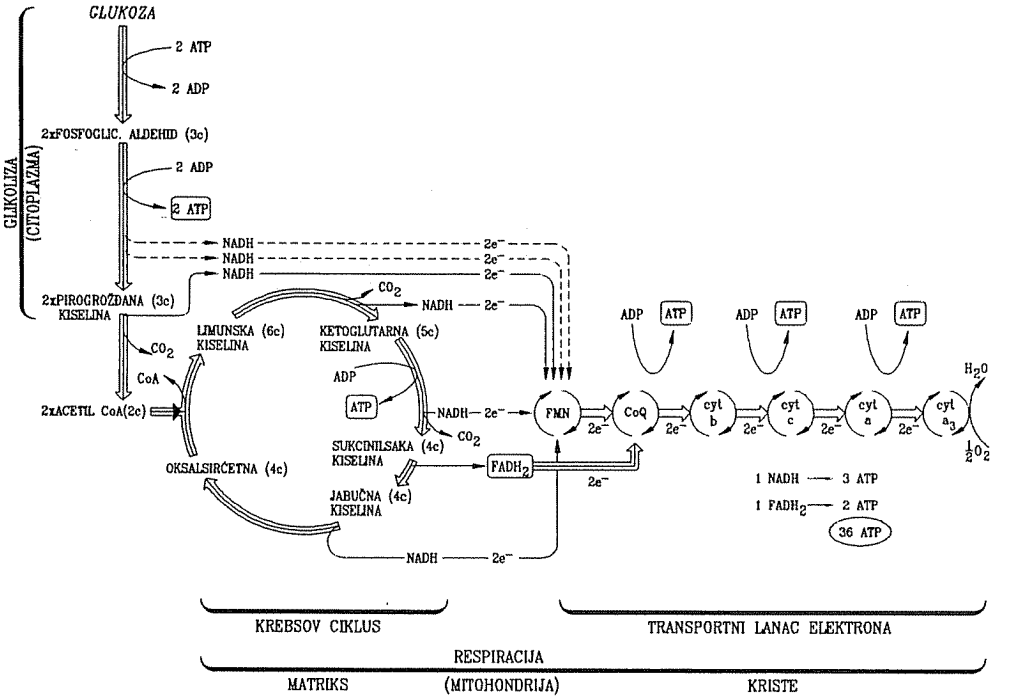
U nedostatku dovoljne količine kiseonika, kada je njegova potrošnja velika u ćelijama (npr., prilikom vršenja napornog rada, u mišićnim ćelijama), pirogrožđana kiselina se redukuje u mlečnu kiselinu. Na ovaj način se regeneriše akceptor vodonika NAD, čiji nedostatak dovodi do smrti ćelije, jer obustavlja procese dehidrogenacije u glikolizi. Dovodom kiseonika u ćeliju mlečna kiselina dehidrogenacijom prelazi u pirogrožđanu kiselinu, a ova se zatim uključuje u dalji proces razlaganja putem oksidacije. Iz ćelija anaerobnih organizama, koji ne poseduju mehanizme za aerobnu respiraciju, mlečna kiselina se odstranjuje. U biljnim anaerobnim ćelijama vrše se dekarboksilacija i redukcija pirogrožđane kiseline u etil-alkohol. Ova pojava se naziva fermentacija. Intermedijarna jedinjenja, mlečna kiselina i etil-alkohol, još uvek su bogata energijom.

Ćelijsko disanje

Sledeća faza u razlaganju glukoze je postepena oksidacija pirogrožđane kiseline do CO_2 i H_2O u prisustvu kiseonika – proces poznat kao ćelijsko disanje ili respiracija.

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

Kao što je već rečeno, mitohondrija je okružena sa dve membrane: spoljašnjom, glatkom, i unutrašnjom, koja formira nabore – kriste. U unutrašnjem odeljku, koji opkoljava kriste, nalazi se gusti rastvor (matriks) koji sadrži enzime, koenzime, vodu, fosfate i druge molekule



Slika 1.25 – Sažetak glikolize i respiracije

koje učestvuju u respiraciji. Spoljašnja membrana je propustljiva za većinu malih molekula, dok unutrašnja dozvoljava prolaz samo određenim molekulama kao što su pirogrožđana kiselina i ATP, a zadržava prolaz drugih molekula. Neki enzimi Krebsovog ciklusa su u matriksu, dok su ostali ugrađeni u membranu kriste, kao i enzimi i druge komponente transportnog lanca elektrona. Stoga je približno 80% unutrašnje membrane mitohondrije proteinske prirode.

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

Krebsov ciklus

Pirogrožđana kiselina prolazi kroz obe membrane mitohondrije i pre nego što uđe u Krebsov ciklus njena se molekula, koja sadrži 3 C-atoma, oksidiše. Ugljenik iz karboksilne grupe se otklanja i formira se ugljen-dioksid, a vodonik prihvata NAD^+, koji se time redukuje u NADH. Početna molekula glukoze je tako oksidovana u dve molekule CO_2 i dve acetil-grupe, (CH_3CO), a pri tome su do sada ukupno formirane 4 molekule NADH. Svaku acetil-grupu odmah prihvata jedan koenzim, poznat kao koenzim A(CoA). Slično ranije pominjanim koenzimima, koenzim A je velika molekula, čiji je jedan deo nukleotid, a drugi vitamin (pantotenska kiselina, jedan od vitamina B-kompleksa). Spajanje acetilne grupe i CoA u acetil-CoA je reakcija koja predstavlja vezu između glikolize i Krebsovog ciklusa.

Ulaskom u Krebsov ciklus, acetilna grupa, koja sadrži 2 C-atoma, kombinuje se sa jedinjenjem od 4 C-atoma (oksal-

sirćetna kiselina) stvarajući jedinjenje od 6C-atoma (limunska kiselina). Tokom ciklusa dva od šest ugljenikovih atoma se oksidišu u CO_2, a oksal-sirćetna kiselina se regeneriše, što i čini ovu seriju reakcija ciklusom. Svakim krugom se iskorišćava jedna acetilna grupa, a regeneriše jedna molekula oksal-sirćetne kiseline, koja ponovo otpočinje ciklus. Tokom ovih sekvenci deo energije oslobođene oksidacijom C-H- i C-C- veza koristi se za pretvaranje ADP-a u ATP (jedna molekula po ciklusu), a deo za produkciju NADH iz NAD^+ (tri molekule po ciklusu). Sem toga, deo energije se koristi za redukciju drugog prenosioca elektrona, flavin-adenin-dinukleotida (FAD). Po jednom ciklusu stvara se jedna molekula $FADH_2$ iz FAD. Tokom Krebsovog ciklusa O_2 je nepotreban, jer sve elektrone i protone dobijene oksidacijom ugljenika prihvataju NAD^+ i FAD:

oksal-sirćetna kiselina + acetil-CoA + ADP + Pi + $3NAD^+$ + FAD →

oksal-sirćetna kiselina + $2CO_2$ + CoA + ATP + 3 NADH + 3 H^+ + $FADH_2$ + H_2O.

Molekula oksal-sirćetne kiseline, kojom se završava ciklus, nije ista molekula kojom ciklus počinje. Ako se molekula glukoze obeleži radioaktivnim atomima ugljenika, radioaktivni ugljenici pojaviće se među četiri ugljenika oksal-sirćetne kiseline, kojom se završava ciklus.

Transportni lanac elektrona

Samo deo energije glukoze biva upotrebljen za proizvodnju ATP-a iz ADP-a. Najveći deo energije, međutim, ostaje u elektronima koji potiču iz C-C- i C-H-veza, a koji prelaze na prenosioce elektrona NAD^+ i FAD. Elektroni su još uvek na visokom energetskom nivou.

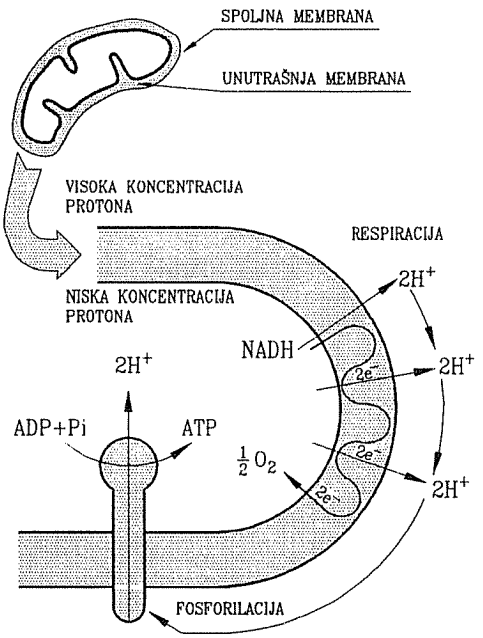
Na konačnom stupnju oksidacije glukoze ovi elektroni prelaze korak po korak na nizak energetski nivo kiseonika. Energija koju oni otpuštaju tokom ovog prolaska stvara ATP iz ADP-a. Ovaj postepeni prolaz omogućava serija prenosioca elektrona, od kojih svaki drži elektrone na nešto nižem energetskom nivou.

Ovi prenosioci sačinjavaju tzv. ***transportni lanac elektrona.*** Osnovne komponente ovog lanca su *citohromi.* Ove molekule se sastoje od porfirinskog prstena (slično onome u hemu), koji zatvara atom gvožđa. Svaki atom gvožđa alternativno prihvata i otpušta elektron predajući ga sledećem citohromu na nešto nižem energetskom nivou, sve dok elektroni, potrošivši energiju, ne pređu na krajnji akceptor – kiseonik. Energija oslobođena ovim silaskom elektrona koristi se za formiranje molekula ATP iz ADP-a. Ovakvo stvaranje ATP-a poznato je kao ***oksidativna fosforilacija.*** Na kraju lanca elektrone prihvata kiseonik, koji se zatim kombinuje sa protonima (vodonikovim jonima) iz rastvora stvarajući vodu. Svaki put kada dva elektrona pređu sa NADH na kiseonik formiraju se tri molekule ATP-a iz ADP-a i fosfata. Kada par elektrona prelazi sa $FADH_2$, koji elektrone drži na nešto nižem energetskom nivou nego NADH, formiraju se dve molekule ATP-a.

Mehanizam oksidativne fosforilacije

O načinu na koji se koristi energija "silazećih" elektrona za stvaranje ATP-a postoji nekoliko pretpostavki.

Danas je opšte prihvaćen model (sl. 1.26) prema kojem se za vreme transporta elektrona stvara protonski gradijent (različita koncentracija H^+) između dve strane unutrašnje membrane mitohondrije, što dovodi do oksidativne fosforilacije. Dok elektroni prolaze duž transportnog lanca, protoni se "pumpaju" iz matriksa u spoljašnji odeljak mitohondrije, usled čega nastaje različita koncen-



Slika 1.26 – Stvaranje ATP-a prema hemiosmotskom modelu

tracija protona na dve strane unutrašnje membrane, što stvara potencijalnu energiju. Povratak protona kroz membranu u matriks oslobađa energiju, koju koristi enzim (vezan za membranu) za fosforilaciju ADP-a u ATP.

Kontrola oksidativne fosforilacije

Elektroni nastavljaju prolazak duž transportnog lanca samo ako je dostupan ADP. Kada se zahtevi ćelije za energijom smanje, smanjuje se i potrošnja ATP-a, a time je dostupno i manje molekula ADP-a, te protok elektrona prestaje. Inače, sa svakim izlaskom jedne molekule ATP-a iz mitohondrije istovremeno jedna molekula ADP-a ulazi u mitohondriju.

Ukupni energetski bilans

Tokom glikolize nastaju 2 ATP-a direktno i 6 ATP-a preko dve molekule NADH. Međutim, ukupni dobitak je samo 6 ATP-a, jer se 2 molekule troše za transport 2 molekule NADH kroz membranu mitohondrije.

Pretvaranje pirogrožđane kiseline u acetil-CoA (u mitohondriji) daje dve molekule NADH za svaku molekulu glukoze, a to znači i 6 molekula ATP-a.

U Krebsovom ciklusu, po molekuli glukoze nastaju 2 ATP-a, 6 NADH i 2 $FADH_2$, ili ukupno 24 ATP-a.

Dakle, jedna molekula glukoze daje ukupno 36 molekula ATP-a. U toku celog procesa oslobađa se –686 kilokalorija (2868 kilodžula) po molekuli glukoze, a oko 252 (7 x 36) kilokalorija (1054 kilodžula) (oko 40%) po molekuli biva zadržano u visokoenergetskim vezama molekula ATP.

Katabolički putevi

Većina organizama energiju izdvaja iz masti i proteina, a ne direktno iz glukoze. Masti i proteini se razlažu i pretvaraju u molekule koje se mogu uključiti u nekoj tački u centralni put Krebsovog ciklusa.

Polisaharidi se razlažu na monosaharide koji se fosforilišu u glukozofosfat i u tom obliku se uključuju u glikolizu. Masti se prvo razlažu na glicerol i masne kiseline, a zatim se ove molekule razlažu u fragmente od 2 ugljenika koji ulaze kao acetil-CoA u Krebsov ciklus. Proteini se razlažu u aminokiseline, čiji skelet od ugljenikovih atoma, nakon otklanjanja amino-grupe (dezaminacija), prelazi u acetil-grupu ili u jedno od većih ugljeničnih jedinjenja glikolize ili Krebsovog ciklusa, odakle dalje nastavlja glavni put. Ovi različiti putevi razgradnje zajedno predstavljaju katabolizam. Međutim, različiti međuprodukti glikolize i Krebsovog ciklusa mogu poslužiti i kao prekursori za biosintezu, s tim što u tom slučaju drugi enzimi kontrolišu ove procese i što su putevi metabolizma drugačiji.

FOTOSINTEZA

Drugi proces, evolutivno stariji od ćelijskog disanja, koji obezbeđuje energiju u živim sistemima je fotosinteza. Fotosinteza je proces kojim se Sunčeva energija transformiše u hemijsku energiju, koja se koristi za sintezu organskih jedinjenja iz neorganskih materija, CO_2 i H_2O. Ovaj proces se odigrava u zelenim biljkama, koje u svojim ćelijama sadrže pigment hlorofil.

Život na našoj planeti bazira se na transformaciji Sunčeve energije u hemijsku. Ovaj proces obezbeđuje, direktno ili indirektno, organsku materiju i za nju vezanu energiju za sve biljne i životinjske organizme. Stoga je fotosinteza fundamentalni proces u prirodi i sve ostale biosinteze u živim sistemima nastavljaju se na fotosintezu.

Fotosinteza se odvija u hloroplastima u dve faze. U prvoj, *svetloj fazi,* odvijaju se reakcije zavisne od svetlosti: svetlosna energija se koristi za stvaranje ATP-a iz ADP-a i za redukciju nosača elektrona $NADP^+$ u NADPH. U drugoj, *tamnoj fazi,* energetski produkti prve faze koriste se za redukciju ugljenika iz CO_2 u prost šećer. Time hemijska energija molekula prenosilaca (ATP i NADH) prelaži u pogodniji oblik za transport i čuvanje, a istovremeno se formira skelet od ugljenikovih atoma, na kome mogu biti izgrađene druge organske molekule. Ovo vezivanje CO_2 u organska jedinjenja poznato je kao *fiksacija ugljenika.*

Svetla faza (reakcije zavisne od svetlosti)

Prema savremenom modelu, u tilakoidnoj membrani hloroplasta nalaze se fotosintetske jedinice koje sadrže nekoliko stotina pigmentnih molekula, koje služe za hvatanje svetlosti. Kad jedan od pigmenata apsorbuje kvantum energije, upućuje ga na *reaktivni centar* (poseban oblik hlorofila), koji izbacuje elektron na viši energetski nivo, odakle se prenosi na akceptor elektrona. Molekula hlorofila je na taj način oksidovana (izgubila je jedan elektron), pozitivnog naboja i sa vrlo visokim afinitetom za elektrone, koji brzo pristižu izbačeni iz molekula vode.

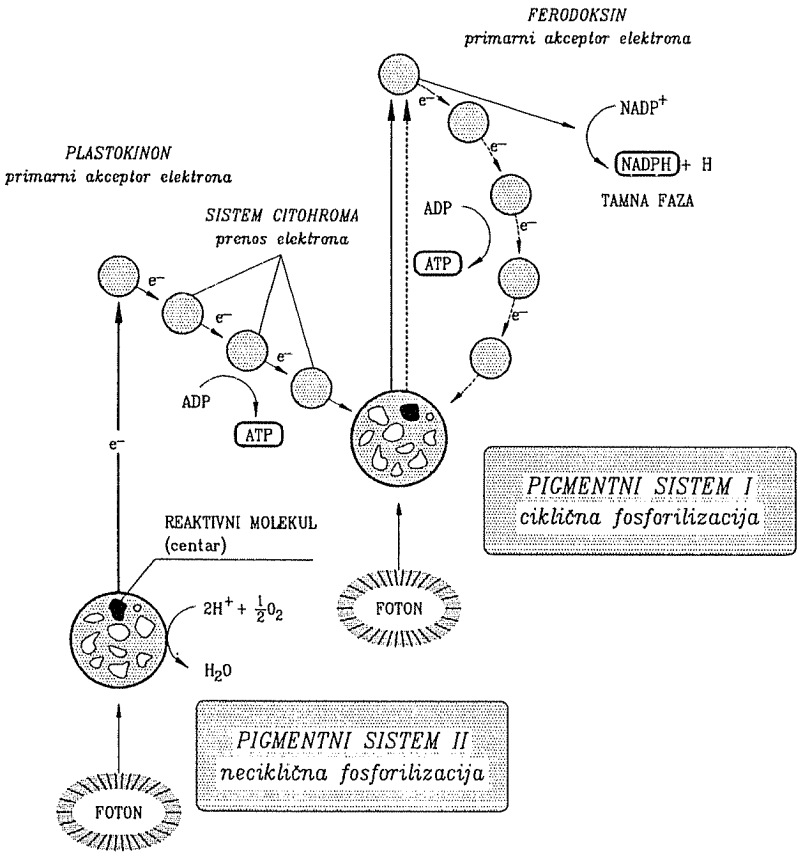
Prema sadašnjim nalazima, postoje dve različite vrste fotosintetskih jedinica, a svaka formira deo drugačijeg fotosistema: fotosistem I i fotosistem II sadrže različite reaktivne centre, koji predaju svoje elektrone različitim akceptorima elektrona.

Dva fotosistema su verovatno odvojeno evoluirala. Fotosistem I je nastao prvi i on, kao što će se videti, može da radi nezavisno. Međutim, u principu dva sistema rade zajedno, istovremeno i kontinualno (sl. 1.27).

Neciklična fotofosforilacija najsloženiji je oblik fotosinteze u kojoj se stvaraju i ATP i NADH, pri čemu dva fotosistema u seriji povećavaju energiju svakog elektrona. Svetlosna energija ulazi u fotosistem II (označava se tako jer je evolutivno nastao posle fotosistema I) i izbacuje iz reaktivnog centra elektrone na akceptor elektrona (viši energetski nivo). Izbačeni elektron zamenjuje u reaktivnom centru elektron iz molekule vode, koja na taj način disocira na protone i molekularni kiseonik:

$$(2\ H_2O \rightarrow\ 4\ H^+ + 4\ e^- + O_2)$$

Sa molekule akceptora elektrona elektron silazi niz transportni lanac elektrona na reaktivni centar fotosistema I (niži energetski nivo). Za vreme prolaska elektrona duž transportnog lanca deo energije elektrona pakuje se u ATP, koji se formira iz ADP-a verovatno istim mehanizmom kojim se stvara ATP duž transportnog lanca elektrona na unutrašnjoj membrani mitohondrije (sl. 1.28). Duž tog puta protoni prolaze kroz tilakoidnu membranu u tilakoidni prostor

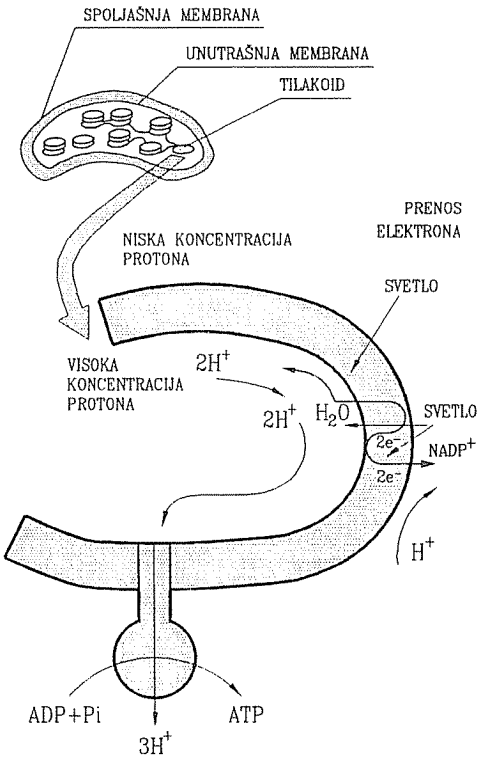


Slika 1.27 – Svetla (fotohemijska) faza fotosinteze

(lumen hloroplasta) stvarajući elektrohemijski gradijent, koji dovodi do sinteze ATP-a pomoću kompleksa enzima ATP-sintetaze. Sa fotosistema I elektron se izbacuje pomoću još jednog kvantuma svetlosti na još viši energetski nivo, odakle silazi na $NADP^+$, koji se sa još jednim ovakvim elektronom i protonom redukuje u NADPH. Elektron izbačen iz fotosistema I zamenjuje se elektronom iz fotosistema II.

Na svetlosti se, dakle, odvija kontinualan protok elektrona od vode ka fotosistemu II, fotosistemu I i $NADP^+$. Čist energetski dobitak iz svetle faze su ATP i NADPH, koji postaje glavni izvor energije za redukciju ugljenika. Za stvaranje jedne molekule NADH moraju biti apsorbovana četiri fotona – dva pomoću fotosistema II i dva pomoću fotosistema I.

Ciklična fotofosforilacija. Postoje dokazi da fotosistem I može takođe da radi i nezavisno, pri čemu se ne stvara NADPH. U ovom procesu, koji se naziva još i ***ciklični protok elektrona,*** elektroni se izbacuju iz reaktivnog centra fotosistema I na akceptor elektrona, odakle silaze preko serije posrednika, uključujući citohrome, natrag na reaktivni centar (sl. 1.27). Tokom prolaska elektrona sintetiše se ATP. Pretpostavlja se da na ovaj način funkcionišu najprimitivniji fotosintetski mehanizmi i da ovako izvode fotosintezu



Slika 1.28 – Hemiosmotski model fotofosforilacije

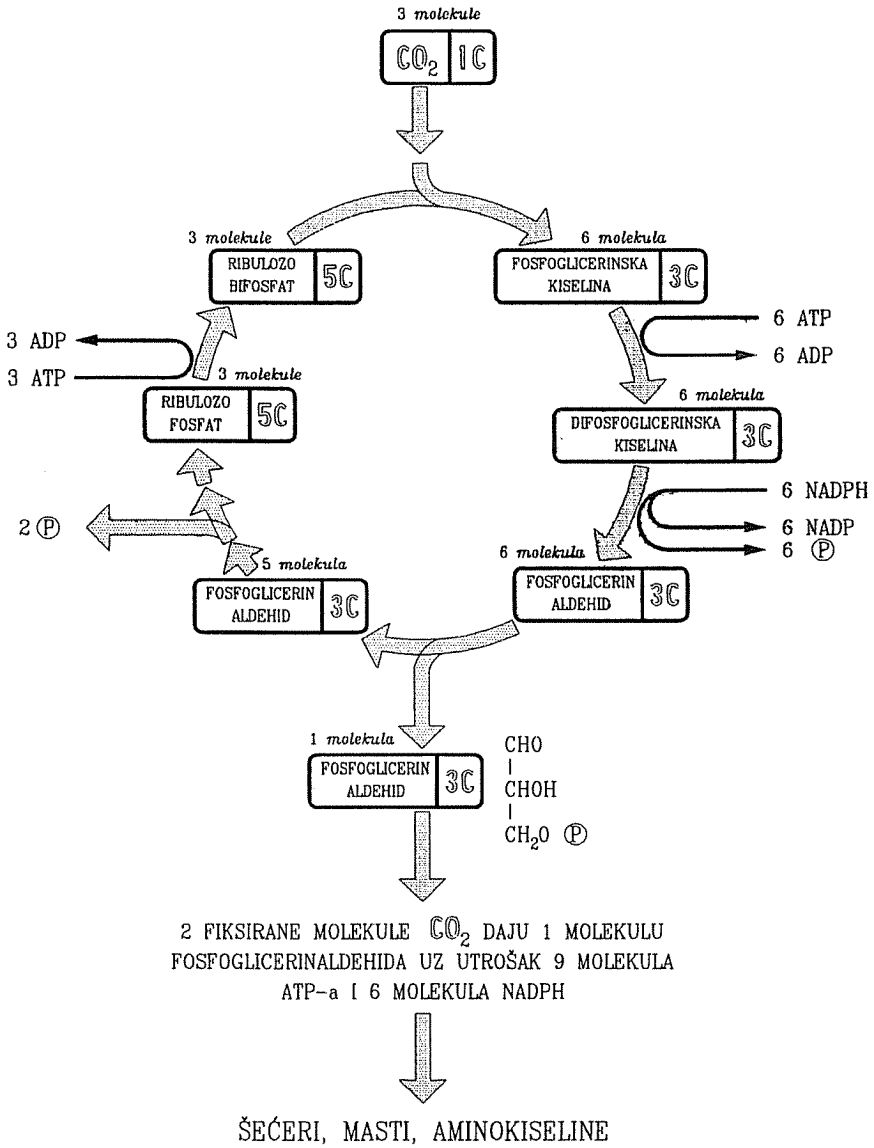
neki prokarioti. Takođe su i eukariotske ćelije sposobne da sintetišu ovim putem ATP u odsustvu $NADP^+$. Međutim, samo ako oba sistema funkcionišu stvara se O_2 i redukuje se ugljenik.

Ukratko, tokom svetlih reakcija svetlosna energija se pretvara u električnu energiju – protok elektrona – a električna energija u hemijsku energiju deponovanu u vezama ATP-a i NADPH-a.

Tamna faza (tamne reakcije)

U drugoj fazi fotosinteze ATP služi kao izvor energije, a NADPH kao redukciona sila za konverziju CO_2 u ugljene hidrate. Ove reakcije počinju u stromi hloroplasta, a nastavljaju se u citosolu. Pretvaranje neorganskog ugljenika (iz CO_2) u organski ugljenik (šećer od 3 C-atoma) naziva se, kao što je već rečeno, *fiksacija ugljenika*, a izvodi se u *Kalvinovom ciklusu*. Kalvinov ciklus se odvija u stromi hloroplasta i analogan je Krebsovom ciklusu po tome što se svakim ciklusom regeneriše početno jedinjenje. Početno (i završno) jedinjenje je šećer sa pet C-atoma za koji su vezane dve fosfatne grupe, ribulozodifosfat (RuDP). Ulaskom u ciklus CO_2 se vezuje za RuDP, koji se zatim razlaže na dve molekule fosfoglicerinske kiseline (PGA). Svaka molekula PGA sadrži tri C-atoma i stoga se ova reakcija naziva metabolizmom jedinjenja sa 3 ugljenika. Ovaj ključni proces katalizuje enzim RuDP-karboksilaza (čini više od 15% ukupnih proteina hloroplasta i stoga se kaže da je najobilniji protein u živom svetu) locirana na površini tilakoidne membrane. Kompletan ciklus je prikazan na slici (sl. 1.29). Svaki korak, kao i u Krebsovom ciklusu, reguliše specifičan enzim. Svakim punim krugom jedna molekula CO_2 ulazi u ciklus, redukuje se i jedna molekula RuDP se regeneriše. Tri kruga su potrebna da se proizvede šećer sa 3 ugljenika, fosfo-glicerin-aldehid, tako što se tri molekule RuDP (3 x 5 C-atoma) kombinuju sa tri molekule CO_2 (2 x 1 C-atom) dajući šest molekula fosfoglicerinske kiseine (6 x 3 C-atom), koji se dalje pretvaraju u šest molekula fosfoglicerin-aldehida (6 x 3 C-atoma). Od ovih 6 molekula, 5 se dalje kombinuju i prerasporeduju u 3 molekule RuDP sa 5 ugljenika, a jedna molekula predstavlja čist dobitak Kalvinovog ciklusa. Fosfoglicerin-aldehid, koji se stvara i u glikolizi, koristi se dalje kao polazna materija za metaboličke puteve kojima se stvaraju druga organska jedinjenja (proteini, lipidi, drugi ugljeni hidrati i dr.).

Neophodne su dve molekule fosfoglicerin-aldehida (6 krugova sa uvođenjem 6 C-atoma) da bi se dobio šećer sa 6 ugljenika, kao što je glukoza.



Slika 1.29 – Kalvinov ciklus

Energija koja pokreće Kalvinov ciklus je u obliku ATP-a i NADPH-a koji su proizvedeni u svetlim reakcijama. Da bi se fiksirala jedna molekula CO_2, potrebne su 3 molekule ATP-a i 2 molekule NADPH-a. Pošto je za jednu molekulu fosfoglicerin-aldehida neophodno da se fiksiraju 3 molekule CO_2, ukupan utrošak je 9 molekula ATP-a i 6 molekula NADPH-a.

Produkti fotosinteze

Šećer sa tri ugljenika (fosfoglicerin-aldehid) i njegovi derivati obezbeđuju: 1) izvor energije za sve žive sisteme i 2)

osnovni skelet od ugljenikovih atoma za sve organske molekule. Sem toga, dolazi do fiksacije ugljenika, a to znači da je ugljenik uveden iz neorganskog u organski svet. Molekule fosfoglicerin-aldehida se dalje metabolišu različitim putevima, što zavisi od aktivnosti i potreba ćelije. Često izgrađuju dalje glukozu i fruktozu, što u mnogim detaljima predstavlja obrnut proces od glikolize. Biljne ćelije od ovih šećera dalje prave skrob i celulozu (za vlastite potrebe), kao i saharozu, koju izvoze, dok ih animalne ćelije deponuju kao glikogen. Sve ćelije koriste šećere, uključujući fosfoglicerin-aldehid i glukozu, kao polaznu tačku za proizvodnju drugih ugljenih hidrata, lipida i, sa dodatkom azota, aminokiselina i azotnih baza. I konačno, ugljenik koji je fiksiran u fotosintezi predstavlja izvor ATP energije za heterotrofne ćelije.

2

Struktura i funkcija gena

NASLEDNA OSNOVA

Iako su nukleinske kiseline otkrivene još u XIX stoleću, tačnije rečeno pre više od jednog veka (1871. god. izolovao ih je švajcarski lekar F. Miescher) tek 1944. god. su Avery, MacLeod i McCarty pokazali da deoksiribonukleinska kiselina (DNK) predstavlja nasledni materijal. Ovi autori su, visoko prečišćenu DNK jednog soja bakterija izazivača pneumonije (Pneumococcus) prenosili u nepatogeni soj bakterija, pod delovanjem strane DNK, nepatogene bakterije su se genetički izmenile (transformisale) i postale patogene. Novo dobijeno svojstvo se prenosilo i na sledeće generacije. Primenom ekstrakta ribonukleinske kiseline (RNK) ili proteina nije došlo do genetičke izmene (transformacije) nepatogenog soja.

Nakon ovih eksperimenata sledi serija istraživanja u različitim laboratorijama i 1952. god. Hershy i Chase koristeći radioaktivne izotope 35 S i 32 P obezbeđuju direktan dokaz da je DNK genetički materijal određenih bakteriofaga.

Kada se bakteriofage, čiji su proteini omotača markirani sa 35 S unose u bakteriju (E coli), markirani protein uglavnom ostaje izvan ćelije. Ako je infekcija izvršena sa fagama čija je DNK markirana sa 32 P, tada je radioaktivitet otkriven u ćeliji domaćinu što je bio dokaz da DNK ulazi u ćeliju, a proteinski omotač ostaje izvan ćelije. Bakteriofage se u ćeliji domaćinu reprodukuju. Reprodukcija se vrši na osnovu genetičke informacije roditeljskog faga. Kako u ćeliju ulazi samo DNK, znači da ova supstanca sadrži genetičke informacije za formiranje novih virusa. Na ovaj način Hershy i Chase su definitivno dokazali da je DNK nasledni materijal.

Deoksiribonukleinska kiselina (DNK) je polimer izgrađen iz monomernih jedinica-nukleotida. Mononukleotid se sastoji iz jedne azotne baze, šećera pentoze i fosfatnog ostatka koji nastaje iz fosforne kiseline. Kada se fosfatna grupa otkloni ostaju dve komponente šećer i baza koje grade nukleozid. Nukleotidi se zbog toga nazivaju nukleozid fosfati i označeni su kao mono-, di-, i tri-fosfati zavisno od broja fosfatnih ostataka u molekulu.

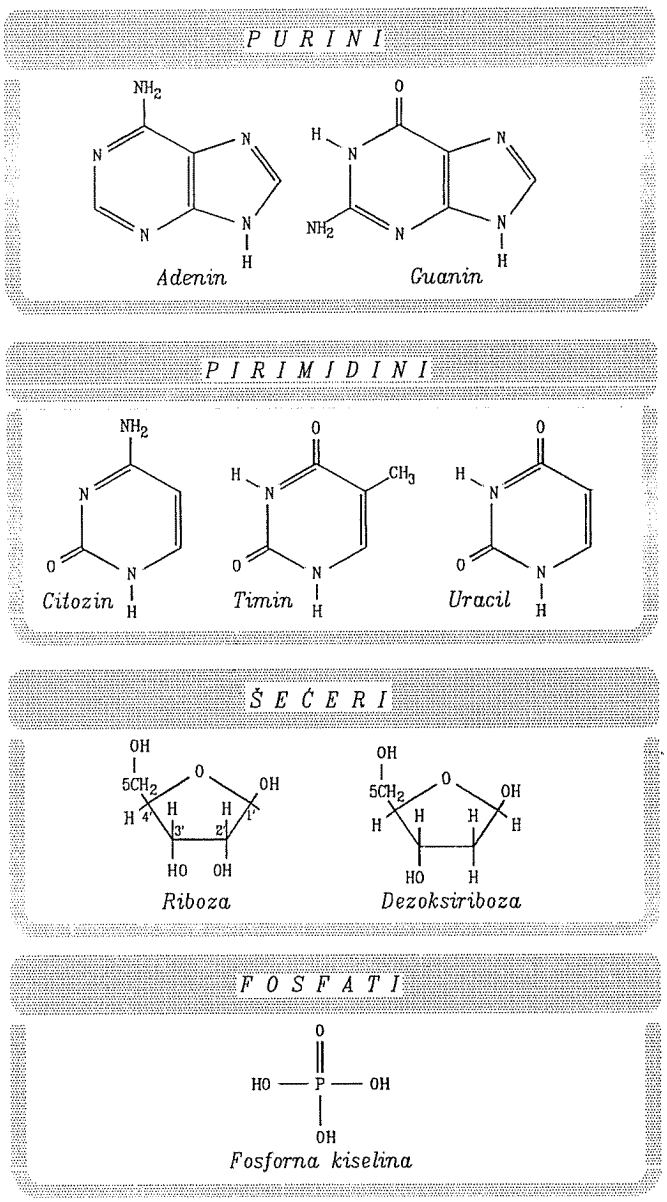
U sastav deoksiribonukleinske kiseline ulazi šećer deoksiriboza.

Heterociklične organske baze koje ulaze u sastav nukleotida su purini, adenin (A) i guanin (G) i pirimidini citozin (C) i timin (T). Azotne baze se vezuju za pentozu na položaju 1 C. (Sl. 2.1).

Nukleotidi se povezuju u polinukleotidne lance 3', 5' fosfodiestarskim ve-

zama-mostovima, tako što fosforna kiselina povezuje pentozu na položaju 5 C jednog nukleotida sa OH grupom na položaju 3 C pentoze sledećeg nukleotida. Sekvenke šećer-fosfat čine skelet lanca, nespecifičan deo DNK molekula.

Specifični deo deoksiribonukleinske kiseline predstavljaju azotne baze. Iako ima samo 4 tipa deoksiribonukleotida teorijske varijacije su skoro beskonačne i računaju se na 4^n, gde je 4 broj koji označava različite vrste nukleotida, a -n



Slika 2.1

je broj monomera u polimeru. Za molekul koji ima samo npr. 75. monomera, može biti 4^{75} različito raspoređenih nukleotida. Ako imamo u vidu da je broj monomera u jednom segmentu DNK daleko veći (prosečan gen može sadržati oko 500-1800 nukleotida) to su i mogućnosti kombinacija ogromne, pa se otuda javlja veoma mnogo različitih i specifičnih gena.

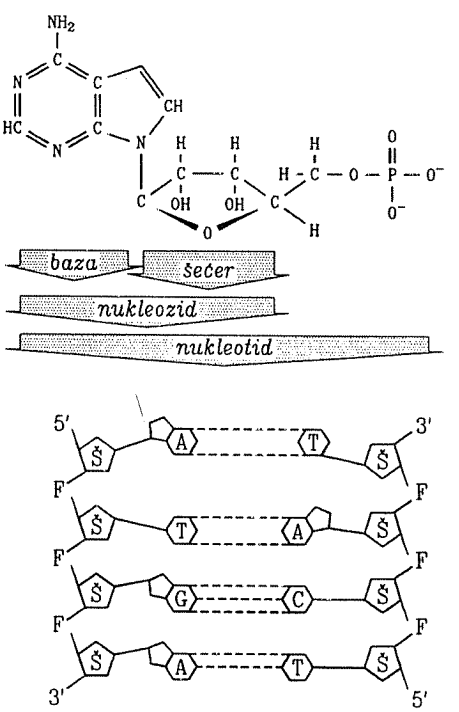
Molekul deoksiribonukleinske kiseline je u vidu dvostrukog heliksa. DNK se sastoji iz dva komplementarna polinukleotidna lanca koji se međusobno uvijaju u vidu spirale i povezuju vodoničnim vezama. Za adenin se uvek vezuje dvojnom vodoničnom vezom timin (A-T), a citozin se vezuje trostrukom vodoničnom vezom sa guaninom (C-G). (sl. 2.2).

Hemijske analize su pokazale da je odnos baza 1:1 između adenina i timina kao i između citozina i guanina. Ovaj odnos ne postoji između dva purina i dva pirimidina, ali ukupna količina purina je ista kao i ukupna količina pirimidina. Međutim, odnos A – T/G – C je vrlo različit i specifičan u različitim molekulima DNK.

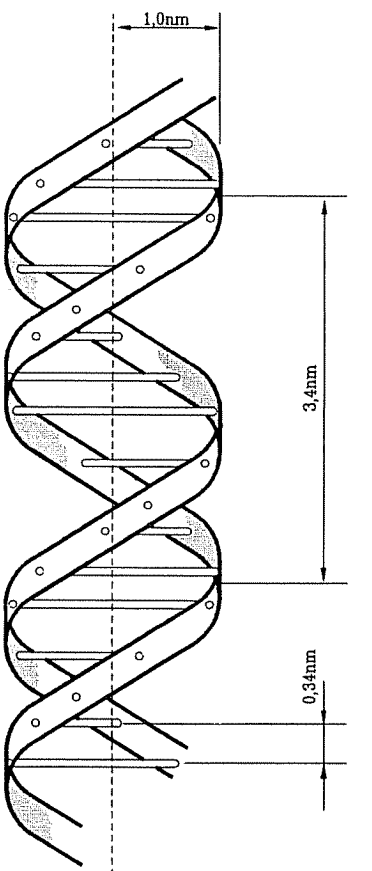
Deset parova nukleotida čini jedan zavoj heliksa dužine 3,4 nm, čija širina iznosi 2,0 nm. Rastojanje između dve baze-parova baza je 0,34 nm. (sl. 2.3).

Dvojni lanci deoksiribonukleinske kiseline (DNK) čine naslednu osnovu eukarita, procariota i virusa.

Međutim, otkriveni su virusi u kojih je genetski materijal predstavljen jednostrukim lancem DNK ili RNK. Grupa



Slika 2.2



Slika 2.3 – Dvostruki heliks DNK

virusa koja sadrži ribonukleinsku kiselinu (RNK) kao nasledni materijal nazivaju se RNK virusi.

Za razliku od deoksiribonukleinske kiseline ribonukleinska kiselina je u vidu jednostrukih polinukleotidnih lanaca. RNK se razlikuje od DNK i po sastavu baza: purinske baze, adenin i guanin i pirimidinska baza citozin su zajedničke za obe kiseline, dok timin ulazi u sastav DNK a pirimidinska baza uracil (U) u RNK. Šećer koji ulazi u sastav RNK je riboza, za razliku od DNK gde je šećer u obliku deoksiriboze.

HROMOSOMI EUKARIOTA

U eukariota su hromosomi složenije građe od cirkularnih hromosoma prokariota. Rezultati citohemijskih, ultrastrukturnih i biohemijskih ispitivanja pokazuju da se hromosomi eukariota sastoje iz DNK, male količine RNK, baznih proteina, histona, male molekulske težine i mnogo složenijih, nehistonskih, rezidualnih proteina. Ovi molekuli čine hromatin interfaznog jedra. Neki autori pominju i lipide u sastavu hromatina, ali se veruje da lipidi potiču od jedrove opne.

Histoni su bogati amino kiselinama lizinom i argininom, slični su u svih eukariota i mogu se podeliti u pet grupa prema sastavu i primarnom redosledu amino kiselina. Sličan sastav se održao prirodnom selekcijom tokom evolucije, što ukazuje da histoni u svih eukariota imaju istu funkciju. Oni predstavljaju strukturni deo hromatina i svi učestvuju u stabilizaciji pojedinačnih regiona dvostrukog heliksa DNK, sa kojom se direktno povezuju. DNK većine, a možda i svih eukariota, povezana je sa skoro istom količinom histona, što govori da se molarni odnos između DNK i histona očuvao tokom evolucije.

Ispitivanjem hromatina govečeta pomoću X – zraka i razlaganjem hromatina pacova pomoću enzima nukleaze, pokazano je da se na svakih 100 nm dužine hromatinske niti, ponavlja pravilna struktura, koja se sastoji iz 8 molekula histona i oko 200 parova nukleotida. Ovaj kompleks predstavlja osnovnu repetitornu jedinicu strukture hromosoma, i naziva se nukleozom.

Postoje predpostavke da se 6-10 nukleozoma povezuju u kompleksne jedinice, jedna jedinica bi tada obuhvatala oko 1500 parova baza – nukleotida, što bi odgovaralo veličini prosečnog gena.

Nehistonski, kiseli proteini su heterogeni, imaju manji afinitet prema DNK i verovatno se više povezuju međusobno ili sa histonima, a manje direktno za DNK. Ovoj grupi proteina pripadaju hromosomski enzimi DNK i RNK polimeraze, strukturni proteini i regulatori genske ekspresije.

RNK se nalazi u maloj količini i ne zna se da li ima strukturnu ili regulatornu ulogu u hromatinu. Teško je reći koji su molekuli stvarni strukturni delovi hromosoma, a koji su produkti transkripcije, translacije, stvaranja mitotskih struktura itd.

Struktura i funkcija hromosoma se menjaju u različitim fazama ćelijskog ciklusa. Hromosomi u interfazi ne pokazuju vidljivu strukturu jer su despiralizovani i DNK se odvaja od histona. U tom periodu hromosomi su vrlo aktivni u pogledu transkripcije (G_1 period) i replikacije (S period) a u G_2 fazi DNK se povezuju sa proteinima. U mitozi hromosomi se menjaju, spiralizuju, skraćuju, a količina proteina se povećava, dobrim delom i na račun nukleolusa, koji se u mitozi dezintegriše, razlaže se na ribonukleoproteinske čestice, koje se povezuju sa hromosomima. Količina histona se ne menja u mitotskim hromosomima.

Najnovija ispitivanja su pokazala da u diferenciranoj ćeliji funkcioniše relativno mali broj gena, među kojima i oni koji

omogućavaju specifičnost te ćelije. Drugi geni, aktivni u drugom tipu specijalizovanih ćelija, iako prisutni, ne prepisuju se u specifične iRNK.

Tokom poslednjih godina histoni se intenzivno ispituju kao mogući činioci u molekularnoj kontroli diferencijacije, diferencijalne genske aktivnosti i genske modulacije. Histoni se upoređuju sa represornom supstancom vezanom za gen operator na hromosomu prokariota. Međutim, kako su histoni nespecifični i kako postoji samo mali broj različitih histona teško je pretpostaviti da ovi molekuli mogu da odabiraju određena genska mesta za koja bi se vezivali i koja bi inaktivirali. Ako se izolovanim i inhibiranim jedrima timusa dodaje tripsin, oslobađa se oko 70% histona i sinteza RNK se povećava. Dodavanjem protamina ili histona ovim jedrima sinteza RNK prestaje. Vezivanje histona za DNK je očigledno reverzibilan proces.

Histoni se lako menjaju: metiliraju, acetiliraju ili fosforiliraju. U jedru uvek ima enzima koji katališu ove hemijske reakcije. Kada se kulturi ćelije limfocita doda fitohem aglutinin, protein biljaka, koji ubrzava acetilaciju histona u roku od oko 60 minuta povećava se sinteza proteina u limfocitima. Hormoni pankreasa, glukagon i insulin povećavaju fosforilaciju histona u ćelijama jetre i mlečne žlezde. Prema podacima iz literature, oba hormona povećavaju i sintezu enzima u ovim tkivima. Zahvaljujući hemijskim promenama histona, acetilaciji u prvom slučaju i fosforilaciji u drugom, razdvajaju se histoni od DNK, oslobođena DNK počinje transkripciju RNK, pa raste sinteza proteina.

Sada sa sigurnošću možemo da tvrdimo da je represija genoma eukariota ostvarena kroz nespecifično vezivanje histona za molekule DNK. U tom slučaju, aktivacija, derepresija gena mora da bude specifična. Na DNK oslobođenoj histona vrši se transkripcija više raznovrsnih RNK, što dokazuje da su u genomu prisutni geni koji pod određenim uslovima ne sintetišu RNK. Međutim, koji molekuli utiču na oslobađanje DNK iz kompleksa DNK – histoni, još uvek je nejasno. U kojoj meri u ovom procesu učestvuju nehistonski proteini, hromatina ili RNK hromatina, molekuli koji iz citoplazme ulaze u jedro ili signali i molekuli koji dolaze iz susednih tkiva, intercelularne tečnosti ili iz krvotoka, nije jasno.

Svaki metafazni hromosom se sastoji od dve hromatide, a hromatida predstavlja kompletan hromosom nastao u procesu replikacije u interfazi. Hromatide su među sobom povezane centromerom. Položaj centromera određuje dužinu kraka hromosoma, karakteristično morfološko svojstvo koje omogućava razlikovanje metafaznih hromosoma.

DNK hromosoma je u obliku linearnog dvostrukog heliksa (spirale). Dužina celokupne DNK čoveka organizovane u kontinuiran dvostruki lanac iznosila bi oko 2 m. Međutim, DNK eukariota ne predstavlja jedinstven lanac, već je raspoređena u više pojedinačnih hromosoma, čiji je broj karakterističan za svaku organsku vrstu.

Hromosomi eukariota pokazuju regionalnu diferencijaciju na euhromatične i heterohromatične segmente. Euhromatični segmenti su disperzniji, svetliji, rano se repliciraju u S fazi i imaju sposobnost genetske ekspresije.

Heterohromatični segmenti su kondenzovani, tamniji, kasno se repliciraju u S fazi i smatra se da predstavljaju najvećim delom neaktivne sekvence DNK u pogledu transkripcije.

Razlikuju se dva tipa heterohromatina: ***konstitutivni*** i ***fakultativni*** heterohromatin. Konstitutivni heterohromatin je prisutan u svim hromosomima u razli-

čitim količinama. Ovaj heterohromatin može da bude: a) sa određenim položajem i svim hromosomima, prisutan je u hromosomima svih tipova ćelija i u svim periodima životnog ciklusa, b) sa promenljivim položajem i promenljivom količinom u različitim tipovima ćelija i u različitim periodima životnog ciklusa, pa čak može da se razlikuje i među članovima homologog para hromosoma.

Fakultativni heterohromatin predstavlja funkcionalno neaktivno stanje nekih hromosoma. Karakterističan primer fakultativne heterohromatinizacije je inaktivni X hromosom u telesnim ćelijama ženki sisara.

Genom eukariota se karakteriše pojavom tri tipa sekvenci (redosleda) nukleotida DNK. Eksperimentalnim ispitivanjem je dokazano da genom svih eukariota sadrži jedinstvene (single) sekvence i sekvence koje se više puta ponavljaju.

Jedinstvene (single) sekvence se javljaju samo u jednoj kopiji u haploidnom genomu. Na ovim sekvencama se vrši transkripcija iRNK.

Intermedijerne repetitorne sekvence DNK se javljaju u 10-10^5 kopija u genomu. Ovoj grupi pripadaju i geni na kojima se sintetišu rRNK tRNK i iRNK za histone. Intermedijerne repetitorne sekvence predstavljaju heterogenu grupu i zauzimaju naizmeničan položaj sa jedinstvenim sekvencama duž molekula DNK. Ovakva organizacija je u saglasnosti sa hipotezom, da repetitorne sekvence pomešane sa jedinstvenim imaju regulatornu ulogu i na neki način kontrolišu transkripciju jedinstvenih sekvenci.

Visoko repetitorne sekvence DNK, označene i kao satelitna DNK javljaju se u vrlo velikom broju kopija u genomu $>10^5$. Satelitna DNK obuhvata ponavljanje istih ili sličnih repetitornih sekvenci dužine 5-300 nukleotida i smeštena je, uglavnom, u centromernim regionima hromosoma. Uloga satelitne DNK još uvek nije jasna. Kasno se replicira u S fazi i smatra se da ne vrši transkripciju RNK.

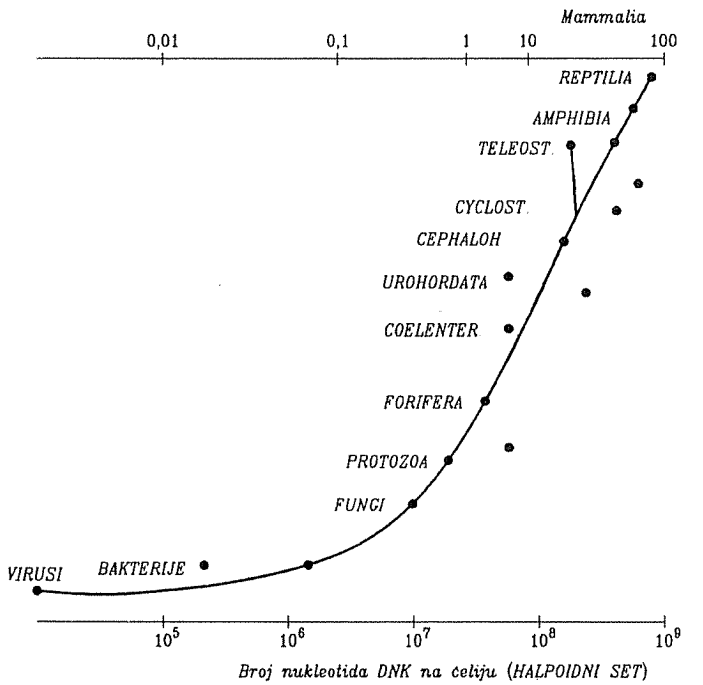
Sadržaj genetičkih informacija eukariota je povezan sa njihovim evolutivnim razvojem. Složeniji organizmi sadrže u principu veću količinu DNK.

Međutim, mnoge vrste u okviru pojedinih klasa eukariota imaju znatno više DNK od one količine koja karakteriše klasu kojoj pripadaju. Na primer, ako se uporedi količina DNK po haploidnom jedru u pripadnika najprogresivnije klase kičmenjaka – sisara, vidi se da se ista kreće u uskim granicama od oko 2-3 pikograma (2-3 x 10^9 parova nukleotida), dok u klasi amfiba količina DNK po haploidnom genomu široko varira od 1 pikograma do skoro 100 pikograma. Velika variranja u količini DNK postoje čak i između vrsta u okviru jednog roda, što ukazuje da razlike u količini DNK ne predstavljaju nužno i genetičku divergenciju, tj. količina DNK može varirati, a genetička složenost vrsta ostaje ista (sl. 2.4).

Smatra se da je osnovni mehanizam koji povećava količinu DNK u okviru hromosoma duplikacija, koja nastaje usled poremećaja u procesu replikacije DNK. Dokazano je, da deo genoma koji se ponavlja (repetitorne sekvence hromosoma), može značajno varirati po količini i sastavu. Ovo se naročito odnosi na satelitnu DNK.

Funkcionalna organizacija hromosoma eukariota je još sporna. Za poslednjih nekoliko godina, predložena su tri modela organizacije hromosoma. Ovi modeli predstavljaju pokušaj da se objasni odnos između količine DNK sadržane u genomu i broja genetičkih jedinica funkcije, kao i pokušaj da se objasni postojanje velikih razlika u količini DNK između srodnih vrsta.

Jedan model pretpostavlja da mali deo genoma eukariota sadrži genetičke



Slika 2.4

informacije, dok veći deo DNK ima ulogu u građi hromosoma. Dokazi za ovu hipotezu potiču iz populacione genetike, koji kažu, ako broj neophodnih gena u jednom organizmu pređe nekoliko hiljada, stopa akumulacije štetnih mutacija bi bila dovoljno visoka da uništi datu vrstu. Prema ovom modelu, svaka genetička jedinica funkcije bi se sastojala od jednog strukturnog gena, koji daje informacije za sintezu određenog proteina i odgovarajuće količine strukturne DNK, koja može varirati između srodnih vrsta, a da ne naruši njihov genetički komplement.

Master-slave (glavna i pomoćne kopije) model pretpostavlja da se funkcionalne genetičke jedinice sastoje od glavnog gena (master-gen) i mnogo istovetnih pomoćnih gena (slave geni). Prema ovom modelu razlika u količini DNK između srodnih vrsta se ogleda u različitom broju pomoćnih gena prema glavnom genu.

Regulatorni model – prema ovom modelu najveći deo DNK u svakoj genetičkoj jedinici funkcije predstavlja kontrolne elemente koji regulišu ekspresiju jednog ili nekoliko strukturnih gena.

Očigledno je da još uvek ne postoji zadovoljavajuće objašnjenje za funkciju velike količine DNK u genomu eukariota i za velike razlike u količini između srodnih vrsta.

Mada većina biologa smatra regulatorni model najprihvatljivijim, značajna pitanja koja se odnose na varijacije u količini DNK ostaju i dalje nejasna.

DNK eukariota je smeštena uglavnom u jedru u sastavu hromosoma. Mala količina DNK je prisutna i u citoplazmi u mitohondrijama i hloroplastima.

HROMOSOMI ČOVEKA

U jedru svake somatske ćelije čoveka nalazi se hromosomski komplement od

46 hromosoma, ili 23 para homologih hromosoma koji su predstavljeni sa dva kompletna seta hromosoma poreklom od majke i oca. Pored 22 para autosoma, u svakoj ćeliji se nalazi i par polnih hromosoma, koji su u ženskom polu isti XX (sl. 2.5a), a u muškom polu različiti XY (sl. 2.5b).

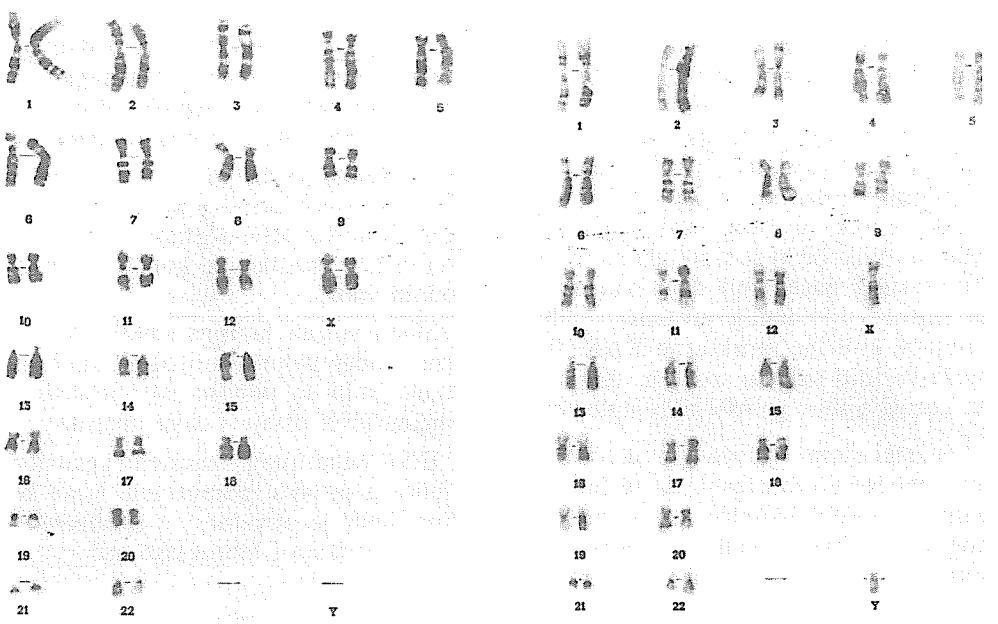
Svaki metafazni hromosom se sastoji od dve istovetne hromatide, a svaka hromatida sadrži jedan linearni molekul DNK povezan sa histonima i nehistonskim proteinima. Ovi drugi su specifični za tkivo i selektivno se vezuju za DNK.

Kao i u ostalih eukariota, DNK hromosoma se sastoji iz oko 50% jedinstvenih i oko 50% repetivnih sekvenci. Ukupan diploidni set hromosoma sadrži oko 7,1 x 10^9 parova nukleotida.

Jedinstvene sekvence dužine oko 2 Kb obuhvataju strukturne gene za različite proteine i naizmenično su raspoređene najčešće sa srednje repetitivnim sekvencama, dužine oko 0,3 Kb, koje imaju regulatornu funkciju u genomu. (KIloba-za – Kb iznosi hiljadu parova nukleotida)

Srednje repetitivne sekvence u određenim lokacijama se prepisuju u rRNK (NOR-ovi na kratkim kracima akrocentričnih hromosoma) u 5S rRNK na dugom kraku hromosoma 1 (rRNK za 5S). Sa srednje repetitivnih sekvenci se prepisuju i tRNK, kao i iRNK za histone. Ove sekvence za histone se nalaze na hromosomu 7 čoveka.

Visoko repetitivne sekvence (satelitne DNK) uglavnom su raspoređene u pericentromernim regionima hromosoma, telomerama i dugom kraku Y-hromosoma (konstitutivni heterohromatin). Ove sekvence bi mogle biti uključene u spiralizaciju hromosoma u mitozi i mejozi, konjugaciju a kasnije i separaciju homologih hromosoma u mejozi.



Slika 2.5 – Normalan kariotip 46, XX i 46, XY (a i b).

Konstitutivni – centromerni heterohromatin, kao i heterohromatični region na q-kraku Y-hromosoma, mogu znatno varirati. Ove varijacije u količini heterohromatina mogu biti u granicama normalnog polimorfizma humanog kariotipa i nemaju nikakve fenotipske efekte. S druge strane, polimorfizam pojedinih hromosoma, naročito hromosoma 1, 9, 16 i Y, kao i kratkih krakova akrocentričnih hromosoma, može biti mnogo češće zastupljen u indikovanim grupama ljudi (npr., u osoba sa reproduktivnim poremećajima ili u nekim kliničkim fenotipovima), što ukazuje na to da polimorfizam heterohromatičnih regiona nije u potpunosti selektivno neutralan i ne predstavlja uvek normalnu varijantu kariotipa čoveka (sl. 2.6a, b, c, d).

Fakultativni heterohromatin predstavlja npr. jedan kondenzovani inaktivni X-hromosom u osoba ženskog pola ili u osoba muškog pola koje imaju više od jednog X-hromosoma.

Svaki hromosom ima centromeru, a prema položaju centromere, koja deli hromosom na dva kraka (kratak, označen sa p, i dugi, označen sa q) ustanovljene su tri grupe hromosoma čoveka (sl. 2.5 a,b): metacentrični hromosomi, sa medijalnim položajem centromere, submetacentrični, sa centromerom pomerenom prema jednom kraju hromosoma, i akrocentrični, sa terminalnim položajem centromere (grupa D-i G-hromosoma). Metacentrični hromosomi su 1, 3, 16, 19 i 20, akrocentrični su 13-15, 21-22 i Y, a svi ostali hromosomi su submetacentrični (sl. 2.5).

Centromera je deo hromosoma koji u interakciji sa deobnim vretenom obezbeđuje pravilnu segregaciju hromosoma. U samoj centromeri ili u njenoj blizini nalazi se familija sekvenci DNK dužine oko 170 bp, koje se periodično ponavljaju i organizovane su u jedinice prosečne dužine 5,7 Kb.

Telomere hromosoma predstavljaju prirodne krajeve linearnog molekula DNK i imaju višestruke funkcije. Jedna od najznačajnijih funkcija je očuvanje linearnog integriteta hromosoma i zaštita od degradacije ili fuzije slobodnih krajeva DNK hromosoma. Telomere su povezane sa membranom jedra i imaju specifičan raspored u jedru.

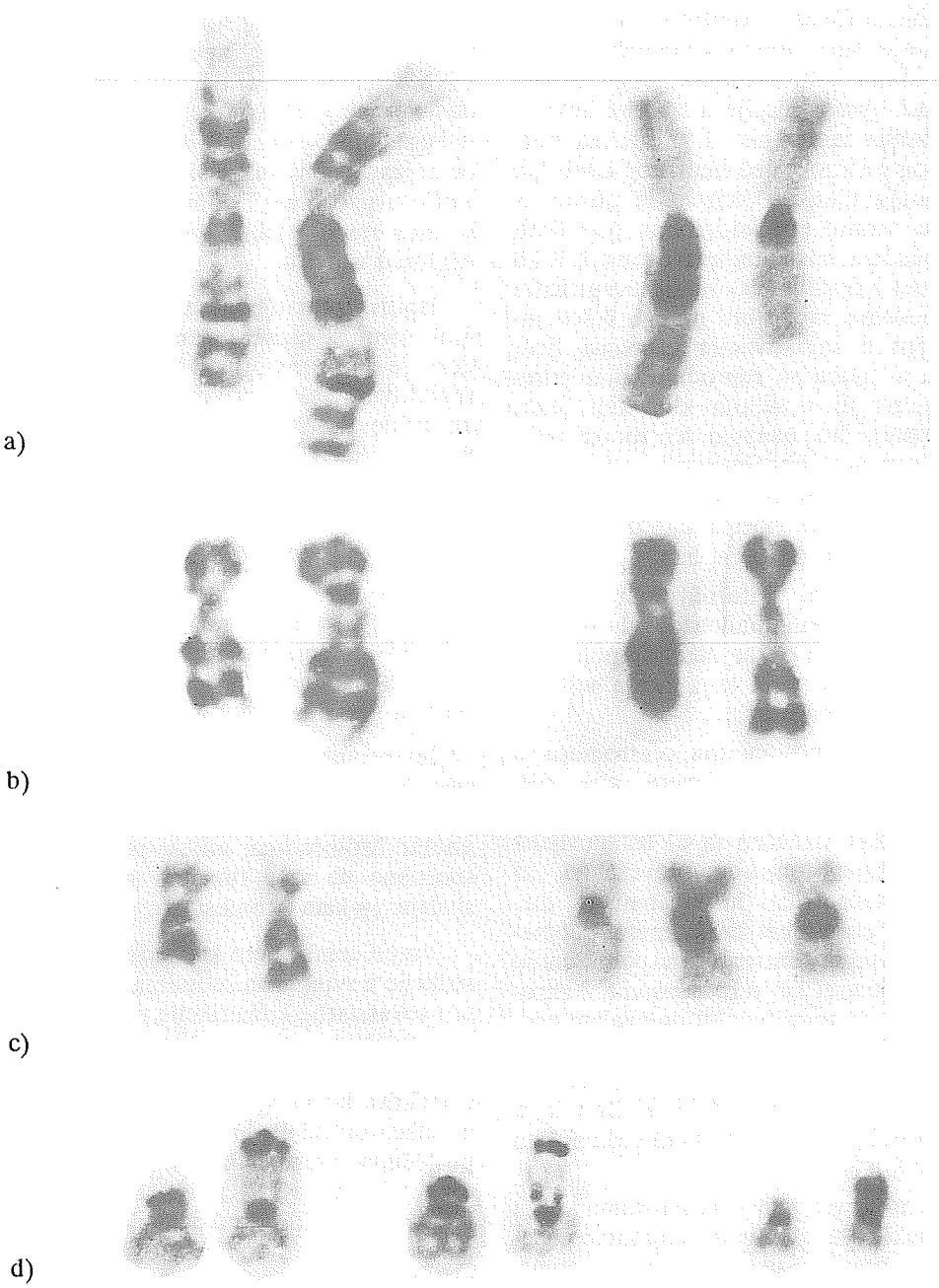
Ispitivanjem telomera na molekularnom nivou u različitih organizama utvrđeno je da se sastoje od različitog broja repetitivnih sekvenci koje mogu varirati od ćelije do ćelije. Pokazalo se da u kratkim kracima X- i Y-hromosoma čoveka postoji veliki varijabilitet u broju minisatelitnih sekvenci unutar telomernog segmenta od 30 Kb.

Terminalni segmenti (telomere) menjaju se i u toku razvića. Dolazi do delecije telomernih sekvenci u somatskim ćelijama u odnosu na dužinu ovih sekvenci u germinativnim ćelijama.

Interesantno je i prisustvo ***kriptičnih telomera*** u genomu čoveka. To su sekvence DNK koje su normalno prisutne unutar hromosoma, ali su potencijalno sposobne da vrše funkciju telomera u slučaju prekida hromosoma.

Pored centromere kao primarne konstrikcije u svim hromosomima, pojavljuju se i sekundarne konstrikcije u određenim hromosomima (sl. 2.5). Naročito su dobro izražene u centromernim regionima q-krakova hromosoma 1, 9, 16 i p-kracima akrocentričnih hromosoma (na ovim poslednjim predstavljaju regione koji sadrže gene za rRNK). Na terminalnim delovima kratkih krakova akrocentrika nalaze se sateliti, koji mogu znatno varirati po veličini, a mogu biti i dvojni (sl. 2.6d).

Pre upotrebe modernijih citogenetičkih tehnika hromosomi slične veličine i oblika su razvrstani u sedam grupa:



Slika 2.6 – Heterohromatične varijante hromosoma 1, 9, 16, i G hromosoma (a, b, c i d)

GRUPE	HROMOSOMI
A	1 – 3
B	4 – 5
C	6 – 12,X
D	13 – 15
E	16 – 18
F	19 – 20
G	21 – 22,Y

Ranih pedesetih godina niz tehničkih dostignuća je doprineo izučavanju hromosoma čoveka.

Pre svega, savladana je kultura tkiva. Iako se mogu koristiti različita tkiva u kulturi za analizu hromosoma, najčešće se kultivišu limfociti periferne krvi (48-72 sata) i tako se dobije zadovoljavajući broj ćelija u deobi, što se postiže dodavanjem jednog mitogena, fitohemaglutinina, koji stimuliše rast i deobu ćelija u kulturi.

Dodavanjem jednog biljnog alkaloida – kolhicina ili kolcemida – kulturi ćelija sprečava se formiranje deobnog vretena i ćelije se zadržavaju na stadijumu metafaze, kada su hromosomi kondenzovani i lako se mogu uočiti njihov broj i oblik.

Određivanje tačnog broja hromosoma je bilo moguće kada je upotrebljen hipotonični rastvor, koji oslobađa hromosome i sprečava njihovo preklapanje.

Posle hipotoničnog rastvora i fiksacije ćelija pristupa se bojenju hromosoma.

Za poslednjih dvadesetak godina razvile su se tehnike bojenja koje dozvoljavaju preciznu identifikaciju svakog para hromosoma. Pokazalo se da se posle određenog tretmana i primene odgovarajuće boje na svakom paru hromosoma pojavljuju karakteristične trake duž hromosoma, koje odražavaju strukturni i funkcionalni sastav hromosoma.

U najčešćoj upotrebi je tehnika G-traka, kada se posle bojenja preparata Giemsom na hromosomima pojavljuju tamne i svetle trake (sl. 2.5a,b). Tamne trake odgovaraju heterohromatičnim regionima, a svetle euhromatičnim regionima hromosoma.

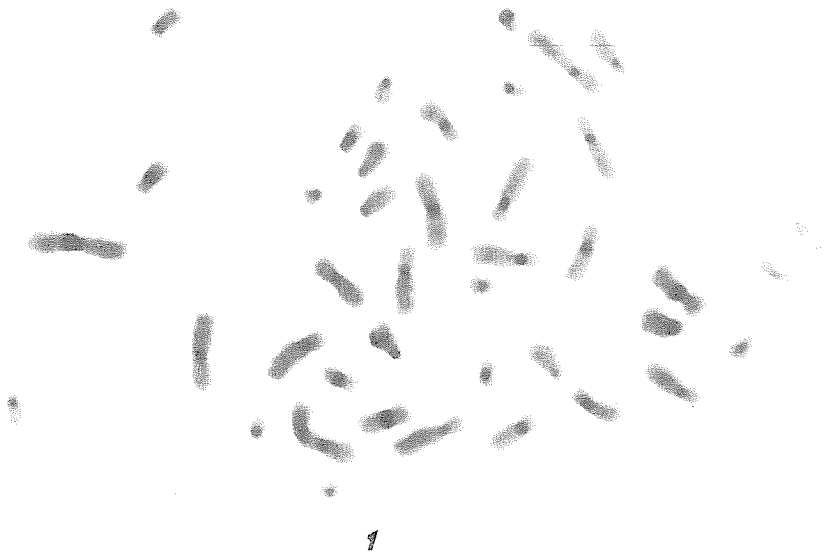
Alternativna metoda je bojenje hromosoma kvinakrinom a preparati se moraju posmatrati fluorescentnim mikroskopom. Trake koje se pojavljuju na hromosomima se uglavnom poklapaju sa G-trakama. Za ispitivanje konstitutivnog heterohromatina, u pericentromernim regionima hromosoma, koristi se tehnika C-traka (sl. 2.7).

Tehnika R-traka daje suprotne efekte u poređenju sa tehnikom G-traka i koristi se naročito za ispitivanje terminalnih regiona hromosoma.

Sve ove tehnike obezbeđuju ne samo određivanje svakog para hromosoma već i izučavanje suptilnijih, naročito strukturnih aberacija hromosoma, na osnovu čega se mogu definisati novi hromosomski sindromi u medicini.

REPLIKACIJA DNK MOLEKULA

Živi organizmi (sistemi) održavaju svoju vrstu putem procesa duplikacije ili reprodukcije. Duplikaciji (reprodukciji) organizma prethodi replikacija molekula deoksiribonukleinske kiseline (DNK). Pod replikacijom se podrazumeva proces pri kome iz jednog molekula DNK nastaju dva identična molekula DNK. Deoksiribonukleinska kiselina predstavlja jedine poznate molekule sposobne za autoreplikaciju (autoreprodukciju). Svaki DNK molekul koristi vlastitu strukturu kao model za sopstvenu replikaciju. To je autokatalitička funkcija DNK molekula. Watson i Crick (1953) daju objašnjenje strukture molekula DNK i od-



Slika 2.7 – Metafaza in situ C trake.

nosa organskih baza u dvostrukom lancu. Prema Watson-Crick-ovom modelu dva originalna lanca DNK su komplementarna jedan drugom. Pre procesa duplikacije lanci DNK se despiralizuju a vodonične veze između baza se razdvajaju i jednostruki lanci počinju da se repliciraju. Svaki jednostruki lanac deluje kao model za formiranje novog komplementarnog lanca. Na taj način u svakom ciklusu replikacije na stari jednostruki lanac komplementarno se vezuju odgovarajući nukleotidi, tako da se obrazuje novi dvostruki lanac DNK, koji se sastoji iz jednog starog i jednog novog lanca. Ovakav način replikacije nazvan je polukonzervativan (semikonzervativan) (sl. 2.8).

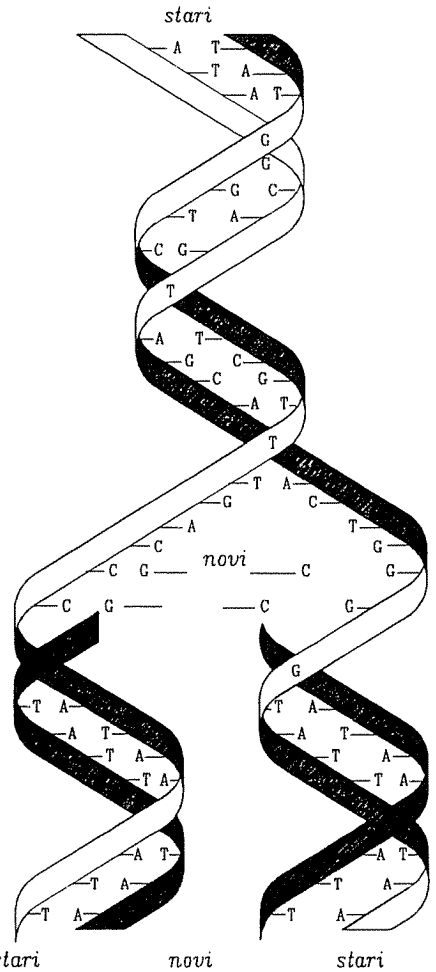
Meselson i Stahl (1958) su eksperimentalnim putem dokazali da se replikacija vrši na polukonzervativan način. Oni su gajili bakterije na podlozi koja je sadržala neradioaktivni izotop azota $_{15}N$ dok sve bakterije u kulturi nisu imale DNK markiranu pomenutim izotopom. Zatim su bakterije prenete na novu podlogu koja je imala prirodni izotop azota ^{14}N. Nakon prve generacije bakterija u novoj podlozi sa ^{14}N Meselson i Stahl su finom fizičkom metodom dokazali da se DNK bakterija sastoji samo od molekula koji imaju istu količinu ^{15}N i ^{14}N. Prema njihovim rezultatima svaki molekul je bio hibrid i svaki je sadržavao jedan laki (^{14}N) i jedan teški lanac (^{15}N).

Kasnije je putem autoradiografije i kod viših formi dokazan polukonzervativan način replikacije.

Proces replikacije DNK molekula Eucariota se odvija u interfazi, podfazi S, kada se hromosomi nalaze u despiralizovanom stanju. Replikacija može da započne nakon odvajanja histona od DNK molekula.

U proces replikacije DNK Procariota i Eucariota je uključeno više enzima.

Despiralizacija se vrši u etapama i predpostavlja se da tada dolazi i do raskidanja vodoničnih veza između baza. Na taj način svaki od ovih jednostrukih lanaca DNK, nastao razdvajanjem vodoničnih veza između baza, služi kao model za sopstvenu replikaciju. Duže vreme se



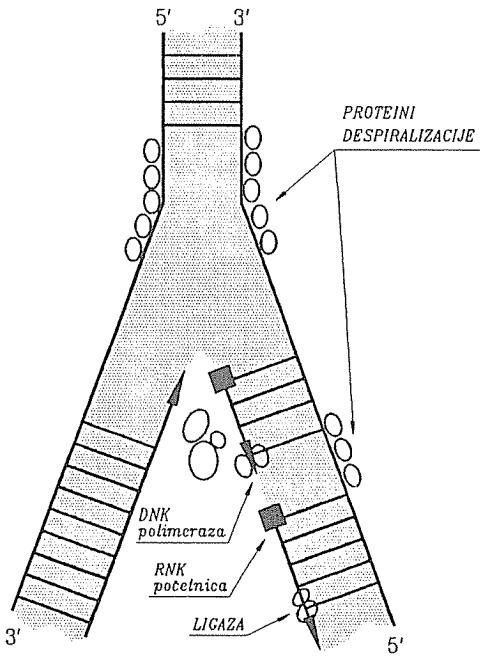
Slika 2.8 – Dijagram koji pokazuje odvajanje lanaca DNK i početak replikacije sa novonastalim naspramno položenim lancima nove DNK

predpostavljalo da neki protein ili proteini moraju biti prisutni u ćeliji da olakšaju proces despiralizacije dvostrukog lanca. Prvi protein "odvijanja" izolovan je iz faga T^4 parazita E. coli. Protein, produkt gena 32 označen je kao protein 32. I u ćelijama Eucariota su takođe označeni proteini despiralizacije. Ovi proteini ne samo da se vezuju za jednostruke lance DNK i stabilizuju ih u toku replikacije već delimično mogu da se vezuju i za dvostruki lanac DNK i potpomažu despiralizaciju, a takođe olakšavaju sparivanje baza između jednostrukih niti za vreme DNK replikacije i rekombinacije.

Značajan enzim u procesu replikacije je DNK polimeraza. U ćeliji postoji više DNK polimeraza. Danas je opšte prihvaćeno da je DNK polimeraza III replikacioni enzim. Ovaj enzim katalizuje povezivanje baza u novi lanac, a izgleda da je uključen i u selekciju baza koje odgovaraju DNK modelu.

Međutim, poznato je da DNK polimeraza ne može da započne replikaciju, iako katalizuje polimerizaciju lanca DNK molekula. Inicijacija sinteze DNK je katalizovana jednom RNK polimerazom. Pod uticajem ovog enzima sintetiše se jedan oligonukleotidni molekul RNK nazvan RNK početnica, koji započinje proces sinteze, a zatim DNK polimeraza nastavlja replikaciju DNK molekula. Enzim nukleaza specifično prepoznaje region gde je RNK početnica u položaju 3' kovalentnom vezom povezana za 5' položaj deoksiribonukleotida. Ovaj enzim iseca RNK početnicu. Nakon uklanjanja RNK početnice gepovi (praznine) se moraju popuniti deoksiribonukleotidima. Taj proces obezbeđuje DNK polimeraza I. (sl. 2.9).

Replikacija DNK molekula se uvek vrši u 5'-3' pravcu, što znači da će se deoksiribonukleozid trifosfat u kome je fosfatna grupa vezana za deoksiribozu u položaju 5 C, spojiti sa OH grupom deoksiriboze koja je u položaju 3 C zadnjeg nukleotida u novoformiranom lancu DNK. Znači kovalentna veza se ostvaruje između fosfatne grupe jednog nukleotida koja je u položaju 5' sa OH grupom u položaju 3' deoksiriboze susednog nukleotida. Novi komplementarni nukleozid-trifosfat se uključuje pod dejstvom DNK polimeraze III koja ostvaruje kovalentne veze između nukleotida kao i selekciju odgovarajućih komplementarnih baza.



Slika 2.9

Dvostruki lanac DNK molekula je suprotnog polariteta, tj. ako u jednom lancu C atomi deoksiriboze idu od 5' prema 3' onda će u drugom redosledu C atoma u tom istom smeru biti od 3'-5', te će se i replikaciija u obe niti odvijati u suprotnom smeru. Na primer, u lancu čiji je smer 3'-5' replikacija će se odvijati od kraja lanca kontinuirano. U drugoj niti, smera 5'-3', međutim, replikacija će započeti u dnu replikacione viljuške i teći do kraja lanca. Daljim razdvajanjem vodoničnih veza prvi lanac se i dalje kontinuirano replicira a drugi opet započinje u dnu replikacione viljuške; znači, u ovom slučaju dobijaju se fragmenti (Okasaki) koje enzim ligaza povezuje u kontinuirani lanac.

DNK molekul procariota tj. cirkularni hromosom bakterija, koji je pričvršćen za ćelijsku membranu, ima samo jedno mesto gde počinje replikacija. Drugim rečima, bakterijski hromosom predstavlja jednu jedinicu replikacije-replikon, prema hipotezi Žakob i sar. (1963). Fundamentalno svojstvo replikona je u tome što replikon raspolaže sopstvenim sistemom koji reguliše njegovu replikaciju. Replikon bakterija sadrži determinante dva tipa:

1. strukturni gen koji daje proteinski produkt "inicijator" i
2. specifično mesto na DNK koje se naziva "replikator" koji inicijator prepoznaje.

Interakcija inicijatora i replikatora predstavljaju signal za početak sinteze DNK molekula na određenom mestu. Replikacija DNK molekula procariota počinje na inicijalnom mestu i teče ili samo u jednom pravcu, ili u oba pravca. Izgleda da je češća replikacija u oba pravca (Sl. 2.10).

Međutim, u eucariota DNK molekuli imaju više inicijalnih mesta replikacije tj. imaju više replikona i usled toga može doći do replikacije DNK molekula na više mesta istovremeno.

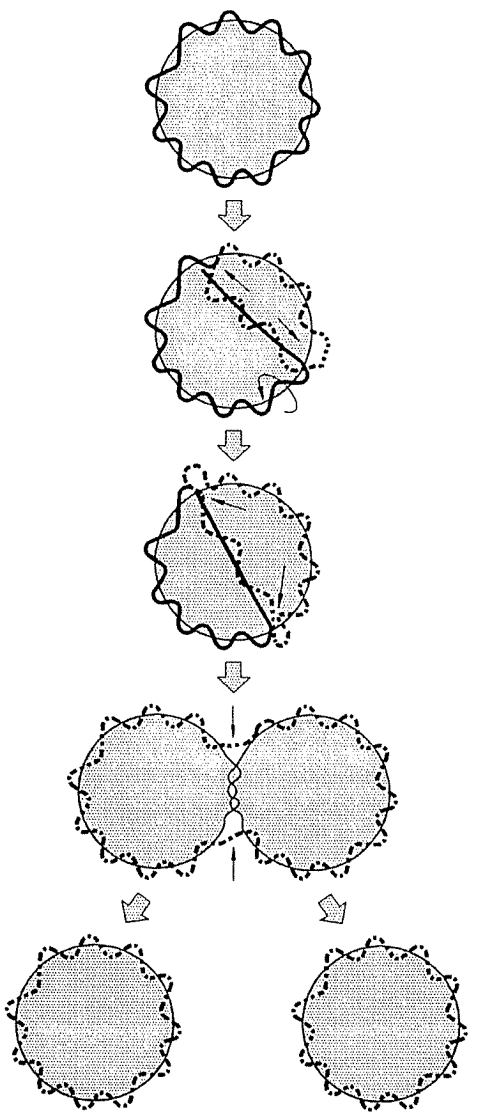
Pojava više replikona u molekulima DNK eucariota je svakako u vezi sa kompleksnijom građom i većom količinom naslednog materijala u ćelijama eucariota. Replikacija DNK eucariota se vrši u određenom periodu životnog ciklusa ćelije u S podfazi interfaze. Prosečna dužina S faze u ćelijama u kulturi nekih vertebrata iznosi 6-8 časova, a ustanovljeno je da se za jedan minut sintetiše samo 1-2 μm DNK. To znači da bi se u periodu S faze sintetisao molekul DNK dužine od 720-960 μm (2 μm x 480 min = 960 μm za 8 časova). Međutim, količina DNK je daleko veća u hromosomskom komplementu. Da bi se objasnila replikacija tako velike količine DNK za relativno kratko vreme koliko traje S faza vršena su autoradiografska ispitivanja i ispitivanja Elektronskim mikroskopom (EM) koja su potvrdila, da postoji više tačaka (replikona) na kojima isto-

vremeno započinje replikacija molekula DNK. Replikacija DNK se odvija mnogo brže u fazi brazdanja u toku embriogeneze, kada su ćelijske deobe intenzivne. Tada se na hromosomima može zapaziti veliki broj replikona, međusobno udaljenih 3-4000 baza, a replikacija se završava samo za nekoliko minuta. U ćelijama odrasle individue replikacija je sporija, a postoji i razlika između euhromatičnih i heterohromatičnih regiona hromosoma. Euhromatični regioni se repliciraju ranije i brže, razdaljina između replikona na jednom hromosomu iznosi u proseku 30000 baza, a replikacija traje oko 1 čas. Heterohromatični regioni hromosoma se repliciraju kasnije i sporije, razdaljina između regiona je oko 300000 baza, a replikacija traje oko 10 časova.

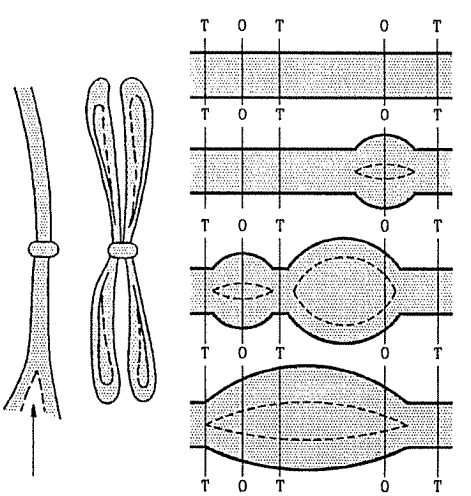
U ženskom polu heterohromatični X hromosom se uvek replicira kasnije od drugih hromosoma u S fazi interfaze. U ćelijama eucariota replikacija DNK se vrši u oba pravca (sl. 2.11).

R. Okazaki je prvi pokazao da replikacija DNK prokariota i eukariota, ne teče kontinuirano u okviru jednog replikona već se vrši na kratkim fragmentima koji se kasnije spajaju u kontinuirani lanac. U mutantnih oblika E coli, koji nemaju enzim potreban za spajanje tih kratkih fragmenata DNK se sastoji iz delova.

Povezivanje kratkih Okazakijevih fragmenata u kontinuirani lanac DNK katalizuje enzim ligaza, koja je prvobitno otkrivena kao enzim koji ima ulogu u rekombinaciji genetskog materijala i u



Slika 2.10 – Replikacija prstenastog hromosoma bakterija.



Slika 2.11

reparaciji oštećenih delova DNK molekula. Međutim, kasnije je ustanovljeno da ligaza ima značajnu ulogu i u normalnim procesima replikacije i da povezuje fosfodiestarskim vezama kratke delove DNK u kontuirani lanac.

Denaturacija i renaturacija DNK – hibridizacija

Pošto se struktura dvostrukog lanca DNK održava slabim vodoničnim vezama i hidrofobnim interakcijama, moguće je uz pomoć toplote ili drugim tretmanom odvojiti lance DNK. Ovaj proces odvajanja se naziva *denaturacija.* Laganim hlađenjem odvojenih lanaca dolazi do ponovnog spajanja komplementarnih baza i uspostavljanje dvostrukog heliksa. Ovaj proces se naziva *renaturacija.*

Renaturacija DNK je vrlo značajan proces jer se na taj način mogu formirati hibridni molekuli DNK između različitih vrsta, a nivo hibridizacije ukazuje na stepen genetičke sličnosti.

Jednostruka DNK može formirati hibride sa RNK. Ovo svojstvo renaturacije se može koristiti da se odredi koji deo DNK predstavlja model za sintezu određene RNK.

Ispitivanje renaturacije je dovelo i do otkrića repetitivnih sekvenci u molekulu DNK eukariota.

REPLIKACIJA JEDNOLANČANIH DNK- I RNK-VIRUSA

Osnovna razlika između virusa i ćelije je u tome što ćelija sadrži i DNK i RNK, a virusi samo jedan tip nukleinske kiseline, ili DNK ili RNK.

Genetička komponenta virusa, dvolančana ili jednolančana DNK ili RNK, smeštena je uvek u centru virusne čestice i zaštićena manje ili više složenim omotačem. Omotač je sastavljen od jednog ili više tipova proteina, a u nekih virusa, uz različite proteine, nalaze se i lipidi i ugljeni hidrati.

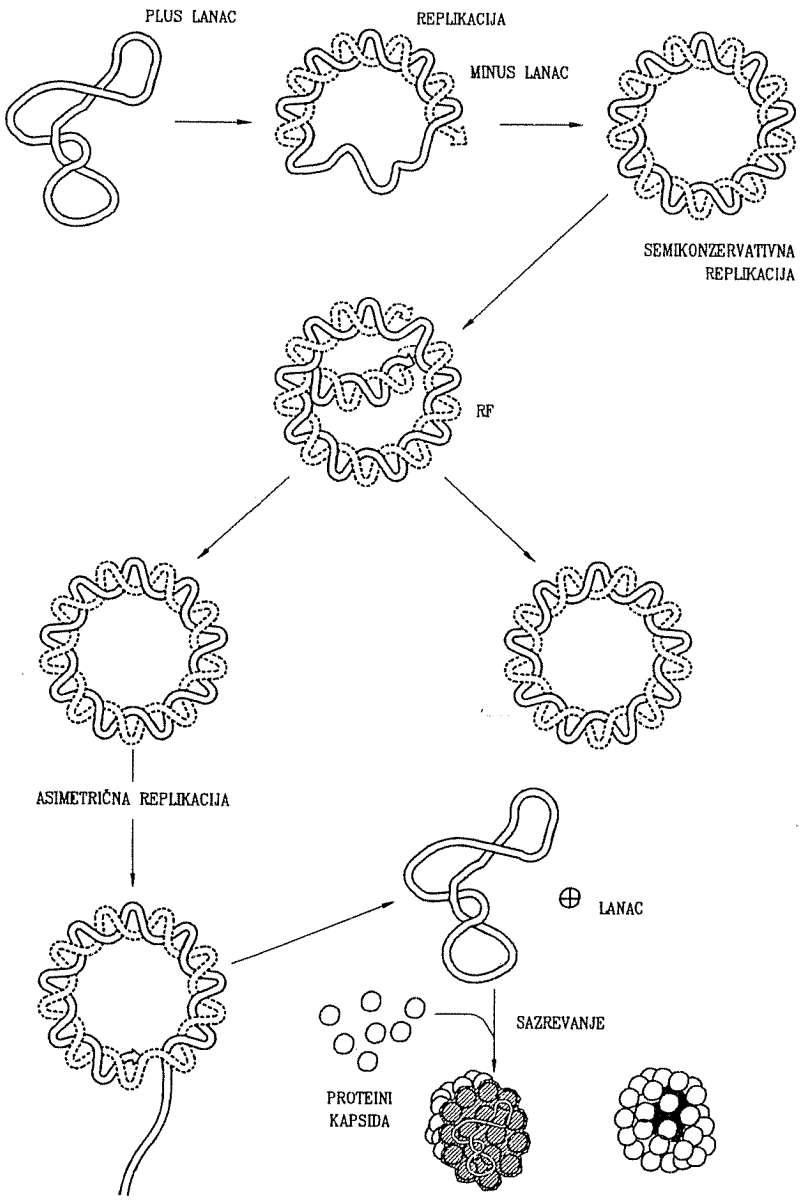
Virusi najčešće koriste veliki broj identičnih proteinskih molekula u izgradnji omotača, što je razumljivo s obzirom na veličinu i sadržaj gena u naslednoj osnovi virusa.

Ako virusi imaju kao naslednu osnovu jednolančanu DNK, po ulasku u ćeliju domaćina (npr., fag X174 ulazi u ćeliju Escherichiae coli) taj lanac počinje da vezuje komplementarne nukleotide i, pošto obrazuje dvolančani molekul, zatvori se u prsten. Lanac koji inficira ćeliju naziva se ***plus-lancem,*** novosintetisani, komplementarni lanac, ***minus-lancem*** a prstenasta tvorevina, dvolančana, cirkularna DNK, replikatornom formom (RF) virusa. Ovaj molekul se replikuje po semikonzervativnom tipu, kao i cirkularni hromosom bakterija. U toku semikonzervativne replikacije na minus-lancu se vrši transkripcija iRNK za proteine virusa. U citoplazmi inficirane bakterije na ovaj način se povećava broj RF-virusa (prstenastih molekula DNK) i broj molekula proteina. U trenutku kada ima dovoljno molekula proteina za kapside virusa, počinje "asimetrična" replikacija. Tokom asimetrične replikacije na minus-lancu se sintetiše plus-lanac. Čim se sintetiše novi plus-lanac, stari se izdvaja iz prstena, ulazi u kapsid i obrazuje zreli virus (sl. 2.12).

Prirodno je da je matrica za sintezu virusnog genoma minus-lanac, jer DNK koja bi se sintetisala na plus-lancu nije identična virusnoj DNK već je komplementarna virusnom genomu. U tom lancu bi, npr. kod genoma virusa ATG bio prepisan kao TAC.

Fag F2 ima kao naslednu osnovu jednolančanu RNK. Ispitivanja procesa replikacije faga F2 su pokazala da se u citoplazmi inficiranih ćelija nalaze pluslanci RNK (infektivne čestice virusa), ali i njima komplementarni minus-lanci.

Zaključeno je da plus-lanac, kada uđe u ćeliju, vezuje komplementarne nukleotide i sintetiše komplementaran minus-lanac. Kako su vodonične veze u dvojnim lancima RNK slabe, plus- i minus-lanac se odvajaju i ne obrazuju dvojne, prstenaste RF, kao što je slučaj kod jednolančanih DNK-virusa. Replikacija jednolančanih RNK-virusa više podseća na transkripciju nego na replikaciju. Novosintetisani minus-lanci služe kao matrica za sintezu novih plus-lanaca, odnosno



Slika 2.12

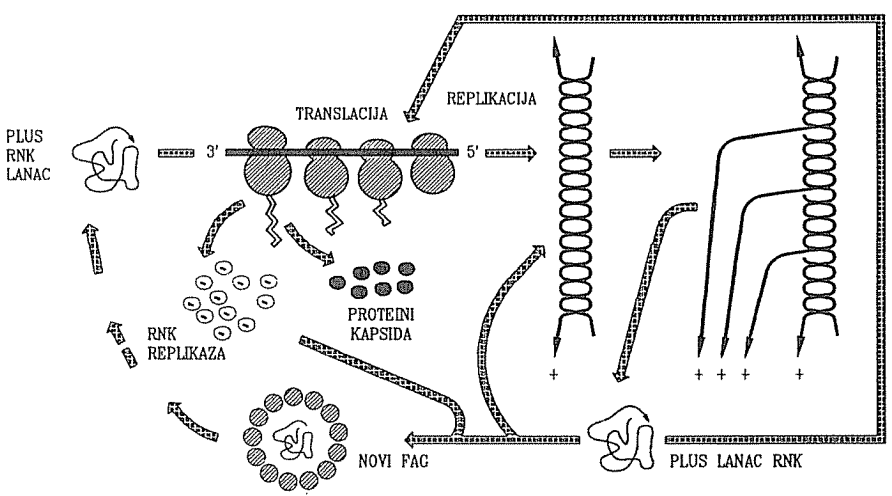
RNK-genoma virusa. Replikaciju RNK-lanca omogućava jedan specifičan enzim faga, ***RNK-replikaza.*** Na virusnom genomu (plus-RNK-lancu) nalazi se informacija za sintezu RNK-replikaze pa zato virusna RNK, čim uđe u ćeliju domaćina, odlazi na ribosome, gde se sintetiše enzim. Osim za replikazu, RNK sadrži informacije za proteine kapsida. Kada se u ćeliji nakupe proteini kapsida i plus-RNK-lanci, oni se spajaju i obrazuju zrele viruse (sl. 2.13).

Prema tome, nasledni materijal ovih virusa, jednolančana RNK, predstavlja iRNK za sintezu proteina koji omogućavaju replikaciju virusa, obrazovanje kapsida i druge funkcije virusa.

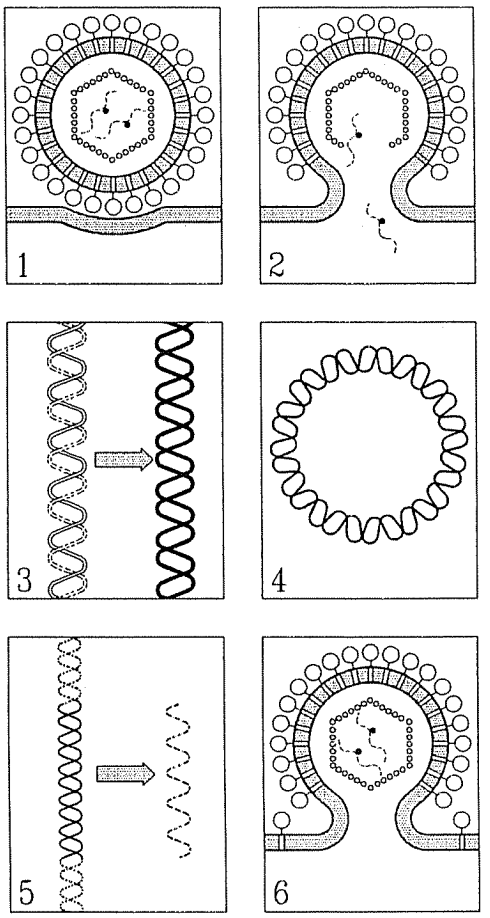
U ovu grupu virusa ubraja se i virus koji izaziva poliomijelitis. U ćelijama obolelih osoba se nalaze plus- i minus-RNK-lanci i RNK-replikaza specifična za Poliovirus, vezana za membranu ćelije. Jednolančani RNK-virusi mogu u citoplazmi ćelije domaćina da na RNK-lancu sintetišu komplementaran DNK-lanac. U ovu grupu virusa ubraja se i HIV-virus, izazivač SIDA-e. Mada se prema centralnoj dogmi uvek na molekulu DNK prepisuje RNK, specifičan enzim virusa, *reverzna transkriptaza* omogućava sintezu DNK-lanca na molekulima RNK. DNK-lanac se odvaja od RNK-lanca, vezuje komplementarne DNK-nukleotide i obrazuje dvolančani molekul DNK. Slobodni krajevi DNK se spajaju u prstenastu tvorevinu. Prsten se procesom rekombinacije ugradi u DNK hromosoma ćelije domaćina. Uključena u hromosom, DNK virusa može da se prepisuje i da daje različite informacije. Prepis kompletne DNK virusa je jednolančana RNK (iRNK) a to je genom virusa. Ove RNK se uključuju u proteinske kapside, dolaze do površine ćelije i od ćelijske membrane domaćina obrazuju još jedan omotač (sl. 2.14). Odvajajući se od membrane, virusi ostavljaju veća ili manja oštećenja na membrani. Ukoliko ne može da popravi ova oštećenja, ćelija umire.

HTLV I virus, vrlo sličan virusu SIDE, uključen u genom ćelije može da utiče na aktivnost gena ćelije domaćina. Ugrađen u T-limfocite, podstiče aktivnost gena za ***interleukine,*** materije koje ubrzavaju umnožavanje T-limfocita. U inficiranih osoba može da se javi leukemija T-ćelija.

Virusi sa ovako specifičnim životnim ciklusom, nazivaju se ***retrovirusi.***



Slika 2.13



Slika 2.14

DNK MITOHONDRIJA

U eukariota, osim u jedru, u hromosomima, DNK molekuli su otkriveni i u citoplazmi. To je vanhromosomska DNK, DNK mitohondrija i plastida.

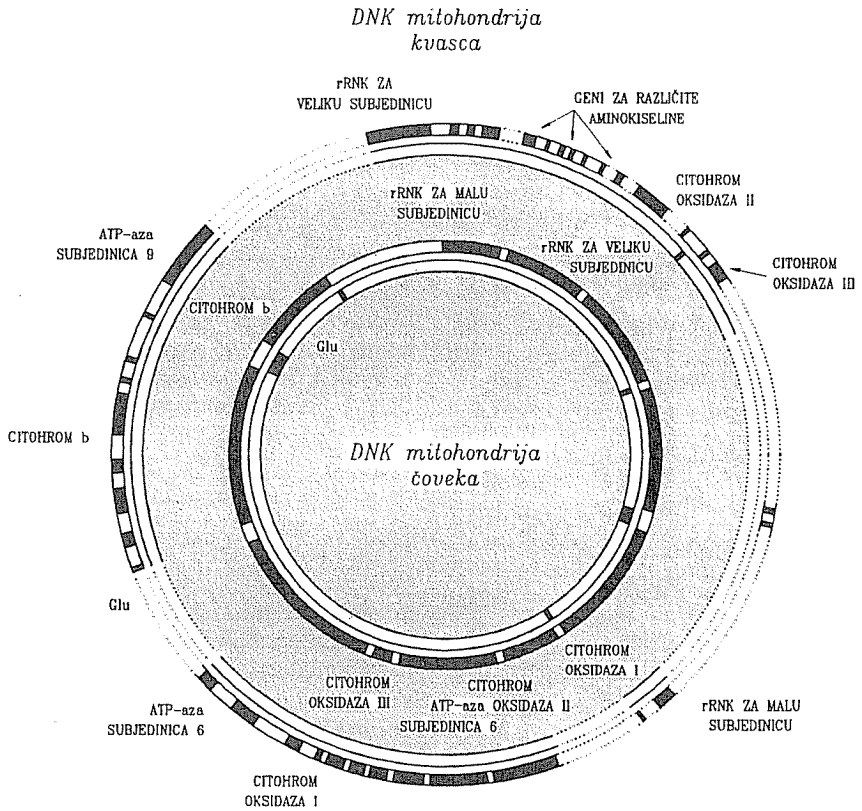
DNK mitohondrija (mtDNK) razlikuje se, od istih molekula u hromosomima. Sadrži manji broj nukleotida, ima više C-G-parova nego A-T-parova, pa se denaturiše na višim temperaturama a brzo renaturiše.

Mitohondrijalna DNK se nalazi u matriksu mitohondrija u vidu jednog ili manjeg broja slobodnih ili, za unutrašnju membranu vezanih, najčešće prstenastih, dvolančanih molekula. Ta DNK je "gola", nije vezana za histone, pa i po obliku (prsten) i po odsustvu histona podseća na DNK prokariota. Ipak, molekuli mtDNK su uvek kraći od DNK prokariota.

Humana mtDNK se može smatrati prototipom mtDNK kičmenjaka. Vrlo je detaljno ispitana, geni u njoj su dešifrovani a proteini koji se sintetišu u mitohondrijama čoveka su izanalizirani. Danas se zna da se ova DNK sastoji od 16.569 parova nukleotida i da je to prosečna dužina mtDNK većine eukariota. Izuzetak su, npr. kvaščeve gljivice, u kojih su dvojni lanci DNK mitohondrija oko pet puta duži (sadrže oko 78.000 parova nukleotida). Jedna praživotinja, Tripanosoma, ima izuzetno duge molekule mtDNK sa velikim i malim prstenastim formacijama. Nije poznato zašto ove protozoe, među kojima ima parazita čoveka, imaju ovako složenu i komplikovanu građu mtDNK (sl. 2.15).

U mtDNK čoveka opisano je 37 gena, od kojih su dva gena za rRNK, 12S rRNK i 16SrRNK, na 22 gena se prepisuju 22 tRNK a na 13 gena iRNK za proteine koji se sintetišu u mitohondrijama, poliadenilati i još nepoznati prepisi. Interesantno je da se iRNK i proteini koji se na njima sintetišu koriste u mitohondrijama, odnosno nikad ne napuštaju mitohondrije. Analiza proteina mitohondrija i sekvenci gena je pokazala da su ti proteini subjedinice polimernih enzima oksidativne fosforilacije. To su geni za subjedinice citohrom-oksidaza (za c⁻ i b-citohrom-oksidaze), za ATP-aze, NADH -dehidrogenaze. Neka genska mesta još nisu dešifrovana (URF).

Drugo interesantno otkriće do koga se došlo analizom humane mtDNK bilo je da je genetski kod u njoj jedinstven, različit od genetskog koda hromosomske DNK eukariota i prokariota. Tako, npr., kodoni AGA i AGG za arginin u iRNK



Slika 2.15 – Uporedni prikaz DNK mitohondrija čoveka i kvaščevih gljivica. Geni su samo delimično označeni

prepisanoj na hromosomima predstavljaju stop-kodone u mitohondrijama a UGA, stop-kodon u jedru, predstavlja šifru za aminokiselinu triptofan u mitohondrijama.

Mada u mtDNK čoveka ima 37 gena, prepisivanje, transkripcija, počinje samo na dva mesta, odnosno postoje samo dva promotora. Prvi prepis, koji obuhvata gene za rRNK i gene za tRNK za aminokiseline valin i fenil-alanin, prepisuje se deset puta brže od drugog, koji obuhvata sve ostale gene.

Kao u transkripciji na hromosomima, i u mitohondrijama primarni prepis mora da se obradi. Kako su prepisi gena neposredno jedni uz druge, isecanje je veoma precizno. Zapaženo je da stop-kodon može da ima samo jedan nukleotid, npr. uracil, ali kada se na kraj prepisa veže poliadenilatni rep, njegovi nukleotidi AA upotpune šifru, triplet UAA.

Dosadašnja ispitivanja su pokazala da mtDNK kvaščevih gljivica i mtDNK čoveka nose informacije za skoro identične genske produkte, ali imaju neverovatno raznovrsnu organizaciju genoma, raspored gena, način transkripcije pa i genetski kod. U svom velikom molekulu od 78.000 parova baza mtDNK kvasca ima introne, nekodirajuće sekvence, veći broj promotora odnosno više mesta inicijacije.

To bi značilo da se tokom evolucije mtDNK nije povećavala umetanjem sekvenci koje se ne prepisuju već je zadržala minimum genetskog materijala neophod-

nog za sintezu rRNK, tRNK i iRNK koji se koriste u samim mitohondrijama. Tokom evolucije je dolazilo do rekombinacije između mtDNK i DNK hromosoma pa se tako gen za subjedinicu 9 ATP-aze nalazi na mtDNK u kvasca a u čoveka na DNK hromosoma ili geni za nekoliko subjedinica NADH reduktaze u mtDNK sisara, a nema ih u mtDNK kvasca. Analiza DNK hromosoma mnogih biljaka i životinja je pokazala da se u njoj nalaze kratke sekvence mtDNK od oko 50 nukleotida. One nemaju određen raspored u hromosomskoj DNK i izgleda da se ne prepisuju.

Ribosomi mitohondrija su nešto manji od ribosoma prokariota sa koeficijentom sedimentacije 55S, a rRNK koje učestvuju u njihovoj građi su 12S rRNK i 16S rRNK. Interesantno je da neki lekovi koji ne utiču na translaciju u citoplazmi inhibiraju ovaj proces u mitohondrijama. Tako, npr. hloramfenikol inhibira translaciju na ribosomima prokariota i na ribosomima mitohondrija.

Iako mtDNK ima informacije za iRNK i ribosome, odnosno za biosintetički aparat, najveći broj proteina potreban za strukturu i funkciju mitohondrija sintetiše se na ribosomima citoplazme na iRNK prepisanim na DNK hromosoma. Iz citoplazme, proteini u vidu prekursorskih molekula ulaze u mitohondrije. Izgleda da način ulaska prekursora zavisi od mesta na kome će protein biti lociran, od toga da li će ostati u spoljašnjoj ili unutrašnjoj membrani, da li će dospeti u matriks. Mada se procesi prolaska molekula danas intenzivno proučavaju, još uvek nisu objašnjeni. Dokazano je da se tokom prolaska troši ATP. Neki prekursori imaju "terminalne signale sekvence aminokiselina" i pri ulasku u mitohondriju taj "rep" se iseca, menja se konfiguracija molekula i ovaj ulazi u membranu. Drugi molekuli moraju da se vežu za hem i smatra se da su to oni proteini koji su locirani na unutrašnjoj membrani mitohondrija. Činjenica da su za kompletnu strukturu mitohondrija i za njihovu funkciju, koja ima vitalan značaj za ćeliju, neophodni genski produkti i hromosomske i mitohondrijalne DNK, ukazuju na mogućnost da se i na nivou ovih organela vrši kontrola biosinteze proteina ćelije.

DNK mitohondrija se replikuje kao i DNK hromosoma. Za replikaciju se koristi polimeraza, koja najverovatnije dolazi iz citoplazme (ima i podataka da je ova polimeraza sintetisana u mitohondrijama).

Ako se kvaščeve gljivice drže u uslovima bez kiseonika, mitohondrije se gube iz citoplazme, ali se replikacija mtDNK nastavlja i obrazuju se telašca, promitohondrije. Ukoliko se kulturi dodaje kiseonik, počinje intenzivna sinteza svih molekula potrebnih za izgradnju mitohondrija i za njihovu funkciju, bilo da se sintetišu u citoplazmi ili u samim mitohondrijama. Istovremeno membrana promitohondrija počinje da se širi i obrazuje normalne organele.

Kao i hromosomske DNK, i DNK mitohondrija, zahvaljujući genima koje nosi, određuju neka fenotipska svojstva. Prvi podaci dobijeni na kvaščevim gljivicama su pokazali da se stvarno neka svojstva prenose drugačije od onih koje kontrolišu geni na hromosomima. Potomstvo je, prema tim svojstvima, uvek bilo kao majka. I u sisara je zapaženo da se neka svojstva prenose matroklino pa kako se pri oplođenju spajaju spermatozoid, koji praktično nema citoplazme, i jajna ćelija, koja ima bogatu citoplazmu i u njoj brojne organele, zaključak je bio da se i van hromosoma nalaze molekuli nasledne osnove, odnosno DNK. To su geni citoplazme, odnosno geni mtDNK i DNK plastida.

Ispitivanjem mtDNK potomaka različitih rasa goveda zapaženo je da oni imaju mtDNK kao majka.

Analiza mtDNK izvršena na materijalu dobijenom iz placente 22 žene iz severne Evrope i 16 žena iz Maroka koje su pripadale različitim grupama Jevreja, Sefardima i grupi Aškenazi, ustanovljeno je da, iako se njihove mtDNK razlikuju, imaju i dosta sličnosti, što dokazuje da obe grupe imaju zajedničko poreklo.

U medicini su poznati mnogi neuromuskularni poremećaji koji nastaju kao posledica poremećaja oksidativne fosforilacije, a ovaj proces se odvija u mitohondrijama. Smatra se da u tom procesu sudeluje oko 69 različitih polipeptida. Od 69 polipeptida oko 13 je pod kontrolom gena mitohondrija. Smatra se da se mutacije češće odigravaju u mitohondrijalnoj DNK nego u DNK hromosoma (DNK mitohondrija je manje stabilna) pa se neuromuskularni poremećaji najčešće prenose matroklino, odnosno posledica su genskih mutacija mtDNK.

Genetičko inženjerstvo

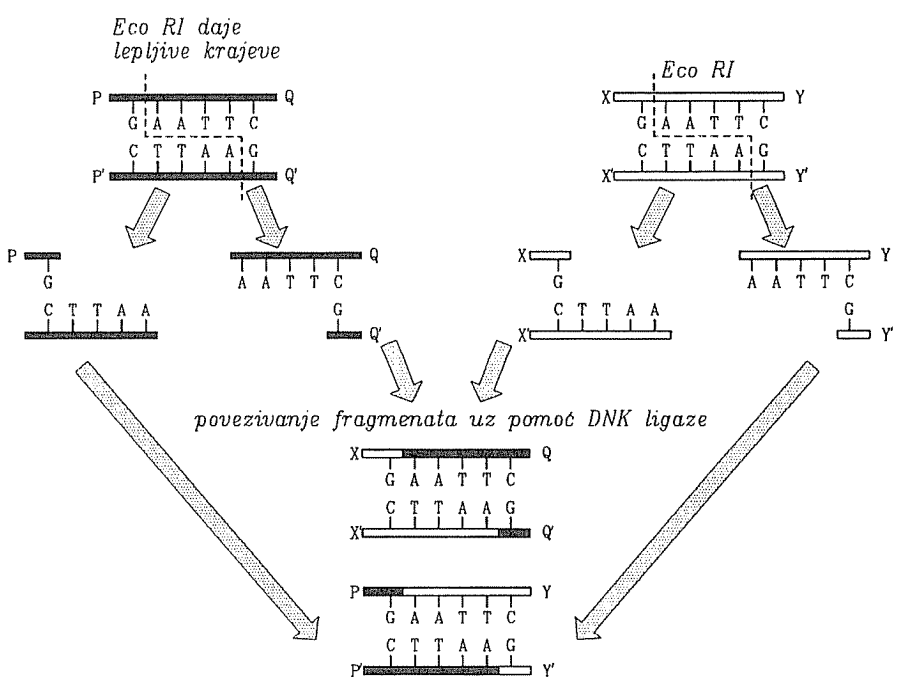
Ovaj pojam obuhvata veštačko formiranje novih kombinacija naslednog materijala. Za genetičko inženjerstvo su neophodne tri osnovne komponente:

- restrikcione endonukleaze,
- DNK ligaze i
- vektori za kloniranje DNK.

Restrikcione endonukleaze su enzimi koji seku obe niti lanca DNK na specifičnim mestima, tj. samo unutar sekvenci koje sadrže dvostruku simetriju oko date tačke, npr.

A A G C T T
T T C G A A

Ovi enzimi se nalaze u ćelijama mikroorganizama i imaju značajnu ulogu u zaštiti ćelije od unošenja i umnožavanja strane DNK u bakterijskoj ćeliji. DNK bakterija se štiti od sopstvenih restriktaza metilacijom restrikcionih mesta. Do sada



Slika 2.16

je poznato oko 300 restrikcionih enzima i svaki nosi ime prema mikroorganizmu iz koga je prvi put izolovan. Saznanje da ovi enzimi mogu fragmentirati DNK različitog porekla izazvalo je pravu revoluciju u molekularnoj biologiji i medicini. Pokazalo se da se geni mogu prenositi ne samo sa jednog hromosoma na drugi, iz ćelije u ćeliju, već i iz ćelije čoveka u bakterijsku ćeliju.

Različiti restrikcioni enzimi prepoznaju različite sekvence nukleotida od četiri ili šest baza. Ako se uz pomoć jednog restrikcionog enzima iseče celokupna DNK jedra, dobije se karakterističan set fragmenata (rekstrikcioni fragmenti) koji je isti za sve ćelije date individue. Međutim, položaj mnogih rekstrikcionih mesta i dužina dobijenih fragmenata mogu varirati od osobe do osobe bez uticaja na njihovu genetičku adaptivnu vrednost, što znači bez uticaja na fenotip.

Na primer, enzim ECORI izolovan iz E. coli može seći DNK na svakoj tački gde se pojavljuje sekvenca od šest baza GAATTC.

Ovaj enzim seče DNK čoveka na oko 1,000.000 mesta i daje oko milion fragmenata koji mogu biti različite dužine.

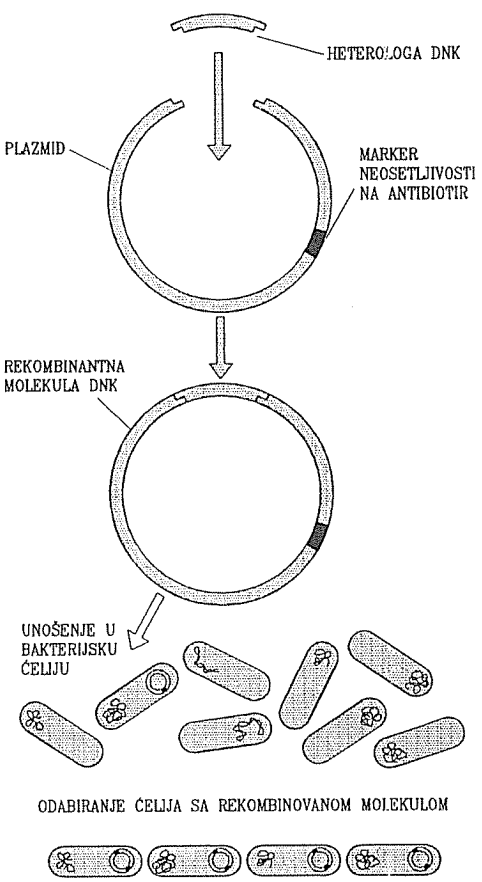
Položaj mesta za restrikcione enzime u DNK se nasleđuje po Mendelovim pravilima i označava normalan polimorfizam genotipa čoveka poznat kao *polimorfizam restrikcionih fragmenata.*

Slobodni krajevi nekih restrikcionih fragmenata su "lepljivi" i mogu se spajati sa drugim komplementarnim slobodnim krajevima DNK različitog porekla koji su nastali dejstvom istog enzima (sl. 2.16).

DNK ligaze povezuju slobodne komplementarne krajeve isečenih molekula DNK, pa se tako formiraju rekombinovani molekuli.

Vektori za kloniranje fragmenata DNK mogu biti plazmidi i bakterijski virusi – bakteriofagi (sl. 2.17). Plazmidi su autoreplikativni delovi DNK koji se nalaze u citoplazmi bakterija i sadrže više od 100 različitih gena.

Tako fragmenti DNK ćelija čoveka nastali sečenjem određenom restrikcionom endonukleazom mogu biti povezani sa komplementarnim slobodnim krajevima plazmida ili bakteriofaga nastalim dejstvom istog enzima na njihovu DNK. Komplementarnim spajanjem baza i uz pomoć ligaze formira se himerni molekul DNK (sl. 2.17). Ovi molekuli himere, plazmidi ili virusi, mogu se dalje umnožavati in vitro u kulturi bakterija u cilju dobijanja klonova sa odgovarajućim fragmentom DNK. Na ovaj način umnožavanjem vektora se formiraju biblioteke



Slika 2.17

genomnih i hromosomskih gena (gena pojedinačnih hromosoma).

Tehnologija rekombinantne DNK ima danas široku primenu u medicini (videti poglavlje "Genetičko savetovalište").

SINTEZA PROTEINA

Od svih organskih molekula, u živim sistemima su najbrojniji proteini. Proteini ulaze u sastav svih ćelijskih struktura i imaju veoma različite funkcije. Da li će neki protein biti, npr., nosač (u membrani), protein mikrotubula ili filament citoskeleta ili će imati vrlo složenu funkciju u molekulu hemoglobina, antitela ili enzima, zavisi prvenstveno od njegove primarne strukture – redosleda i tipa aminokiselina u polipeptidnom lancu. Stoga je mehanizam sinteze proteina, koji osigurava precizan redosled aminokiselina u polipeptidnom lancu, jedan od centralnih bioloških mehanizama.

Proces sinteze proteina obuhvata niz događaja u kojima se informacija sadržana u redosledu baza u molekulu DNK prepisuje u iRNK, a zatim se iRNK koristi kao model za vezivanje aminokiselina u polipeptid. Proces kojim se određena sekvenca (gen) prepisuje u RNK naziva se ***transkripcija,*** dok se proces prevođenja informacije sadržane u redosledu baza iRNK u redosled aminokiselina u polipeptidu naziva *translacija.* Sintetisani polipeptid predstavlja primarni genski produkt (sl. 2.18).

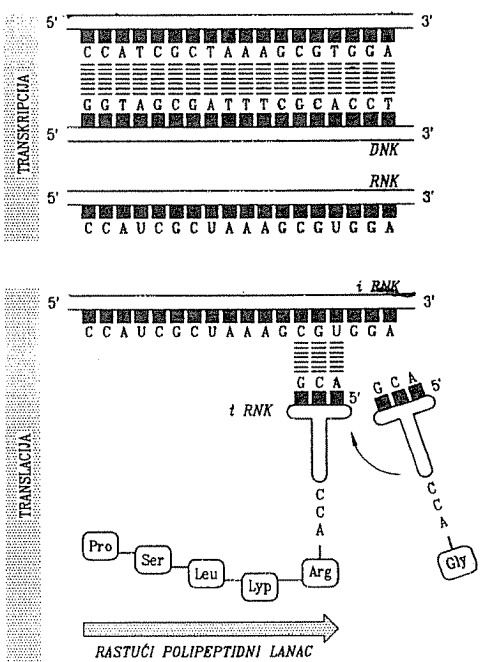
TRANSKRIPCIJA se odvija u jedru. Vezivanjem komplementarnih nukleotida za određene sekvence DNK sintetišu se tri vrste RNK, koje imaju različite, ali kooperativne uloge u složenom procesu biosinteze proteina.

Informaciona RNK (iRNK) prenosi šifrovanu informaciju prepisanu sa DNK; ova informacija je sadržana u redosledu baza, koji određuje redosled aminokiselina u proteinu. Informacione RNK se prepisuju na jedinstvenim ili "single" sekvencama DNK.

Transportna RNK (tRNK) prenosi određene aminokiseline do mesta sinteze proteina (ribosoma), dešifruje informaciju sadržanu u redosledu baza u iRNK i prevodi je na redosled aminokiselina u proteinu. Transportne RNK se prepisuju na srednje ponovljenim sekvencama DNK.

Ribosomska RNK (rRNK) ulazi, pored mnogih ribosomskih proteina, u sastav ribosoma – struktura koje sadrže mesta za vezivanje svih molekula potrebnih u sintezi proteina. Ribosomi se kreću duž iRNK i zajedno sa tRNK prevode njenu šifrovanu genetičku informaciju. Ribosomske RNK se takođe prepisuju na srednje ponovljenim sekvencama DNK.

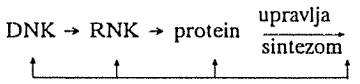
TRANSLACIJA podrazumeva ceo proces prevođenja šifrovane poruke sa-



Slika 2.18 – Osnovni mehanizam transkripcije i translacije zasnovan na komplementarnosti baza

držane u redosledu baza iRNK u redosled aminokiselina polipeptida uz pomoć ribosoma i tRNK.

Složeni odnos između DNK, RNK i proteina može se predstaviti na sledeći način:



Ovaj kružni protok informacija odvija se u svim ćelijama, a označen je kao "centralna dogma" molekularne biologije; DNK sadrži informaciju, RNK prenosi informaciju zapisanu u DNK, a proteini su odgovorni za većinu bioloških aktivnosti i njihova sinteza je ključna ćelijska aktivnost.

GENETSKA ŠIFRA ILI KOD

Budući da postoji 20 različitih aminokiselina koje ulaze u sastav žive materije, a svega 4 različite organske baze u molekuli DNK, jasno je da jedna baza ne može odrediti mesto jedne aminokiseline, već da informacija mora biti šifrovana ili kodirana. Pošto grupe od po dve baze mogu dati samo 16 (4^2) različitih kombinacija, što je nedovoljno za 20 aminokiselina, pretpostavljeno je da genetsku šifru mora da čine grupe od po tri baze koje različitim kombinacijama daju 64 šifre (tripleta) jer 4 baze, ako se međusobno kombinuju u grupe od po 3 baze, mogu napraviti 64 (4^3) različite kombinacije.

Danas je dokazano da triplet baza predstavlja genetski kod pomoću koga se informacije zapisane u jeziku od 4 slova (4 baze) prevode na jezik od 20 slova (20 aminokiselina). Dakle, redosled aminokiselina u molekuli proteina zavisi od redosleda tripleta baza. Genetski kod je univerzalan, jer u svih živih organizama, od virusa do čoveka, isti tripleti odgovaraju istim aminokiselinama. Od ovog pravila odstupa samo DNK mitohondrije čoveka.

Redosled baza (triplet) na iRNK koji odgovara određenoj aminokiselini naziva se ***kodon***, a komplementarni triplet baza na tRNK označava se kao ***antikodon***. Interesantno je da triptofan i metionin imaju samo po jedan kodon, dok druge aminokiseline određuje nekoliko različitih kodona (sinonimni kodoni ili degenerisani kod).

Na svakom genu na kome se prepisuje iRNK, kao i pri translaciji iRNK u protein, postoji signalna sekvenca (odgovarajući tripleti) za početak i za kraj sinteze. Kodon AUG predstavlja ***start*** ili ***inicijalni kodon***, a kodoni UAA, UAG i UGA ***stop-kodone***, koji signaliziraju prekid sinteze polipeptidnog lanca. Sinonimni kodoni, koji odgovaraju istoj aminokiselini, imaju uglavnom prve dve baze iste, dok treća može da variira; npr. 4 kodona za treonin uvek počinju bazama AC. Stoga antikodon jedne tRNK može biti komplementaran većem broju šifri za određenu aminokiselilnu (tab. 2.1).

Tabela 2.1 – Kodoni iRNK koji određuju položaj aminokiselina u polipeptidnom lancu

PRVA BAZA (5'KRAJ	DRUGA BAZA				TREĆA BAZA (3'KRAJ
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Gys	U
	Phe	Ser	Tyr	Gys	C
	Leu	Ser	STOP	STOP	A
	Leu	Ser	STOP	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

Precizni linearni redosled ribonukleotida grupisanih u šifre od po tri nukleotida u iRNK određuje linearni niz aminokiselina i signalizira ribosomima

gde počinje i gde prestaje sinteza proteinskog lanca.

Nedavno je došlo do iznenađujućeg otkrića: isti region lanca iRNK može da se koristi za dve ili tri različite sekvence aminokiselina ako se pomeri čitanje grupe tripleta, odnosno pomeri startna tačka translacije za jednu ili dve baze u oba smera.

TRANSKRIPCIJA (enzimska sinteza RNK)

Osnovne hemijske karakteristike transkripcije su slične sintezi DNK:

1. Prekursori za sintezu RNK su četiri ribonukleozid-5'trifosfata (jedinjenja bogata energijom): adenozin-TP, guanozin-TP, citidin-TP i uridin-TP.

2. Pri polimerizaciji RNK 3'-OH grupa jednog nukleotida reaguje sa 5'-fosfatnom grupom drugog nukleotida uz eliminaciju dve terminalne fosfatne grupe (PPi).

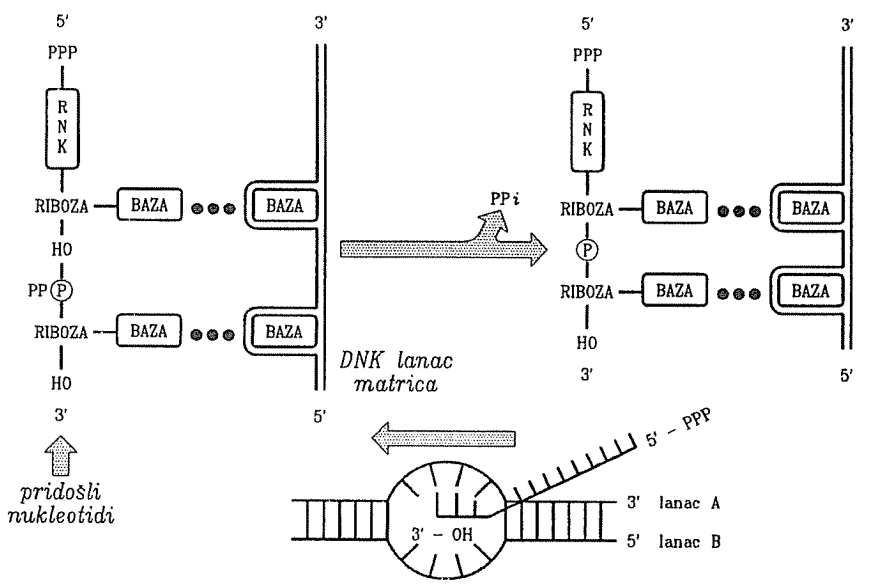
3. Redosled baza u RNK određen je redosledom baza u DNK-matrici: baze se vezuju na osnovu komplementarnosti sa DNK-matricom.

Na primer: CTGA – DNK
GACU – RNK

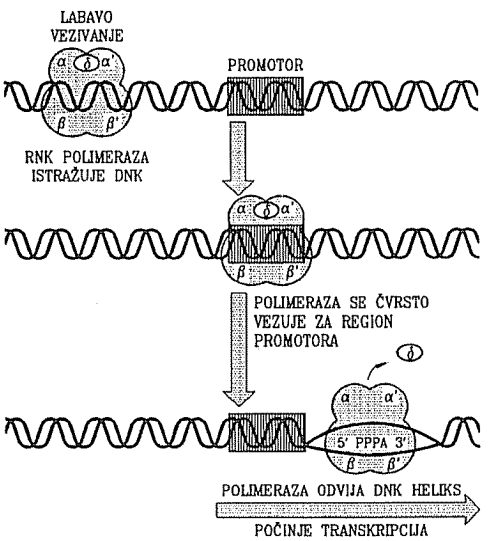
4. Lanac raste u 5' → 3' pravcu; nukleotidi se dodaju na 3'-OH kraj, a 5'-kraj nosi fosfatnu grupu (sl. 2.19).

RNK polimeraza je enzim koji sintetiše RNK. Jedan je od najvećih proteina, vidljiv pod elektronskim mikroskopom. Za razliku od DNK-polimeraze, može da otpočne rast lanca (bez početnice).

Transkripcija je najdetaljnije proučena u E. coli, gde postoji samo jedna vrsta RNK-polimeraze, koja prepisuje sva tri tipa RNK (sl. 2.20). Sastoji se iz 5 subjedinica (polipeptidnih lanaca): alfa, alfa', beta, beta' i sigma. Sigma-faktor je protein koji pomaže u vezivanju enzima za korektno mesto inicijacije RNK-lanca. Polimeraza se pomera duž DNK-lanca, labavo se vezujući i otpuštajući, dok ne naiđe na specifičnu sekvencu (duga 20 do 200 baza) nazvanu ***promotor***, za koju se čvrsto vezuje. Enzim zatim odmotava



Slika 2.19 – Polimerizacija RNK



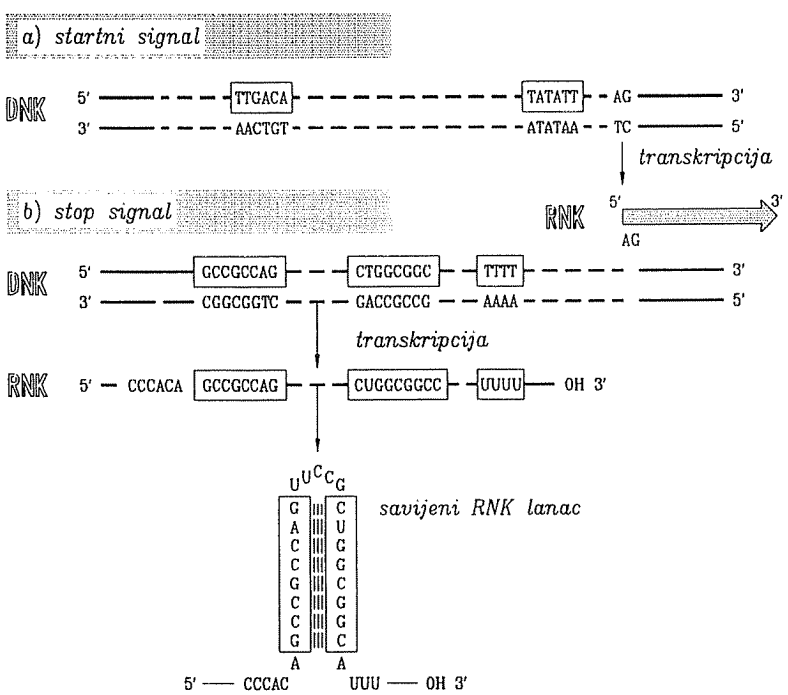
Slika 2.20 – RNK polimeraza E. coli

kratak segment DNK pored promotora, izlažući jednu nit DNK kao matricu za komplementarno sparivanje baza sa slobodnim ribonukleozid-trifosfatima. Energija dobijena izdvajanjem fosfatnih grupa koristi se za vezivanje nukleotida. Sigma-faktor se odvaja.

Eukarioti poseduju tri vrste RNK-polimeraza, od kojih svaka prepisuje određenu vrstu RNK. To su takođe veliki globularni proteini, sastavljeni od 9 do 11 različitih polipeptida. RNK-polimeraza I prepisuje rRNK, RNK-polimeraza II iRNK, a RNK-polimeraza III prepisuje tRNK i 5S rRNK.

Četiri stadijuma u sintezi RNK

1. ***Prepoznavanje promotora:*** RNK-polimeraza prepoznaje u okviru promotora dve specifične sekvence baza dužine od 6 i 12 nukleotida, koje su vrlo slične u različitih organizama, a razlikuju se samo u 1-2 baze pa se označavaju kao *konsenzus-sekvence* (sl. 2.21).



Slika 2.21 – Startni signal (konsenzus sekvence u promotoru) i stop signal za RNK polimerazu u prokariota

2. *Inicijacija lanca:* RNK-polimeraza se zatim vezuje za startno mesto polimerizacije i dovodi prvi nukleozid-trifosfat u blizinu mesta početnog vezivanja. Tako počinje sinteza RNK.

3. *Elongacija lanca:* RNK-polimeraza se pomera duž lanca DNK i dodaje nove nukleotide, usled čega raste lanac RNK.

4. *Terminacija lanca:* Kada RNK-polimeraza stigne do *terminacione sekvence* (stop-signal), odvaja se, kao i novosintetisana RNK, od DNK. Poznata su dva načina terminacije: a) *samoterminacija* (sl. 2.21) – zavisna samo od DNK-sekvence – najčešća je i obično se javlja pri sekvenci baza u lancu matrice DNK koja se sastoji od nekoliko adenina, a prethodi joj *palindrom-sekvenca* (palindrom sadrži međusobno komplementarne regione tako da RNK molekul može da se savije i formira petlju u obliku ukosnice) ili b) terminacija pomoću *proteina terminacije* (rho faktor zavisna).

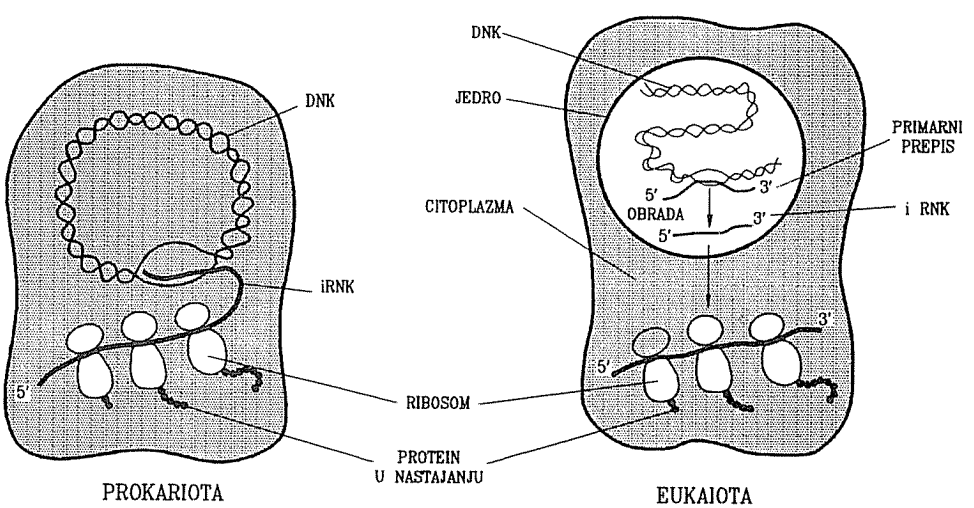
Da bi ponovo došlo do inicijacije transkripcije, prva transkripcija ne mora da bude završena pošto promotor postaje ponovo dostupan RNK-polimerazi kada prvi prepis ima 50-60 nukleotida. Na genima koji se brzo prepisuju takve uzastopne inicijacije se ponavljaju i na genu se vide brojne RNK-molekule različite dužine (sl. 2.26).

Informaciona RNK (iRNK)

Informaciona RNK prenosi informaciju sadržanu u redosledu baza DNK u citoplazmu. Na osnovu ove informacije vezuju se aminokiseline u polipeptidni lanac. Prepisivanje informacija za specifične proteine vrši RNK-polimeraza II sa jedne od dve DNK niti - kodirajuće ili "sense" niti.

U prokariota, primarni prepis predstavlja zrelu iRNK i koristi se direktno u sintezi proteina. Ova iRNK je *policistronska,* predstavlja prepis više gena i sadrži, obično, informaciju za nekoliko različitih genskih produkata (sl. 2.22).

Za razliku od prokariota, u eukariota primarni transkript tek nakon obrade u jedru postaje zrela iRNK, koja je skoro uvek monocistronska. Tokom transkripcije DNK ostaje obavijena oko nukleosoma, s tim što, verovatno, mora doći do privremenih promena u konfiguraciji nukleosoma da bi polimeraza mogla vršiti transkripciju. Novosintetisana RNK se povezuje sa proteinima (liči na nukleosome) i kondenzuje se. Ovo "pakovanje"

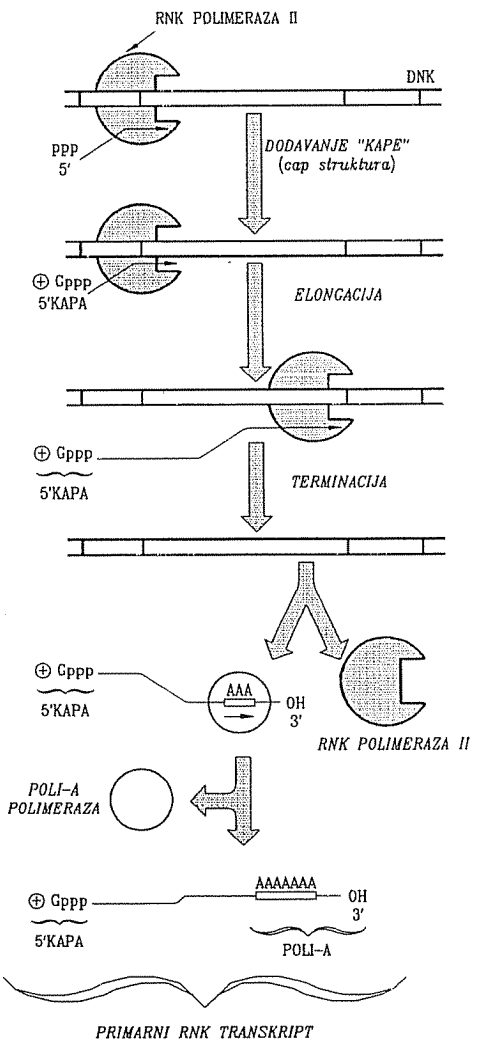


Slika 2.22 – Razlika između prokariota i eukariota u stvaranju funkcionalne iRNK.

svakog prepisa RNK, verovatno, pomaže daljoj obradi i transportu RNK u citoplazmu.

Svi primarni transkripti u čijoj polimerizaciji učestvuje RNK-polimeraza II nazivaju se ***heterogenim nuklearnim RNK (hn RNK)***, jer su veoma različite dužine (za razliku od drugih RNK u jedru). Oko 3% hnRNK će serijom kovalentnih modifikacija postati iRNK.

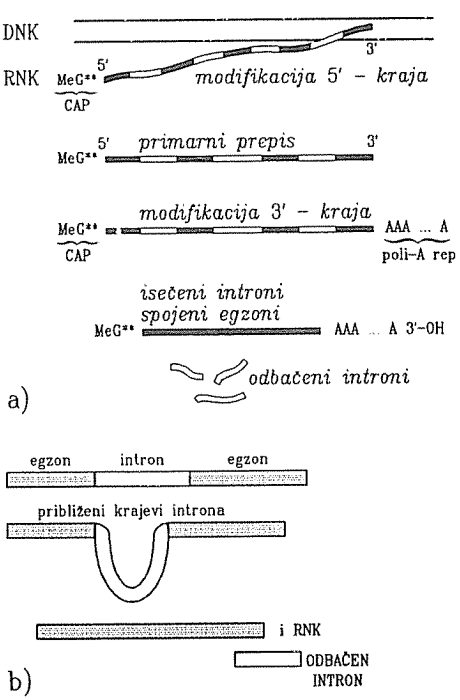
Obrada iRNK sastoji se od dve faze:



Slika 2.23 – Primarni prepis RNK – prekursor iRNK

1. ***Modifikacija oba kraja lanca.*** U toku transkripcije, kada se veže oko dvadesetak nukleotida, 5'- kraj se pokriva "kapom" (cap) koja ga štiti i, verovatno, omogućava vezivanje iRNK za ribosome (sl. 2.23). Cap-strukturu čini modifikovani (metilirani) guanozin koji se vezuje na 5'-kraj neuobičajenom 5'-5' vezom. Na 3'-kraj se vezuje poli-A (poliadenilat, sekvenca od oko 200 adenozina). Vezivanje vrši poli-A-polimeraza, a na kraju lanca iRNK. Pretpostavlja se da poli-A-rep takođe pomaže u daljoj obradi i izlasku zrele iRNK iz jedra. Takođe se pretpostavlja da u ovim terminalnim modifikacijama posreduju enzimi koji stupaju u interakciju sa RNK-polimerazom II.

2. ***Isecanje introna.*** Primarni prepis iRNK sadrži kodirajuće sekvence (prevode se u polipeptid) ili ***egzone*** i neko-



Slika 2.24 – a) Proces nastajanja iRNK u eukariota; MeG označava 7-metil guanozin a dve zvezdice označavaju dva nukleotida čije su riboze metilisane. b) Prikaz otklanjanja jednog introna iz primarnog transkripta

dirajuće sekvence, introne. Tokom obrade introni bivaju isečeni i uklonjeni a preostali egzoni se povežu u definitivnu iRNK (sl. 2.24).

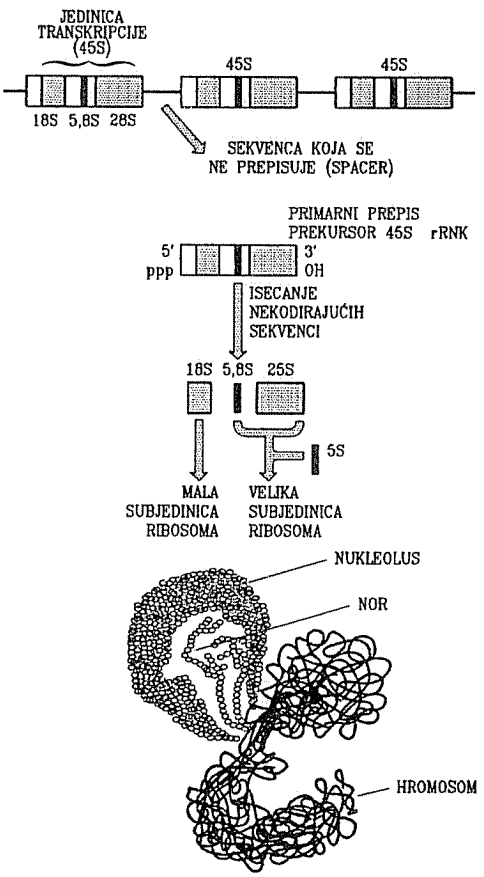
Isecanje introna mora da bude vrlo precizno da se ne bi zahvatili nukleotidi egzona. Zahvaljujući malim nuklearnim RNK (snRNK), čiji se nukleotidi komplementarni nukleotidima na granici egzona i introna, endonukleaze koje vrše isecanje vezuju se na pravo mesto. Broj i veličina introna po molekulu RNK variraju od gena do gena.

Osim gena za iRNK, mnogi geni u genomu se prepisuju u RNK koje predstavljaju makromolekule translacionog aparata, aparata koji prevodi iRNK u polipeptide. To su rRNK i tRNK.

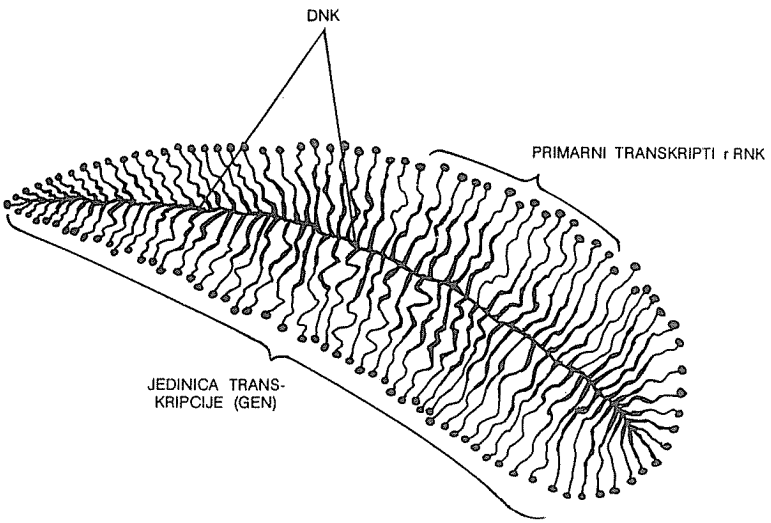
Ribosomska RNK (rRNK)

Ova RNK ulazi u sastav ribosoma, kojih ima na hiljade u citosolu. Prepisivanje rRNK vrši RNK-polimeraza I. Pošto sinteza proteina predstavlja vitalni proces ćelije, dovoljne količine rRNK obezbeđuju se mnogobrojnim kopijama gena za ovu vrstu RNK. Čak i u prokariota, u kojih su retke repetitivne sekvence, geni za rRNK ponavljaju se oko 6 puta. Kod svih eukariota organizacija gena rRNK i transkripcija su u osnovi identične: (sl. 2.25) mnogobrojne kopije u dugom periodu nepromenjenih (konzerviranih) gena rRNK, locirane su na određenim hromosomima u tandemskim nizovima (jedan za drugim). Svaki tandem gen je odvojen od sledećeg u nizu sekvencom DNK za koji se pretpostavlja da se ne prepisuje ("spacer"-sekvenca). Jedna jedinica transkripcije (jedan gen) sadrži sekvence za 18S, 5, 8S i 28S rRNK. Prepisivanjem se dobijaju ***primarni transkripti 45S***, koji su svi identični i odmah se povezuju sa proteinima, prethodno sintetisanim u citosolu i transportovanim u jedro. Transkripcija se vrši velikom brzinom, brojnim polimerazama, tako da su primarni transkripti toliko blizu jedan drugog da izlaze na obe strane lanca DNK; svaka jedinica transkripcije (gen) izgleda kao pero, a na 5'-kraju svakog transkripta nalazi se proteinska granula koja označava sâm početak pakovanja rRNK sa proteinima. (Sl. 2.26)

Primarni transkript 45S se isecanjem nekodirajućih sekvenci odmah nakon povezivanja sa proteinima obrađuje i od njega se dobijaju 18S rRNK i 28S rRNK. Prva se iseca 18S rRNK, koja ulazi u sastav male subjedinice ribosoma, a zatim 5,8S i 28S, koje sa proteinima čine veliku subjedinicu ribosoma. (sl. 2.27a).



Slika 2.25 – Tandemski raspored ribosomskih gena eukariota (lociranih u NOR-ovima), primarni prepis i obrada. Nukleolus i region hromosoma koji ga organizuje (NOR).

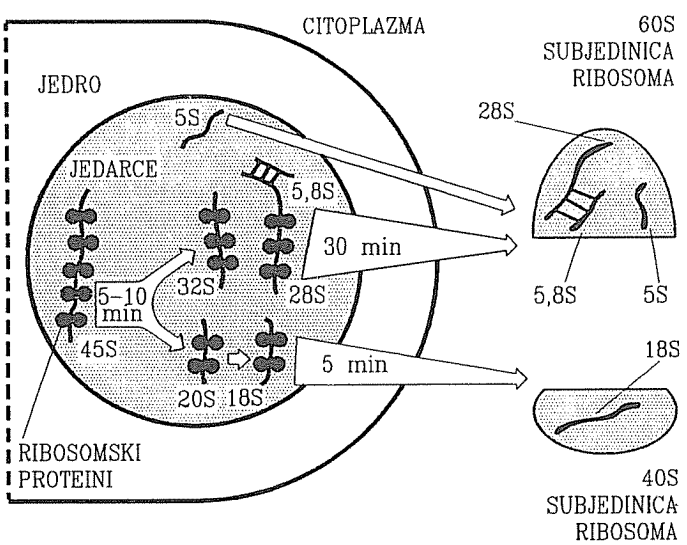


Slika 2.26 – Šematski prikaz elektronskog mikrografa jednog gena za rRNK.

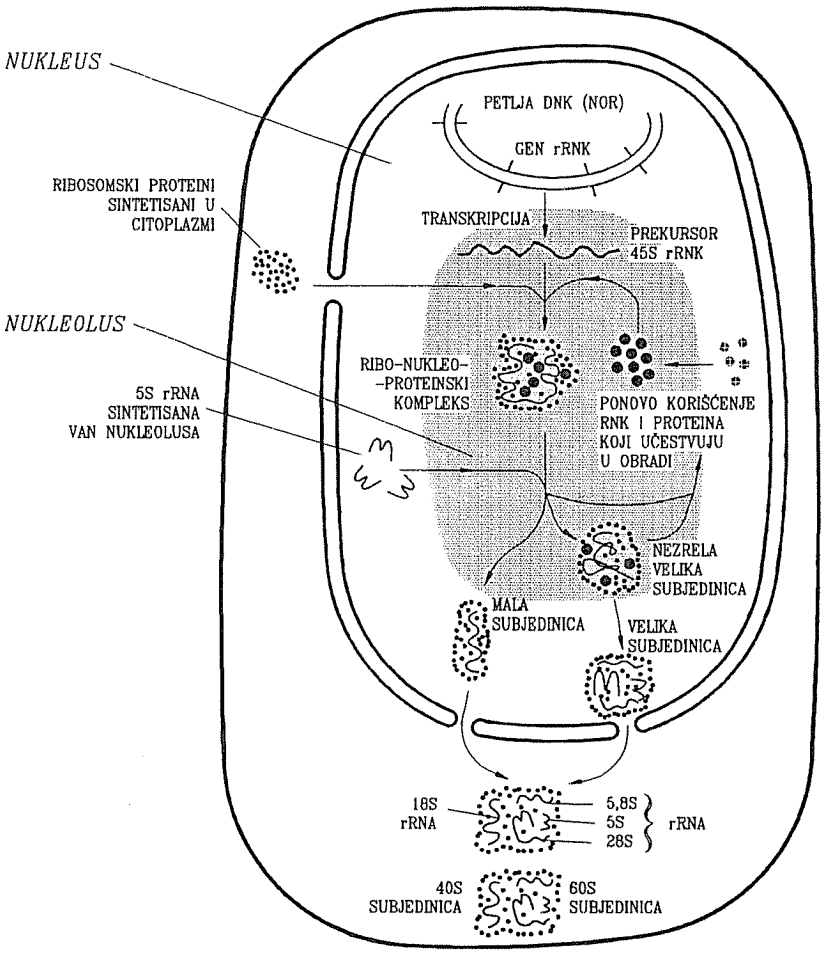
Akumulacijom ribosomskih prekursora u jedru nastaje *Nukleolus.* Nukleolus je velika difuzna struktura nukleusa u kojoj se vrše prepisivanje, pakovanje i obrada 45S rRNK. U nukleolusu se razlikuju 3 zone: (sl. 2.27b):

1. ***Hromosomska zona*** sadrži raspletenu ili despiralizovanu rDNK, koja se prepisuje velikom brzinom, zahvaljujući čemu se i formira nukleolus. Stoga se ovaj region hromosoma naziva organizator nukleolusa ili *NOR (nukleolus-organizirajući region).*

2. ***Fibrilarnu zonu*** predstavljaju primarni transkripti 45S, koji se odmah pakuju sa većinom od 70 različitih ribo-



Slika 2.27a – Obrada rRNK u nukleolusu

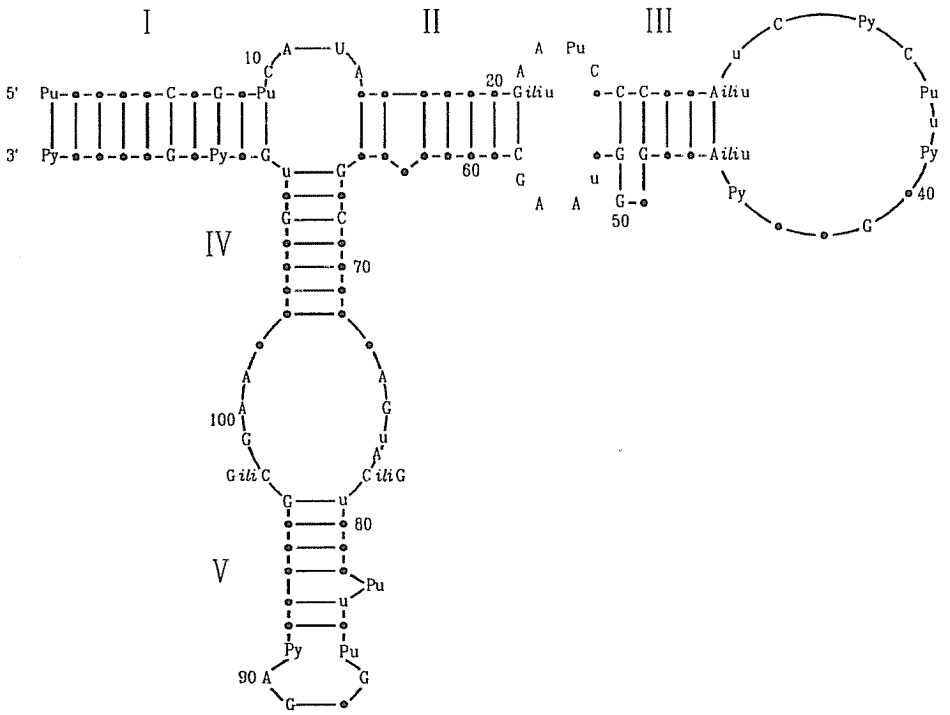


Slika 2.27b – Šematski prikaz funkcije nukleolusa u sintezi ribosoma

somskih proteina (kao i drugim proteinima i malim molekulima RNK, koje katalizuju izgradnju ribosama i ostaju u jedarcu).

3. ***Granularna zona*** je na periferiji nukleolusa i nastaje obradom velikog 45S ribonukleoproteinskog kompleksa, koji se iseca na prekursore velike i male ribosomske subjedinice; mala subjedinica ribosoma sadrži 18S rRNK, prva sazreva i izlazi u citoplazmu; velika subjedinica sadrži 28S rRNK, 5,8S rRNK i 5S rRNK, koja se prepisuje van nukleolusa. Prilikom sazrevanja velike subjedinice ribosoma i 5S rRNK se priključuje ostalim rRNK. Konačno sazrevanje subjedinica odvija se u citosolu, čime se sprečava spajanje sa hnRNK.

Humane ćelije sadrže oko 400 rRNK gena (jedinica transkripcije) po diploidnom setu, raspoređenih u malim grupama na 10 akrocentričnih hromosoma. Stoga se u interfazi mogu uočiti do deset nukleolusa koji se često fuzionišu u jedan veliki nukleolus. Nukleolus sadrži 10 svetlo obojenih, odvojenih petlji rDNK (NOR-ova). Svaka petlja potiče od jednog od deset akrocentričnih hromosoma.



Slika 2.28 – Struktura 5S rRNK (kratka molekula od 120 nukleotida)

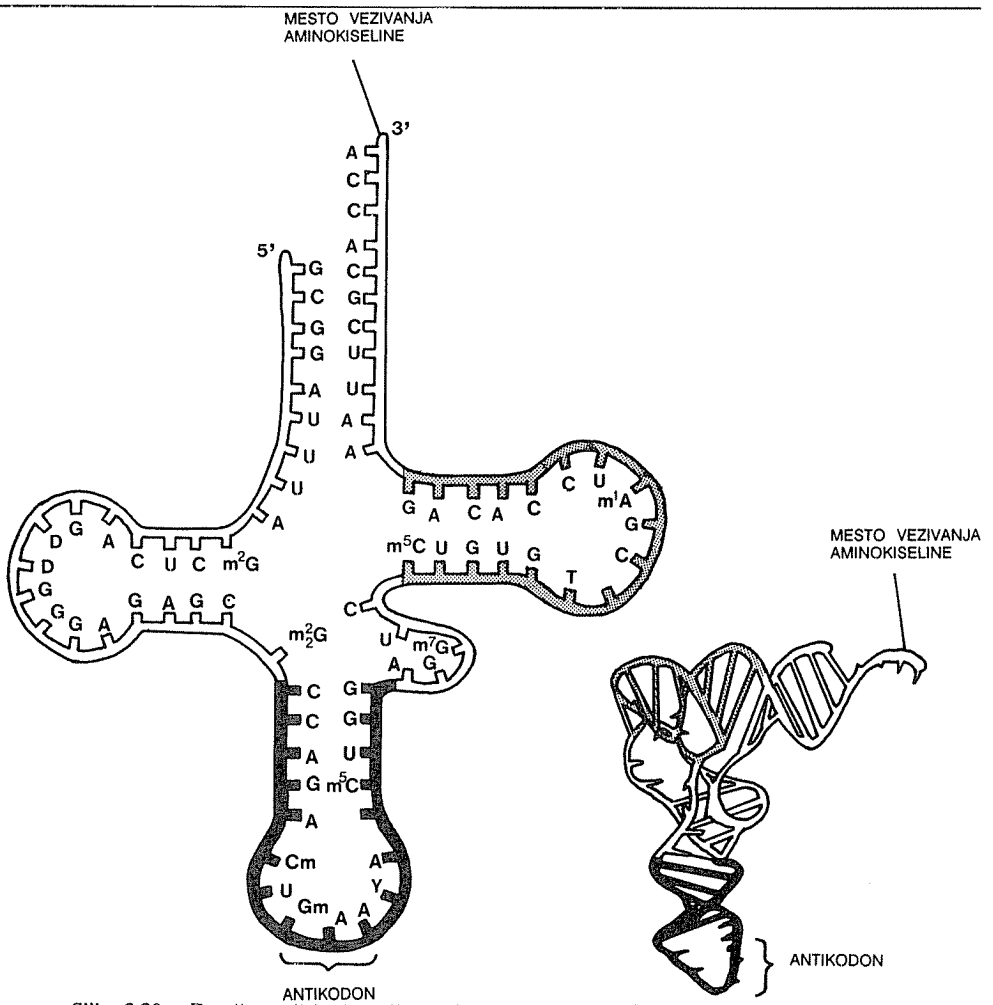
NOR-ovi su locirani na sekundarnim konstrikcijama akrocentričnih hromosoma, i na njima se prepisuju 18S rRNK, 5,8S-rRNK i 28S rRNK, dok se 5S rRNK prepisuje na hromosomu broj 1. Ova je rRNK (5S) kratka sekvenca (120 nukleotida) koju prepisuje RNK-polimeraza III, a njeni geni se takođe nalaze u tandemskom nizu, međusobno odvojeni sekvencama koje se ne prepisuju. Sekvenca i verovatno sekundarna struktura ove rRNK su slični u svih eukariota (kao i u mitohondrijama i hloroplastima). Primarni transkript se ne obrađuje, odmah je funkcionalna molekula koja ulazi u jedarce da se priključi ostalim rRNK velike subjedinice ribosoma (sl. 2.28).

Ukoliko su potrebe ćelija za ribosomima (sintezom proteina) povećane, ribosomski geni mogu da se umnože nezavisno od ostalog dela hromosoma (amplifikacija).

Transportna RNK (tRNK)

Transportne RNK su takođe kratke sekvence nukleotida (u proseku 70-80). Svaka vrsta tRNK ima svoj gen koji se ponavlja u brojnim tandemskim kopijama. Transkripciju tRNK vrši RNK-polimeraza III.

Svi primarni prepisi, slično kao i prekursor rRNK, veći su nego finalni produkti i zahtevaju obradu. Obrada se vrši skraćivanjem i mnogim hemijskim modifikacijama, kao što su dodavanje metilgrupa ili konverzija baza (na 10 baza je jedna na neki način modifikovana). Neki primarni transkripti se obrađuju slično kao iRNK, isecanjem i spajanjem. Obrada se vrši u jedru a zrele tRNK ulaze u citoplazmu, gde dobijaju trodimenzijalnu konfiguraciju, čija osnova (dvodimenzialna struktura) ima oblik deteline (sl. 2.29).



Slika 2.29 – Dvodimenzijska i trodimenzijska struktura tRNK sa modifikovanim bazama

Za svaku od 20 aminokiselina postoji najmanje jedna tRNK, pa prokariotska ćelija sadrži oko 40 različitih tipova tRNK a eukariotska i više. Premda se razlikuju u redosledu nukleotida, sve imaju sličnu, trodimenzijalnu konfiguraciju.

Oblik deteline se dobija savijanjem lanca tRNK, koje je omogućeno sparivanjem baza između određenih komplementarnih sekvenci. Na taj način nastaju četiri regiona u kojima su sparene baze i tri petlje nesparenih baza. Petlja na jednom delu molekula sadrži specifičan triplet baza – ***antikodon,*** koji prepoznaje odgovarajući triplet–***kodon*** u iRNK. Svaka od mnogih vrsta tRNK ima jedinstven antikodon po kome se razlikuje od ostalih tRNK.

Na 3'-kraj tRNK se vezuje određena aminokiselina. Ovaj kraj svake tRNK sadrži slobodan triplet CCA, koji se nakon obrade dodaje uz pomoć enzima.

Druga petlja predstavlja specifično mesto za vezivanje enzima, aminoacil-tRNK-sintetaze. I ovi enzimi su specifični za svaku od 20 aminokiselina.

Treća petlja je deo molekule tRNK koji se vezuje za rRNK male subjedinice ribosoma (kao lenger).

Antikodon je komplementaran kodonu u iRNK, ali ta komplementarnost nije apsolutna. Ako bi sparivanje baza između kodona i antikodona moralo da bude strogo komplementarno za 61 šifru, bila bi neophodna 61 različita tRNK (jedna za svaki od 61 kodona). Međutim, tRNK je samo četrdesetak, jer jedan antikodon može da prepozna više različitih kodona koji određuju mesto jedne aminokiseline. Ovo je moguće zahvaljujući neuobičajenom sparivanju između baze na trećem položaju kodona i naspramne baze u antikodonu.

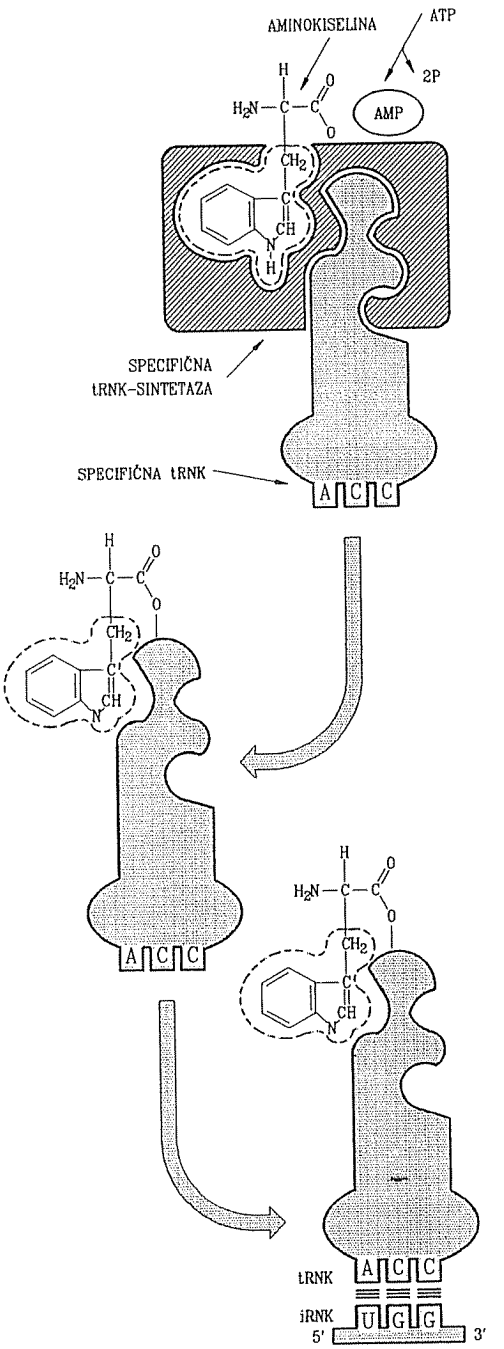
Iz istog razloga, jednom kodonu za određenu aminokiselinu može da odgovara više antikodona pa stoga i ima četrdesetak tRNK, a ne 20, koliko je aminokiselina.

Vezivanje tRNK za aminokiselinu

Postoji najmanje 20 različitih enzima – ***aminoacil-tRNK-sintetaza*** – koji prepoznaju svaku od tRNK i njima odgovarajuću aminokiselinu.

Ako jednu aminokiselinu određuje više kodona, onda će biti i više tRNK za tu aminokiselilnu sa različitim antikodonima. Sve te tRNK prepoznaje isti enzim aminoacil-tRNK-sintetaza.

Aminokiseline u citoplazmi su inertne. Da bi se aktivirale, potrebna je energija koja se dobija iz ATP-a. Iz ATP-a se izdvaja pirofosfat a AMP se vezuje za COOH-grupu aminokiseline uz učešće odgovarajuće aminoacil-tRNK-sintetaze. Pri ovoj reakciji enzim menja konfiguraciju i na njemu se otkriva aktivno mesto za vezivanje odgovarajuće tRNK. Energija oslobođena iz ATP-a omogućava vezivanje aminokiseline za tRNK a AMP i enzimi se zatim izdvajaju iz ovog kompleksa (sl. 2.30).



Slika 2.30 Mehanizam vezivanja aminokiseline za tRNK pomoću aminoacil-- tRNK – sintetaze i vezivanje tRNK za odgovarajuće nukleotide u iRNK.

TRANSLACIJA

Translacija sadrži dve kategorije procesa: a) proces kojim sekvenca RNK određuje sekvencu aminokiselina, a koji obuhvata prepoznavanje između aminokiseline i odgovarajuće tRNK (pomoću specifične aminoacil-tRNK-sintetaze), a zatim prepoznavanje antikodona tRNK i odgovarajućeg kodona iRNK i b) proces povezivanja aminokiselina u polipeptid (proces sinteze proteina).

Glavne komponente translacionog sistema su: 1) ribosomi, 2) transportna RNK, 3) aminoacil-tRNK-sintetaze i 4) faktori inicijacije, elongacije i terminacije.

1. *Ribosomi* sadrže *aminoacilno mesto (A),* na koje dolazi tRNK sa novom aminokiselinom, i *peptidilno mesto (P),* na kojem je tRNK vezana za rastući kraj peptidnog lanca; sadrže enzime neophodne za formiranje peptidnih veza između aminokiselina, mesto za vezivanje molekule iRNK, obezbeđuje zadržavanje tRNK u A-i P-mestu i korektno sparivanje kodon-antikodon (sl. 2.31).

2. *Transportne RNK* čitaju triplete baza na iRNK.

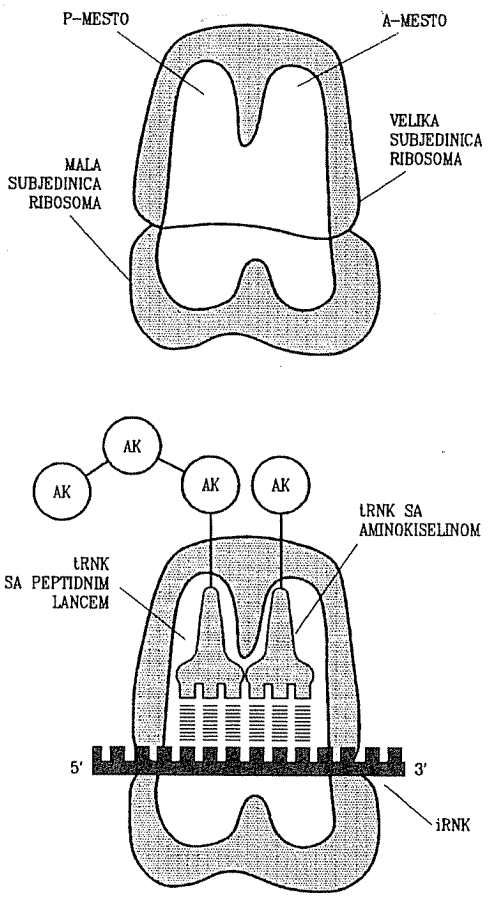
3. *Aminoacil-tRNK-sintetaze* su set enzima koji katalizuje pripajanje aminokiseline odgovarajućoj molekuli tRNK.

4. *Faktori inicijacije, elongacije i terminacije* su proteinske molekule neophodne na određenim stadijumima sinteze polipeptida.

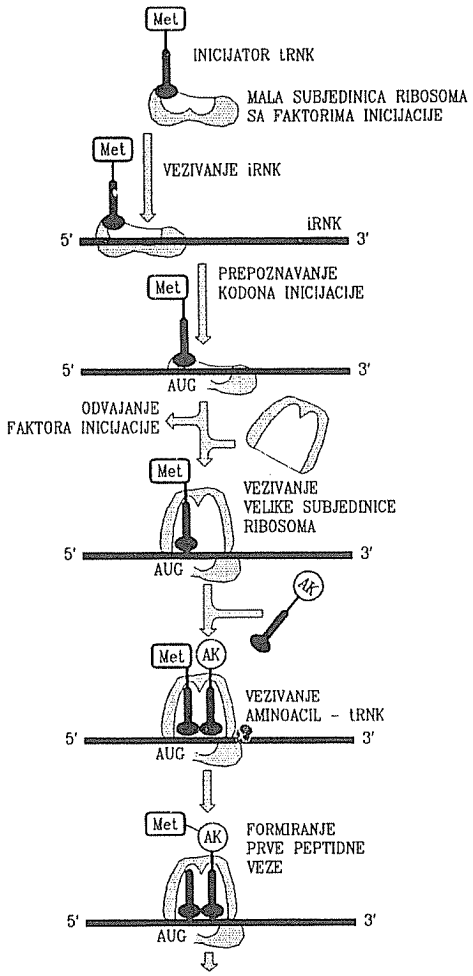
Translacija se odvija uvek u određenom pravcu: iRNK se čita (prevodi) u 5' → 3'-pravcu, dok se polipeptid sintetiše od amino-kraja prema karboksilnom kraju dodavanjem jedne po jedne aminokiseline na karboksilni kraj.

Etape u procesu translacije

I. *Inicijacija polipeptidnog lanca* podrazumeva niz faza koje katalizuju proteinski *faktori inicijacije (IF),* od kojih je svaki sastavljen od nekoliko polipeptidnih lanaca. Ovi faktkori su brojniji i kompleksniji u eukariota nego u prokariota iako imaju istu osnovnu funkciju. Inicijacija je veoma složen proces i mnogi njeni detalji su još nepoznati. Prema savremenom shvatanju (sl. 2.32a), prvo se formira *inicijalni kompleks:* tRNK-inicijator (tRNK koja nosi aminokiselinu metionin i prepoznaje kodon AUG na iRNK) i GTP vezuju se za malu subjedinicu ribosoma, koja se zatim vezuje za iRNK pored kodona inicijacije (AUG



Slika 2.31 – Mesta vezivanja RNK na ribosomu (P i A); desno je ribosom sa vezanim tRNK i iRNK



Slika 2.32a – Inicijacija sinteze proteina

startni kodon). Ovo katalizuje faktor inicijacije (3 u bakterija i 5 u eukariota). Premda kodona AUG za metionin ima na više mesta u iRNK, startni AUG će biti prepoznat, jer će se uz njega vezati ribosom (cap na iRNK). Prokarioti imaju iRNK sa nekoliko mesta inicijacije sa kodonom AUG, dok je kod eukariota samo jedan funkcionalan startni kodon AUG, uvek neposredno uz modifikovani 5'-kraj iRNK.

Sa inicijalnim kompleksom se zatim spaja velika subjedinica ribosoma. GTP se hidrolizuje u GDP, a svi faktori inicijacije se otpuštaju. Inicijator met-tRNK se vezuje za P-mesto na ribosomu, a na A-mesto dolazi druga po redu aminoacil-tRNK i sinteza polipeptida počinje (elongacija).

Svaki novosintetisani protein sadrži metionin (odnosno formil-metionin u prokariota) na amino-kraju lanca. Ovaj metionin obično nije važan za funkciju proteina i otklanja se proteolizom ubrzo nakon inkorporacije.

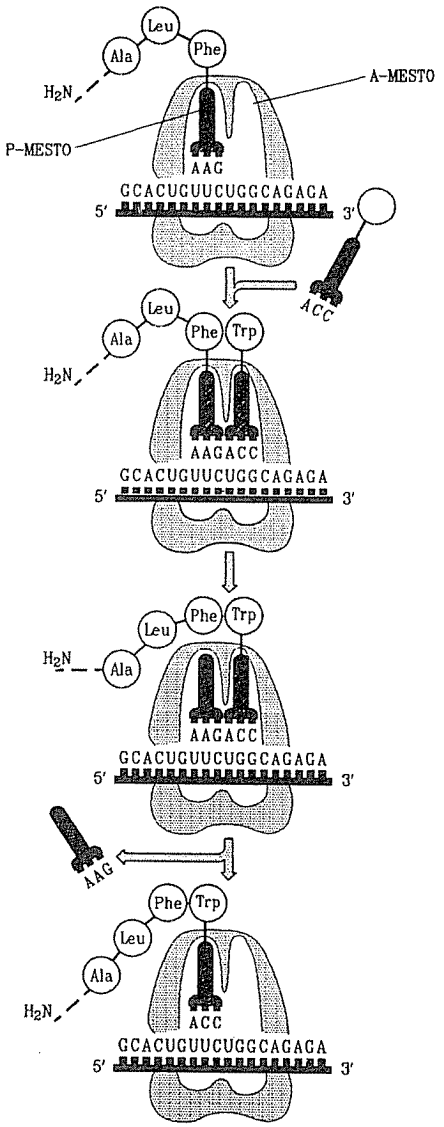
II. *Elongacija polipeptidnog lanca*. Ovaj proces ima tri stupnja: (sl. 2.32b)

1. Nova aminoacil-tRNK se vezuje za A-mesto na ribosomu komplementarnim sparivanjem njenog antikodona sa kodonom na iRNK koji se nalazi na A-mestu, a uz pomoć proteinskog kompleksa (enzima) i energije koja se dobija hidrolizom GTP u GDP.

2. Stvara se *peptidna veza* između karboksilne grupe metionina (početne aminokiseline) i amino-grupe nove aminokiseline na A-položaju, pomoću *peptidiltransferaze* (enzim koji je jedan od proteina ribosoma).

3. Ribosom se pomera za jedan kodon duž iRNK, pomoću *faktora elongacije* (enzim GTP-aza, translokaza) i energije (GTP vezan za ribosom hidrolizuje se u GDP). Time se "prazna" tRNK otpušta sa P-mesta, a sa A-mesta nova peptidil-tRNK dolazi u P-mesto. Slobodno A-mesto prihvata novu tRNK sa sledećom aminokiselinom, čime ponovo započinje ciklus; ovaj proces se korak po korak ponavlja sve dok se ne dodaju sve aminokiseline.

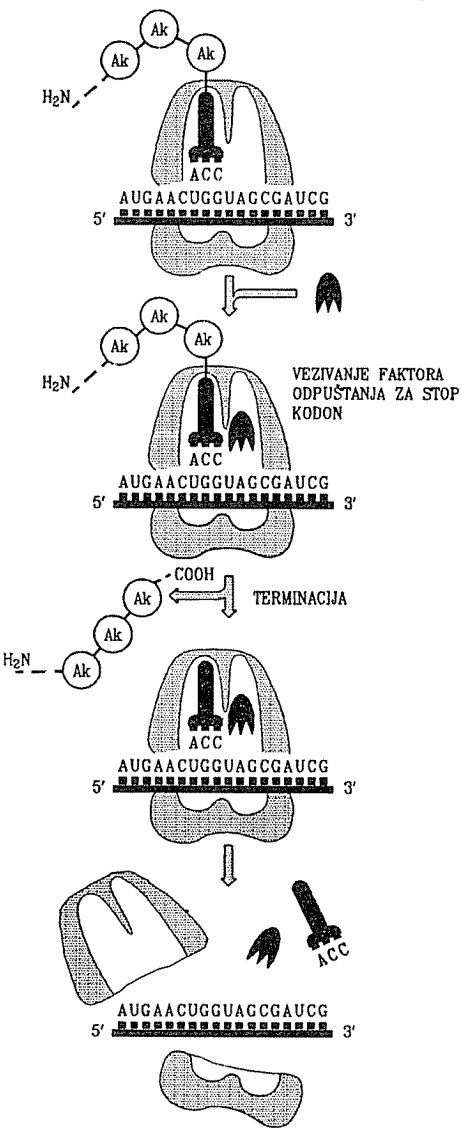
Egzaktni mehanizam pomeranja iRNK u ribosomu još nije jasan. Pretpostavlja se da energija dobijena hidrolizom GTP u GDP indukuje seriju promena u konfiguraciji jednog ili više ribosomskih proteina, što dovodi do pomeranja samog ribosoma duž iRNK ili potiskivanja



Slika 2.32b – Faza elongacije u sintezi proteina

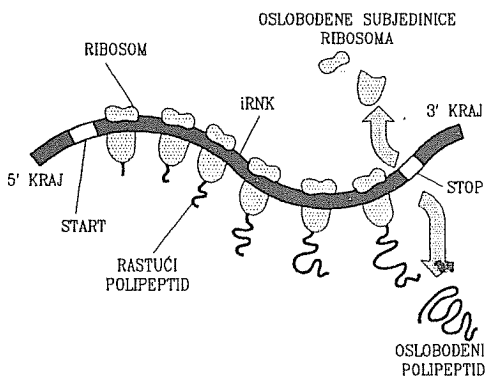
iRNK kroz ribosom. Sâm proces ugrađivanja aminokiselina u polipeptidni lanac troši veliku količinu energije.

III. ***Terminacija polipeptidnog lanca.*** Ribosom se pomera u 5' 3'-pravcu, kodon po kodon, dok ne dođe do jednog od tri stop-kodona (UAA, UGA ili UAG), za koji se direktno vezuje protein – ***faktor terminacije*** (ili faktor otpuštanja), kada stop-kodon stigne na A-mesto (sl. 2.32.c). Peptidil-transferaza tada dodaje vodu (umesto slobodne amino-grupe) na peptidil-tRNK, čime se hidrolizuje veza između karboksilnog kraja završenog polipeptida i poslednje tRNK, dve subjedinice ribosoma se razdvajaju i spremne su da otpočnu nov ciklus. Završeni pro-



Slika 2.32c – Završna faza u sintezi proteina

teinski lanac poprima finalni oblik ili se kombinuje sa drugim proteinskim subjedinicama. Interakcija između dva polipeptida može početi još za vreme rasta polipeptidnog lanca. Veći polipeptidi se sintetišu na polisomima, koji predstavljaju grupe ribosoma vezanih za jednu iRNK. Broj ribosoma u polisomu zavisi od dužine iRNK, odnosno dužine polipeptidnog lanca (sl. 2.33).



Slika 2.33 – Polisomi

REGULACIJA SINTEZE PROTEINA U PROKARIOTA

Strukturne i funkcionalne karakteristike svake ćelije zavise od proteina koje ta ćelija proizvodi. Proteinski sastav ćelije, kao što je već rečno, zavisi od transkripcije gena, translacije iRNK u proteine i postojanost samih proteina. Prema tome, jedan od najinteresantnijih probelma molekularne biologije je problem regulacije diferencijalne aktivnosti gena, odnosno kontrola biosinteze proteina.

Prema onome što se danas zna, mehanizmi te kontrole su brojni i vrlo različiti. Različiti su ne samo za ćelije različitih organizama već i za različite gene iste ćelije.

Prvi model o regulaciji aktivnosti gena u prokariota dali su francuski mikrobiolozi F. Jacob i J. Monod. Ispitujući prilagođavanje bakterija na različite izvore energije, zapazili su da bakterije koje su uzgajane na podlozi sa glikozom, prebačene na podlogu u kojoj se umesto glikoze nalazi laktoza, mogu da se prilagode novim uslovima sredine i da proizvode enzime kojima razlažu laktozu a koje do tada nisu proizvodili. Oni su zaključili da neki fini mehanizam u određenom momentu neke gene isključuje iz rada (represija gena), a druge gene, čiji je genski produkt potreban ćeliji, uključuje u rad (aktivacija gena). Prema njihovoj hipotezi, ovaj sistem obuhvata dve katerogije gena: gene na kojima se prepisuju iRNK za specifičan protein, ***strukturne gene,*** i gene koji kontrolišu biosintezu specifičniih proteina, ***regulatorni geni.*** U bakterija je genom tako organizovan da su strukturni geni za grupu enzima koji učestvuju u jednom biohemijskom procesu raspoređeni jedni pored drugih. Tu grupu gena kontroliše gen ***operator.*** Operator sa strukturnim genima čini jedan operon. Svaki operon ima poseban region DNK sa karakterističnim nukleotidnim parovima, koji se naziva ***promotor.***

Celokupnu transkripciju DNK bakterija katalizuje jedna RNK-polimeraza. Ona može da se veže za bilo koji deo DNK, ali su te veze slabe. Pomoću sigma-faktora, RNK-polimeraza prepoznaje parove nukleotida u promotoru i za njih se čvrsto veže. Usled toga, DNK počinje da se despiralizuje i transkripcija može da počne, ali samo ako je gen operator slobodan. Gen operator je lociran uz promotor tako da im se pojedini nukleotidni parovi poklapaju. Da li će gen operator biti slobodan ili blokiran, zavisi od aktivnosti ***represornog proteina*** čiju biosintezu kontroliše ***gen regulator.***

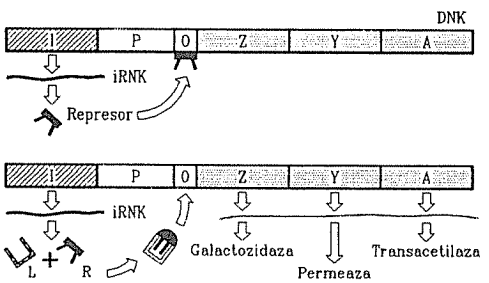
Aktivnost represora zavisi od malih molekula koji se nazivaju efektorima. Efektori mogu biti ***induktori*** i ***korepresori.*** U prisustvu induktora aktivni represor, vezan za gen operator, postaje inaktivan

i oslobađa operatora, pa RNK-polimeraza može da katalizuje transkripciju iRNK na genima datog operona. Inaktivni represor sâm po sebi ne može da se veže za operator, pa se na genima tog operona vrši transkripcija. Ukoliko se inaktivni represor veže sa ***korepresorom,*** menja se oblik molekula represora, represor postaje sposoban da se veže za gen operator i transkripcija prestaje.

Veze između represora i efektora su slabe, lako se menjaju pa represor može da prelazi iz aktivnog stanja u neaktivno ili iz neaktivnog u aktivno.

Svoj model su Jacob i Monod prikazali na danas dobro poznatom lac-operonu bakterije E. coli (sl. 2.34).

Kada u podlozi nema šećera laktoze, E. coli ne produkuje enzime koji razlažu laktozu. Njen lac-operon je inaktivan, blokiran aktivnim represorom koji je vezan za gen operator. Ako se u podlogu stavi laktoza, molekuli šećera se vezuju za represor, pri čemu represor promeni oblik i odvaja se od gena operatora. Čim se oslobodi operator počinje prepisivanje tri strukturna gena (Z, Y, A). Geni se prepisuju u iRNK za enzim beta-galaktozidazu, koja razlaže laktozu, u iRNK za jednu permeazu koja olakšava ulazak laktoze u ćeliju (membranski nosač) i



Slika 2.34 – Jacob i Monod-ov model negativne regulacije lac operona. Na prvom genu se prepisuje iRNK za represorni protein. Ukoliko u podlozi nema laktoze, aktivni represor je vezan za gen operator a lac operon je inaktivan. Ukoliko se u podlogu stavi laktoza, ona se vezuje sa represorom, represor se inaktiviše i ne može da se veže za gen O.Lac operon je aktiviran, geni Z, Y, A se prepisuju.

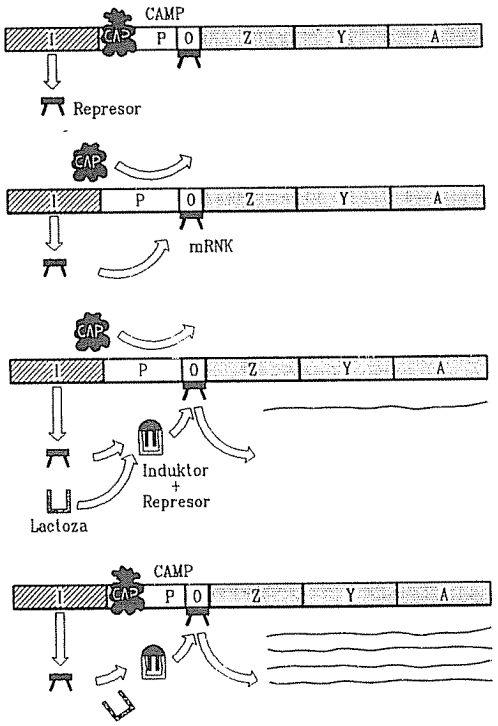
iRNK za jednu acetilazu. Sve dok u podlozi bude laktoze operator će biti slobodan i ovi će se enzimi sintetisati. Kada se laktoza utroši ili kada se bakterije prebace na podlogu bez laktoze, represor ponovo menja oblik, postaje aktivan i vezuje se za gen operator. Transkripcija prestaje. Pojava promene oblika molekula i promene sposobnosti za vezivanje sa različitim supstratima poznata je kao alosterija i karakteristična je za simetrične molekule, posebno za proteine.

Pošto genom bakterija uglavnom sadrži aktivne gene, predstavlja jedan aktivan sistem, vezivanje represora isključuje iz rada određene gene. Ovakav tip kontrole naziva se negativnom kontrolom. Kada su E. coli stavljene na podlogu u kojoj je bila mešavina šećera, one su koristile samo glikozu. Lac-operon je ostao inaktivan. Ispitivanja su pokazala da pri razlaganju glikoze u ćeliji dolazi do pada koncentracije slobodnog cikličnog adenozin-monofosfata (CAMP). Ako su dodavali CAMP, bakterije su trošile i laktozu. Različitim eksperimentalnim pristupima je dokazano da se u regulaciju aktivnosti lac-operona uključuje i pozitivna kontrola, odnosno da za početak transkripcije nije dovoljno da se oslobodi operator već da za promotor mora da se veže i CAMP vezan za specifičan protein-nosač (receptorni protein, RP) (sl. 2.35).

Kada se CAMP veže za promotor i aktivira transkripciju, onda vrši pozitivnu kontrolu.

Sistem indukcije funkcioniše u kataboličkim procesima. U anaboličkim procesima deluje sistem korepresije.

Ako se, npr. u ćeliji bakterije javi potreba za aminokiselinom histidin, ćelija sintetiše devet enzima koji kataliziju biosintezu ove aminokiseline. Onog momenta kada se u citoplazmi pojavi višak histidina on se počne ponašati kao efektor, vezuje se za protein represor koji sâm po sebi nije mogao da se veže za gen



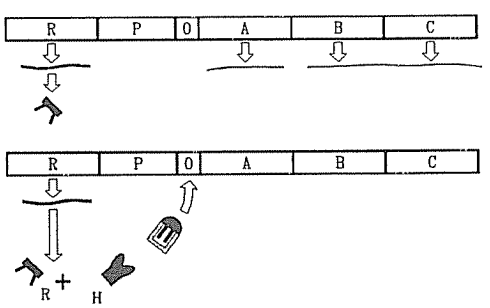
Slika 2.35 – Osim negativne kontrole u lac operonu je otkrivena i pozitivna kontrola koju vrši cAMP/ciklični adenozin monofosfat/. Da bi se u prisustvu laktoze aktivirao lac operon CAMP, preko proteinskog nosača CAP mora da se veže za promotor

operator (neaktivni represor). Kada se veže za efektor, represorni protein menja oblik i veže se za gen operator histidin-operona. Na devet strukturnih gena tog operona prestaje transkripcija (sl. 2.36). Višak histidina, u ovom regulatornom sistemu, predstavlja ***korepresor.***

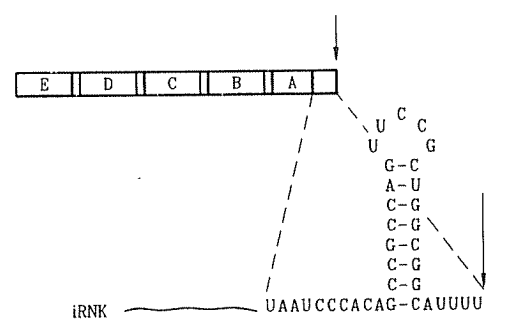
Oba procesa, i indukcija i represija, imaju velik značaj u ekonomiji ćelije i u regulaciji homeostaze ćelije. Indukcijom i represijom se kontroliše početak transkripcije, inicijacija. Poznato je da postoji i regulacija završetka transkripcije, *terminacije.* Prerano prekidanje transkripcije ili neograničeno prepisivanje van granica operona imali bi štetne posledice za ćeliju.

U bakterija je opisana tzv. rho-faktor zavisna terminacija gde prisustvo ovog faktora, njegova fiziološka aktivnost i strukturna ispravnost označavaju prekid transkripcije.

U slučaju rho-faktor nezavisne terminacije, na kraju prepisa iRNK javljaju se 4 ostatka uracila a ispred njih jedan segment nukleotida, oko 22 nukleotida, koji su međusobno manje ili više komplementarni. U trenutku kad se taj deo iRNK prepiše komplementarni nukleotidi se spoje, naprave petlju i završavaju prepisivanje. Pravovremeno obrazovanje petlje i njena efikasnost u završavanju transkripcije mogu, kao i sinteza i funkcija rho-faktora, da budu pod kontrolom (sl. 2.37).



Slika 2.36 – Histidin operon. Ako u podlozi nema histidina, neaktivni represor ne može da se veže za gen operator. Histidin i represor obrazuju aktivni kompleks koji se veže za gen operator i transkripcija prestaje



Slika 2.37 – Operon za enzime koji učestvuju u sintezi aminokiseline triptofan u E. coli. (A, B, C, D, E geni). Da bi se prekinula transkripcija ovog operona na kraju iRNK prepisuju se komplementarni nukleotidi koji obrazuju petlju

Osim opisanih, inducibilnih (adaptivnih) i represibilnih enzima koji se sintetišu zavisno od potreba ćelije, postoje i ***konstitutivni enzimi,*** koji se neprekidno sintetišu a neophodni su za održavanje vitalnih struktura i funkcija ćelije. Takvi su, npr., enzimi Krebsovog ciklusa. Međutim, ako se usled mutacije izmeni gen regulator ili gen operator pa izmenjeni represorni protein više "neprepoznaje" gen operator ili normalni represor ne može da se veže za izmenjeni operator, inducibilna transkripcija može da postane konstitutivnom. Ako se, međutim, usled mutacija regulatornih gena represor definitivno veže za gen operator, prestaje funkcija celog operona odnosno taj operon ostaje inaktivan. Različiti tipovi mutacija, koje remete kontrolu biosinteze proteina, dokazani su u bakterija.

Reprodukcija i seksualitet

REPRODUKCIJA

Reprodukcija je fundamentalna karakteristika života koja predstavlja širenje žive materije u prostoru i vremenu. Na reprodukciji bazira kontinuitet žive materije, to je proces koji spaja prošlost, sadašnjost i budućnost organskih vrsta.

Reprodukcija se može vršiti na različite načine: njena osnovna odlika je prenošenje genetičkih informacija za razviće određenog organizma sa roditelja na potomke, a te informacije su sadržane u molekulima DNK.

Reprodukcija je zastupljena na svim nivoima organizacije živog sistema. Reprodukuju se molekuli u ćelji, ćelija kao celina i najzad organizmi. (sl. 3.1).

Reprodukcija molekula u ćeliji – U ćeliji se neprestano vrši spontana razgradnja molekula. Makromolekuli imaju ograničen vek i zamenjuju se novim. Enzimi mogu vršiti svoju funkciju u proseku nekoliko dana, a neke molekule RNK samo nekoliko minuta. Putem stalnog obnavljanja-reprodukcije ćelijskih struktura na hemijskom nivou, može se održavati integritet ćelije.

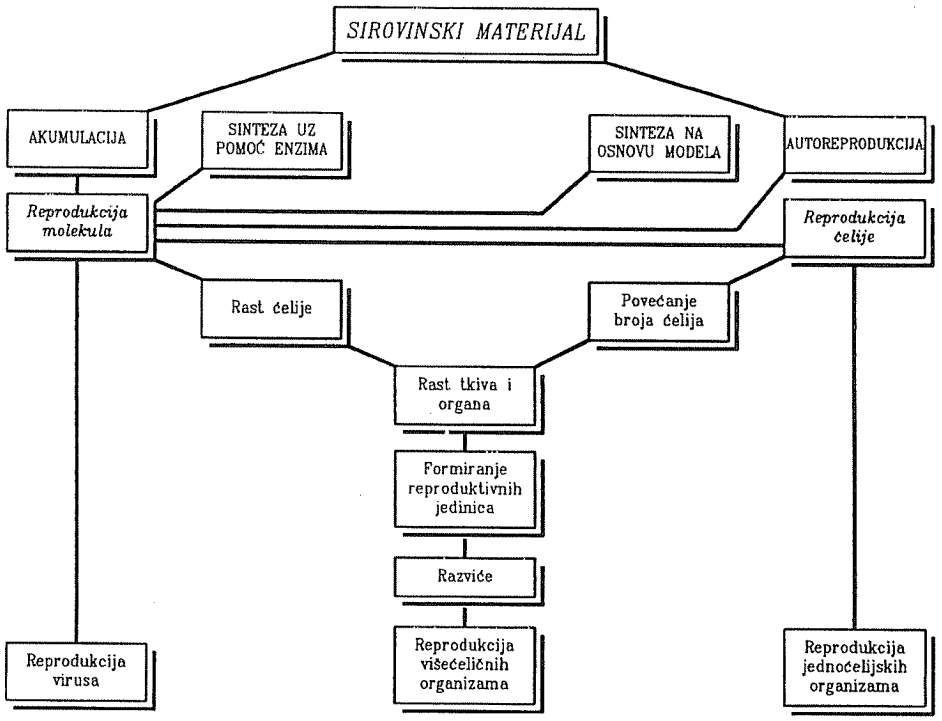
Poznata su četiri različita načina reprodukcije molekula u ćeliji:

1. akumulacija;
2. sinteza uz pomoć enzima;
3. sinteza na osnovu modela;
4. autoreprodukcija.

Akumulacija predstavlja najjednostavniji oblik reprodukcije molekula. Da bi došlo do umnožavanja molekula vode i drugih neorganskih supstanci u ćeliji ove moraju biti unete putem ishrane u organizam.

Sinteza uz pomoć enzima – nužno uključuje i akumulaciju materijala iz koga se sintetišu odgovarajuće supstance. Za sintezu novih molekula u ćeliji, neophodno je prisustvo odgovarajućih enzima, a enzimi, po hemijskoj prirodi proteini, sintetišu se na osnovu modela.

Sinteza na osnovu modela – molekuli proteina nastaju povezivanjem ostataka aminokiselina u polipeptidne lance. Ovaj proces se vrši pod kontrolom nasledne osnove – molekula DNK čiji redosled nukleotida predstavlja genetički kod "šifru" koja se prenosi preko molekula i RNK i određuje položaj aminokiselina u molekulu proteina. Ovaj treći oblik, od modela zavisna reprodukcija molekula obuhvata i prva dva oblika molekulske reprodukcije, akumulaciju sirovinskog materijala i učešće odgovarajućih enzima, koji katalizuju pojedine etape ovog složenog procesa.



Slika 3.1.

Autoreprodukcija – Sposobnost autoreprodukcije poseduje nasledna materija-molekuli DNK. Složeni proces replikacije DNK se kompletira uz učešće sve tri napred pomenute forme molekulske reprodukcije. Ovaj proces zahteva akumulaciju sirovinskog materijala, sintezu sopstvenih komponenata nukleotida katalizovanu enzimima, enzimsku katalizu samog procesa replikacije, kao i autoreprodukciju na osnovu modela. Replikacija DNK predstavlja najbitniji proces koji održava kontinuitet žive materije.

Kod virusa gde strukturna organizacija ne prevazilazi nivo agregata molekula, reprodukcija virusne čestice se poklapa sa reprodukcijom molekula. Ranije je naglašeno, da se virusi sastoje iz molekula DNK i proteina ili RNK i proteina.

Virusi ne poseduju vlastiti enzimski sistem, pa ni sposobnost nezavisne sinteze proteina potrebne za njihovo razmnožavanje.

Ćelije inficirane virusima pokazuju jednu od sledećih reakcija: Ulaskom u ćeliju virus unosi "podmeće" svoj genetski materijal a može da uništi DNK domaćina i potpuno preorijentiše biosintetski aparat ćelije za produkciju virusnih sastojaka, što dovodi do degeneracije i smrti ćelije. Virusi mogu ćeliju domaćina transformisati u neoblastično stanje ili mogu preživljavati u ćeliji bez transformisanja. Zbog toga se virusi mogu posmatrati i kao genetski paraziti.

Depolimerizacijom molekula DNK, RNK i proteina ćelije domaćina obezbeđuju se nukleotidi za replikaciju virusne nukleinske kiseline i aminokiseline za sintezu virusnih proteina.

U intaktnom virusu nukleinska kiselina je metabolički inertna. Da bi započeo proces razmnožavanja virusa, nukle-

inska kiselina mora biti oslobođena iz svog proteinskog omotača. Neki virusi poseduju specijalne enzime i specifično diferenciran mehanizam, koji pomažu unošenje njihove nukleinske kiseline u ćeliju domaćina npr. virusi bakterija. Druge virusne čestice mogu biti unete u intaktnom obliku u ćeliju, gde se razlažu i oslobađaju svoju nukleinsku kiselinu.

Najiscrpnija istraživanja su vršena na virusima *bakterija* koji se nazivaju *bakteriofagi* ili *fagi*. Tipičan fag se sastoji od glave i repa. U glavi se nalazi nukleinska kiselina opkoljena proteinskim omotačem prizmatičkog oblika, često u preseku šestougaona. Adsorpcija faga za ćeliju domaćina je dobro proučena. Pre nego što se adsorbuje površina faga mora raspolagati određenim katjonima. Priroda i broj katjona variraju od jednog do drugog faga.

Fagi poseduju naročite delove za pripajanje, a ćelija domaćin ima na svojoj membrani specifična mesta na koja se virusi pripajaju, *lokalizovani receptori.*

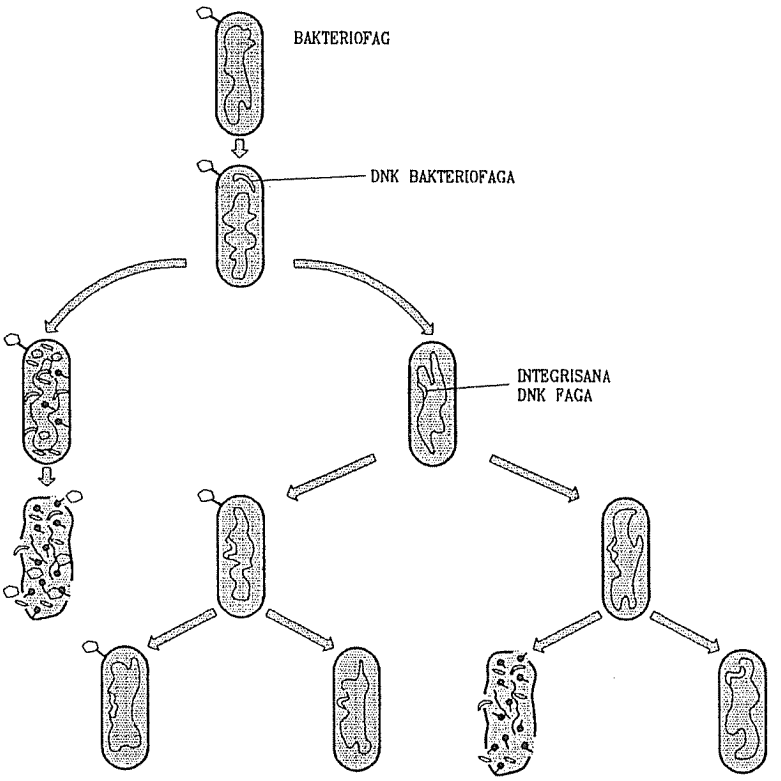
Na vrhu repa faga nalazi se 6 dugih savitljivih vlakana, preko kojih se vrši primarni kontakt sa ćelijom domaćina. Pomoću enzima lizozima koji se nalaze u repu faga, fag razlaže zid ćelije domaćina i ubacuje svoju DNK u ćeliju, a proteinski omotač ostaje izvan ćelije.

DNK virusa može ući u zavisno ili nezavisno stanje u ćeliji domaćina. Kada se virusna nukleinska kiselina ugrađuje u hromosom bakterije i sa njim sinhronizovano umnožava, to se definiše kao zavisno umnožavanje, a ako se ne ugrađuje, nezavisno umnožavanje.

Nezavisno umnožavanje faga. Neki fagi uvek liziraju ćeliju domaćina. Kada virusna DNK uđe u ćeliju, ona predstavlja *vegetativni fag,* koji obustavlja sintezu DNK ćelije domaćina i na kraju je uništava. DNK virusa se u ćeliji umnožava i daje nove vegetativne fage, koje sadrže informacije za sintezu proteina virusa, koristeći biosintetski aparat ćelije. Prvi stvoreni proteini su enzimi, a kasnije se sintetišu i strukturalni delovi glave i repa, kao i enzim lizozim kojim razgrađuje ćelijski zid domaćina. Na ovaj način vegetativni fagi ne uništavaju samo genetički materijal ćelije domaćina, već vrše kompletnu dezorganizaciju ćelije. Za vrlo kratko vreme u ćeliji se stvara 100 – 200 zrelih faga (nukleinska kiselina opkoljena omotačem). Zreli fag je morfološki tipičan infektivni virus, koji se ne razmnožava dalje u ćeliji u kojoj je nastao. Pod uticajem lizozima, membrana ćelije se razlaže i ćelija se raspada (lizira), a zreli fagi se oslobađaju i mogu inficirati druge ćelije. Ovakve bakterije se nazivaju *litične,* a proces litička infekcija. Reprodukcija virusa u ćeliji domaćina teče kao neograničena sinteza, kao vrsta molekularnog kancera (sl. 3.2).

Postoje fagi koji ne liziraju ćelije domaćina, već se sinhrono reprodukuju sa domaćinom kroz mnogo generacija. Ovo je *zavisno umnožavanje,* a fagi koji ne narušavaju vijabilitet ćelije domaćina već se nalaze u nekoj vrsti simbiotskih odnosa sa njom nazivaju se *umereni virusi* ili *profagi.*

Bakterije koje nose integrisani provirus u svom hromosomu nazivaju se *lizogene,* što znači da nose potencijalni letalni faktor, jer profag može katkad spontano preći u vegetativni fag, dovesti do lize ćelije inficirati druge sojeve bakterija osetljive na dejstvo faga (sl. 3.2). Lizogenost je veoma stabilan karakter bakterijskog soja kao i svaka druga nasledna karakteristika. Lizogene bakterije poseduju na svojim hromosomima specifične lokuse na kojima se ugrađuje genetički materijal faga. Predpostavlja se da su ovi "lokusi pripajanja" komplementarni određenom regionu u molekulu DNK faga i između njih dolazi do rekombinacije. Mutirane fage koje ne poseduju



Slika 3.2.

ovaj lokus ne integrišu se jer ne mogu da "prepoznaju" lokus pripajanja na hromosomu ćelije domaćina.

Novija ispitivanja su pokazala da rekombinaciju između DNK faga i hromosoma (DNK) ćelije omogućuje specijalni protein, koji se naziva ***protein integracije,*** čiju sintezu kontroliše odgovarajući gen na DNK faga. Ovaj protein služi za prepoznavanje specifičnog redosleda nukleotida određenog lokusa DNK ćelije domaćina.

Postoje podaci koji ukazuju da jedan gen pripojenog faga daje informaciju za sintezu jedne proteinske represorne supstance u ćeliji domaćinu, koja sprečava odvajanje profaga i prelazak u vegetativnu fazu. Prema tome "umerenost" faga bi se ogledala u sposobnosti sinteze sopstvenog represora. Vrlo retko se profag spontano razvija u vegetativni fag. Ova pojava se može izazvati dejstvom nekih faktora, na primer, ultravioletnim zracima, a podložnost faga zavisi od genetskih karakteristika profaga i fiziološkog stanja ćelije domaćina.

Da bi se profag pretvorio u vegetativni fag, mora doći do inaktivacije ili uništenja represora, a neophodno je i prisustvo jednog proteina koji se naziva "protein izdvajanja".

Profagi mogu da izazovu pojavu nekih fenotipskih svojstava u lizogenim bakterijama (u sintezi enzima, morfološkoj promeni kolonija, svojstvima membrane itd). Samo oni bacili difterije koji u sebi nose specifičan profag stvaraju difterijski toksin, koji je upravo izazivač obolenja.

Umereni fagi bi predstavljali epizome bakterija. S evolutivne tačke gledišta bak-

teriofagi se mogu posmatrati kao posebna grupa epizoma, koji su u procesu evolucije akumulirali genetičke informacije neophodne za sintezu belančevina virusnog omotača, koji obuhvata genetski materijal. Na ovaj način se DNK faga preobratila u infektivni epizom sposoban da u obliku virusa kasnije pređe iz jednog domaćina u drugog.

U svim ćelijskim živim sistemima reprodukcija molekula dovodi do rasta ćelija (povećanja protoplazmatične mase i obnovljanja različitih struktura ćelija). Brzina hemijske reprodukcije zavisi od zaliha neophodnih sastojaka u ćeliji. Duplikacija (autoreprodukcija molekula DNK u jedru može predstavljati stimulans, koji na još uvek nepoznat način inicira reprodukciju ćelije kao celine.

Reprodukcija ćelije. Deoba ćelije je univerzalni fenomen koji karakteriše žive sisteme, jedna od bitnih karakteristika života. Deobom ćelije se vrše umnožavanje jednoćelijskih organizama i rast višećelijskih organizama, zarastanje rana, zamena oštećenih i izgubljenih delova tela – regeneracija.

Reprodukcija prokariota – bakterija. Morfološki procesi deobe ćelije prokariota nisu još dovoljno poznati. Prokarioti se dele binernom deobom; mitoza se ne javlja jer u njihovim ćelijama ne postoji izdiferencirano jedro. Genetski materijal predstavlja prstenasti hromosom, koji se sastoji iz dvostrukog DNK-lanca bez proteina. U procesu deobe svaka novonastala ćelija dobije istu garnituru gena koju je imala i ćelija majka. Pre deobe ćelije vrši se replikacija DNK-hromosoma. Pretpostavlja se da je hromosom bakterije povezan sa membranom ćelije, a da se mesta pripajanja nalaze u zoni rasta bakterije i imaju ulogu u koordinaciji rasta ćelije i replikacije hromosoma. U bakterije Escherichia coli replikacija DNK se izvrši za oko 40 min na 37 °C. U odgovarajućoj sredini vreme između replikacije DNK i deobe bakterije iznosi oko 20 min. Rastom membrane ćelija se izdužuje, dva hromosoma nastala replikacijom na ovaj način se međusobno udaljuju, podeli se citoplazma i nastaju dve ćelije kćeri – bakterije.

Mitoza – kariokineza

Rast tkiva i organa je rezultat dva fiziološki različita procesa. Jedan uključuje povećanje osnovne mase ćelije (rast citoplazme i jedra), a drugi deobu ćelije. Rast ćelije se vrši za vreme relativno dugog perioda životnog ciklusa ćelije, koji se naziva interfaza, dok proces deobe – mitoza – traje relativno kratko i može se podeliti u četiri faze: profaza, metafaza, anafaza i telofaza. Proces mitoze je u osnovi isti u svim organizmima u čijim se ćelijama nalazi izdiferencirano jedro (Eukariota). Pored jedra, deoba ćelije obuhvata i citokinezu, deobu citoplazme i njenih organela.

Interfaza. Predstavlja period životnog ciklusa ćelije između dve deobe. Ova faza se karakteriše intenzivnom metaboličkom aktivnošću. U interfaznom jedru hromosomi su despiralizovani, jako hidratisani, slabo se boje i verovatno su ravnomerno raspoređeni, što daje homogen izgled jedru. Proces despiralizacije hromosoma je veoma značajan, jer se replikacija DNK hromosoma i transkripcija (sinteza RNK), vrši samo u despiralizovanom stanju.

U interfazi se razlikuju tri stadijuma: stadijum neposredno posle deobe ćelije, označen je kao G_1, zatim slede S i G_2 stadijumi.

G_1 stadijum je obično najduži i dužina interfaze uglavnom zavisi od dužine ovog stadijuma. Postoje podaci koji ukazuju da se u ovom stadijumu vrši sinteza RNK na određenim segmentima DNK – genima i sinteza proteina. U G_1 stadijumu se verovatno sintetišu i neki enzimi uključeni u replikaciju DNK.

Drugi S stadijum predstavlja fazu u kojoj se vrši replikacija – udvajanje DNK hromosoma, što znači, da svaka hromonema autoreprodukcijom stvara identičnu hromonemu. Prema novijim podacima u citoplazmi ćelije se u S stadijumu sintetišu i histoni, proteini hromosoma, koji ulaze u jedro i spajaju se sa molekulima DNK. Sinteza nehistonskih proteina nije ograničena na S stadijum, jer mnogi ulaze u jedro u toku G_2 stadijuma.

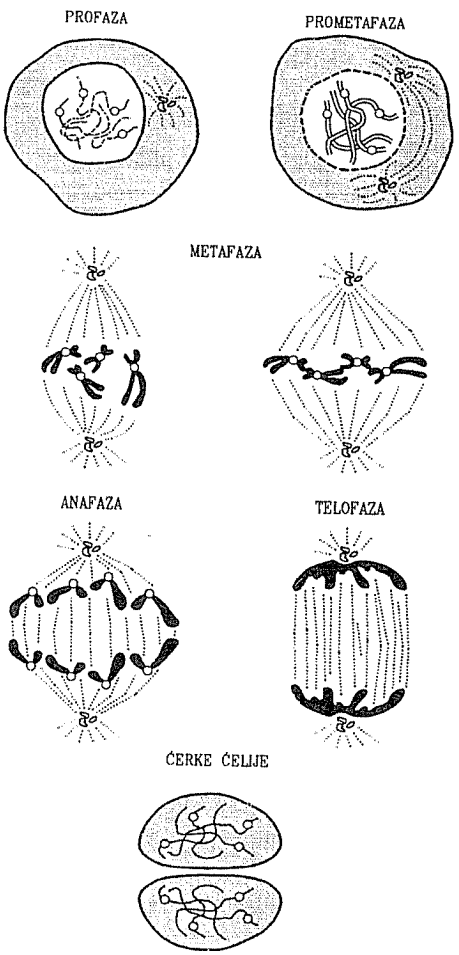
Predpostavlja se, da se za vreme relativno kratkog G_2 stadijuma, koji prethodi deobi, proteini uključuju u strukturu hromosoma, a vrši se i sinteza proteina koji ulaze u sastav deobnog vretena.

U interfazi hromosomi znači imaju specifičan udeo u metaboličkim aktivnostima ćelije, kroz sintetske procese koji se odigravaju u ovom periodu, ćelija raste i priprema se za deobu. Vremenski interfaza obuhvata oko 2/3 životnog ciklusa ćelije.

Profaza. Prva vidljiva promena u jedru koja označava početak profaze je pojava vidljivih hromosoma u vidu dugih konaca.

Svaki hromosom se sastoji iz dve hromoneme povezane sa proteinima, koje se nazivaju *hromatide.* Na jednom mestu hromatide su spojene: ovo mesto se naziva *centromera* (kinetohora) ili primarna konstrikcija. U toku profaze vrši se spiralizacija hromatida uz gubljenje vode i hromosomi postaju kraći i deblji i prelaze u kondenzovanu transportnu formu, a njihova sintetska aktivnost opada. Proces spiralizacije je izgleda pod kontrolom proteinskih molekula, koji su povezani sa DNK hromosoma. Nedavna ispitivanja su pokazala da se sinteza RNK smanjuje u ranoj profazi kada hromosomi počinju intenzivno da se spiralizuju i potpuno prestaje u srednjoj profazi, kada su hromosomi gusto spiralizovani. Smatra se da je prekid sinteze RNK uslovljen nesposobnošću DNK da u spiralizovanom stanju posluži kao model za sintezu RNK (sl. 3.3).

Na početku profaze u blizini jedra, zapažaju se dva para centriola. Oko sredine profaze oni se odvajaju i kreću prema suprotnim polovima ćelije. Između dva centriola pojavljuju se gel fibrile koje grade segmentaciono ili deobno vreteno, koje se naziva i ahromatinski materijal, jer nema afinitet za boje. Deobno vreteno ima veliki značaj za kretanje hromosoma u toku deobe. Elektronskim mikroskopom je utvrđeno da se ova struktura sastoji iz cilindričnih mikrotubula, di-



Slika 3.3.

jametra oko 2, 0 nm, a debljine zida oko 65 nm.

Hemijska analiza deobnog vretena ukazuje, da je ono ribonukleoproteinske prirode; prosečno 15% proteina protoplazme ulazi u njegov sastav, dok je RNK zastupljena sa 6%. Utvrđeno je i prisustvo polisaharida, lipoproteina, ATP-a i enzima ATP-aze, koji razgrađuju molekule ATP-a. Postoji predpostavka da se proteini u sastavu vretena uglavnom sintetišu za vreme interfaze i na početku profaze su u neorganizovanoj formi. Smatra se da centrioli u životinjskim ćelijama imaju ulogu u organizovanju proteina u mikrotubule vretena, mada je mehanizam formiranja još nejasan. Stvaranjem mikrotubula centrioli se pomeraju ka suprotnim polovima ćelije, na taj način što ih mikrotubule međusobno udaljuju.

Mikrotubule između suprotnih centriola se međusobno povezuju i stvaraju kontinuirane fibrile deobnog vretena, a druge se projektuju oko centriola kao astralni zraci. Pored ovih u deobnom vretenu se nalaze i fibrile koje se pružaju od centriola do hromosoma. Ove fibrile se spajaju sa centromerama hromosoma i nazivaju se hromosomske fibrile. Za svaku centromeru se učvršćuju po dve fibrile, od svakog centriola po jedna.

U ćelijama viših biljaka i nekih beskičmenjaka ne postoje centrioli i asteri, takva mitoza se naziva *acentrična* i *anastralna.* Međutim, segmentaciono vreteno se javlja i fibrile se pružaju između suprotnih polova ćelije.

U početku profaze su nukleolus ili nukleolusi krupni i uočljivi, zatim se postupno dezintegrišu i smanjuju, odvajaju se od hromosoma organizatora nukleolusa i isčezavaju, ali i dalje ostaju u ćeliji u formi difuzno raspoređenih ribosomalnih čestica i fibrila, koje mogu biti povezane za hromosome ili slobodne u citoplazmi. Jedrova membrana se fragmentira i postupno isčezava, a sadržaj jedra se slobodno meša sa citoplazmom.

Metafaza. Najtipičnija i obično najkraća faza u mitotičkoj deobi. Segmentaciono vreteno je formirano, hromosomi su maksimalno spiralizovani i dostižu 1/12 dužine profaznih hromosoma. U ovoj fazi hromosomi su najizrazitiji, kada se sa sigurnošću može utvrditi njihov broj, oblik i veličina. Hromosomi su pomoću svojih centromera povezani za fibrile segmentacionog vretena i zauzimaju mesto u ekvatorijalnoj ravni segmentacionog vretena. Na ovaj način se formira karakteristična metafazna ploča (ekvatorijalna ploča). Simultana deoba centromera svih hromosoma označava kraj metafaze. Centromere su neophodne za kretanje hromosoma, bez centromere hromosom ne može da se orijentiše u segmentacionom vretenu, a hromatide ne mogu da se odvoje jedna od druge.

Anafaza. Ova faza počinje čim se centromere podele, a hromatide se odvajaju i kreću ka suprotnim poslovima ćelije. Svaka hromatida ima svoju centromeru. U toku anafaze hromosomske fibrile se skraćuju a ostale fibrile deobnog vretena se izdužuju. Iako postoji više hipoteza, fenomen kretanja hromatida prema suprotnim polovima još uvek nije definitivno objašnjen. Jedno je jasno, da su i fibrile deobnog vretena i centromere hromosoma vrlo bitne za kretanje hromosoma (sl. 3.3).

Telofaza. Hromatide, koje se sada mogu nazvati i "kćeri" hromosomi stižu na suprotne polove ćelije; Spajanjem fragmenata endoplazmatičnog retikuluma, rekonstruiše se jedrova opna, pojavljuju se nukleolusi, hromosomi se despiralizuju i postaju – manje kompaktni, a fibrile segmentacionog vretena postupno isčezavaju. U ekvatorijalnom delu ćelije počinje konstrikcija citoplazme i pojavljuje se deobna brazda. Ova deobna braz-

da se sve više useca i predvaja majku ćeliju na dve kćeri ćelije. Kontrolni mehanizmi formiranja deobne brazde još uvek nisu dovoljno jasni (sl. 3.3).

Podelom citoplazme vrši se i manje više ravnomerna podela ćelijskih organela.

U biljnim ćelijama, koje na površini poseduju čvrstu celuloznu opnu u centru ekvatorijalne ravni segmentacionog vretena javljaju se sitne vezikule *fragmosomi,* za koje se smatra da su poreklom od Goldži aparata ili endoplazmatičnog retikuluma. Ove vezikule se sjedinjuju i napreduju prema zidovima ćelije, dok se ne formira deobna ploča, a sa njene obe strane se akumulira celuloza. Na ovaj način se u toku telofaze biljne ćelije, majka ćelija predvaja na dve kćerke ćelije.

U životinskim ćelijama i u ćelijama nižih biljaka centrioli u telofazi zauzimaju svoj položaj u blizini jedra, repliciraju se (udvajaju) i u toku interfaze rastu do određene veličine. Tek u narednoj ćelijskoj deobi oni počinju da funkcionišu.

Očigledno je da mitoza predstavlja kontinuiran proces koji se radi preglednosti deli u četiri faze, koje predstavljaju samo karakteristične momente ovog procesa. Shema prikazuje karakteristične momente u mitozi.

Vreme trajanja mitoze. U različitim tipovima ćelije dužina mitoze varira. U Protista traje oko 31 min., u mladih krvnih ćelija oko 2 časa, a u ćelijama sisara u kulturi oko 1 čas. Pojedine faze ćelijske deobe takođe različito traju. Poznato je da u ćelijama embriona kokoši u kulturi, profaza traje 10 min. metafaza 5, anafaza 8, a telofaza 20 minuta. Očigledno je da stadijumi metafaze i anafaze traju kraće. Ranije je naglašeno da je interfaza obično duga i u ćelijama sisara u kulturi traje 16-20 časova.

Značaj mitoze se ogleda u maksimalno ravnomernoj podeli genetskih faktora sadržanih u hromosomima, koji određuju sva svojstva jednog organizma. Ovo se postiže odvajanjem genetski jednakih hromatida svakog hromosoma u toku anafaze, koje se orijentišu prema suprotnim polovima ćelije. Na primer, ako je majka ćelija imala 8 hromosoma,

Tabela

PRIPREMA ZA DEOBU		DEOBA	
INTERFAZA	PROFAZA METAFAZA	ANAFAZA	TELOFAZA
REPLIKAZIJA HROMOSOMA	SPIRALIZACIJA I SKRAĆENJE HROMOSOMA	ODVAJANJE HROMATIDA	DESPIRALIZACIJA HROMATIDA
	FORMIRANJE DEOBNOG VRETENA	KRETANJE HROMATIDA PREMA SUPROTNIM POLOVIMA	IŠČEZAVANJE DEOBNOG VRETENA
	IŠČEZAVANJE NUKLEOLUSA	IZDUŽIVANJE DEOBNOG VRETENA	POJAVA NUKLEOLUSA
	IŠČEZAVANJE JEDROVE MEMBRANE		POJAVA JEDROVE MEMBRANE
	POSTAVLJANJE HROMOZOMA U METAFAZNU PLOČU		DEOBA CITOPLAZME (DEOBA ĆELIJE)
	POVEZIVANJE CENTROMERA ZA NITI DEOBNOG VRETENA		REPLIKACIJA CENTRIOLA

svaka novonastala ćelija će imati isti broj 8 hromosoma. Ovaj broj će se održavati od ćelije do ćelije, tako da sve somatske ćelije i nezrele polne ćelije jednog organizma, imaju isti broj hromosoma koji je karakterističan za vrstu.

Endoreduplikacija je najčešća modifikacija mitoze koja nastaje kada se hromosomi repliciraju dva ili više puta između dve mitoze. Endoreduplikacija je najčešći način poliploidizacije i verovatno se retko pojavljuje u svim tkivima čoveka.

Endomitoza označava pojavu mitoznih procesa unutar jedra, kada izostaje dezintegracija jedrove membrane. U telofazi ne dolazi do deobe ćelije, već jedro sa udvojenim hromosomima prelazi u interfazu. Jedino normalno tkivo čoveka u kome se zapaža endoreduplikacija je placenta.

Deoba ćelije je intenzivno proučavana i, mada su morfološke promene detaljno opisane, mnogi važni biohemijski procesi koji leže u osnovi ovih morfoloških promena nisu potpuno objašnjeni, kao što su faktori koji podstiču deobu ćelije i mnogi drugi ranije pomenuti procesi. Neke ćelije iz nepoznatih uzroka počinju da se dele nekontrolisano, što dovodi do pojave tumora.

Reprodukcija organizma. Proces reprodukcije organizma sastoji se od dva stupnja. Prvi stupanj predstavlja formiranje reproduktivnih jedinica, a u drugom se vrši razviće novog organizma iz reproduktivnih jedinica – gameta.

Gameti predstavljaju reproduktivne ćelije, ali se, za razliku od spora, ne mogu direktno razvijati u novu jedinku, već prethodno dva gameta stupaju u seksualni proces, pri kome se dve reproduktivne ćelije spajaju. Ove ćelije se zato nazivaju polne ćelije. Drugim rečima, između dve osnovne faze reprodukcije, formiranja reproduktivnih ćelija i razvića ovih ćelija u novu individuu, uključuje se seksualni proces.

SEKSUALITET

Postavlja se pitanje šta je seksualitet i kakav je njegov značaj. Seksualni proces se fundamentalno razlikuje od reprodukcije i može biti definisan kao akumulacija rekombinovanih gena iz dve različite jedinke u jednu jedinku. U prirodi se javljaju različiti mehanizmi pomoću kojih se rekombinuje genetski materijal iz dve različite jedinke. Svi ovi procesi se nazivaju seksualni procesi.

Seksualni proces ne mora biti u vezi sa procesom reprodukcije. Kada seksualni proces i reprodukcija nisu povezani, kao što je slučaj u mnogih Protista (Protozoa, alge, gljive) koji se reprodukuju vegetativnim putem ili sporama, on se kod njih pojavljuje odvojeno na određenom stadijumu životnog ciklusa i u određenim uslovima. Seksualni proces se javlja već kod supcelularnih organizama – virusa, kao i kod bakterija i nekih modrozelenih algi.

Seksualni proces kod virusa. Ako se jedna bakterija istovremeno inficira sa dva ili više genetički različitih faga, u potomstvu se javljaju rekombinovani fagi koji sadrže kombinacije gena roditelja. Tako je Hershey 1946. god, iz mešovite infekcije bakterije E. coli sa dva mutirana soja faga koji se razlikuju u dva svojstva dobio u potomstvu četiri genotipa:

$$hr^+ \times h^+r \rightarrow hr^+, h^+r, h^+r^+, hr$$

Pored roditeljskih tipova, u potomstvu su se javili i fagi divljeg tipa, kao i dvostruki mutanti.

Ovaj fenomen se objašnjava tako što dva fagna genoma mogu konjugirati u ćeliji domaćina i međusobno izmeniti homologe delove putem crossing overa,

h^+ označava gen koji određuje spektar litičkog dejstva, r^+ gen koji kontroliše sposobnost liziranja ćelije domaćina, a *h* i *r* su njihovi mutirani aleli.

Seksualni proces se javlja i u bakterija (videti u poglavlju "Rekombinacije").

Ako su genetske rekombinacije nastale seksualnim procesom povoljne za jedinku, seksualnost ima adaptivnu vrednost. Seksualnost, znači, predstavlja glavni faktor adaptacije i ima izvanredno veliki značaj za evoluciju date organske vrste, jer se procesom seksualnosti unose genetske promene u potomstvu.

Reprodukcija pomoću gameta

Treba odmah zapaziti da često korišćeni termini "bezpolna" i "polna" reprodukcija nisu sasvim prikladni. Fundamentalni proces reprodukcije je formiranje produktivnih jedinica, a razviće ovih u nove individue može i ne mora biti kombinovano sa seksualnim procesom.

Reprodukcija pomoću gameta je vrlo široko zastupljena u živom svetu, od vrlo jednostavnih do najsloženijih organizama. Činjenica, da je seksualnost tako široko zastupljena u nizu životnih formi ukazuje da ovaj proces, kao deo reproduktivne funkcije ima ulogu od veoma velikog biološkog značaja, jer omogućuje kombinaciju naslednih faktora biseksualnih organizama koja se prenosi na potomstvo.

Gameti koji se spajaju mogu biti iste građe, veličine i pokretljivosti, što se često sreće u Protista. Ova pojava se naziva *izogamija* a gameti *izogameti.* Međutim ovi gameti se moraju međusobno funkcionalno razlikovati, jer se ne mogu spajati bilo koje dve ćelije.

U mnogih Protista, gameti se razlikuju po veličini i izgledu; jedan gamet je manji, oba su pokretna i nazivaju se *anizogametia,* a njihovo spajanje *anizogamija.* Kod nekih Protista, svih Metafita i Metazoa postoji specijalna forma anizogamije – *oogamija.* U ovom slučaju jedan gamet je snabdeven bičem pokretan i mali, a drugi je nepokretan ili ameboidan i obično veliki. Manji gamet se naziva *spermatozoid* a veći *jajna ćelija.*

Reproduktivne i somatske ćelije. Postoji jasna razlika između ćelija jednog organizma koji vrše različite funkcije i reproduktivnih ćelija-gameta. Gameti su specijalizovane ćelije koje se razlikuju od svih ostalih ćelija, jer poseduju specifične karakteristike koje se ne zapažaju ni u jednom tipu ćelija. Dok se ćelije koje grade telo (somatske) diferenciraju u različitim pravcima, tzv. klicine ćelije (germinativne) su očuvale svoju totipotentnost i sposobne su da formiraju novi organizam.

Već u jajnim ćelijama Ascarisa moguće je zapaziti region citoplazme iz koga će se kasnije diferencirati primordijalne germinativne ćelije. Ove ćelije se javljaju vrlo rano u toku embriogeneze, kod Ascarisa se izdvajaju posle četvrte deobe zigota na stadijumu od 16 blastomera. Kod nekih kičmenjaka, amfibi, ove ćelije se mogu identifikovati na ranim stupnjevima segmentacije, pre formiranja blastule, dok se kod većine ostalih kičmenjaka, oblasti iz kojih će nastati primordijalne germinativne ćelije, zapažaju pre stadijuma gastrule.

U fetusu čoveka starosti 3 – 4 nedelje, određen broj primordijalnih germinativnih ćelija (oko 50) se individualizira i zapaža u endodermskom epitelu vitelusne kese. Oko pete nedelje fetalnog razvića ove ćelije migriraju u region budućih polnih žlezda.

Gametogeneza

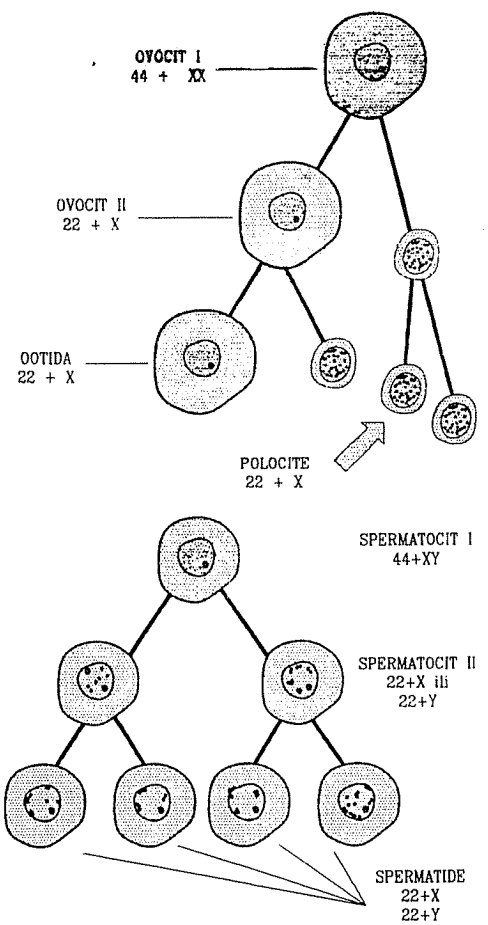
Skup procesa koji se vrši u jedru i citoplazmi jedne nediferencirane germinativne ćelije iz koje će nastati visoko

diferencirane polne ćelije-gameti, označen je kao gametogeneza. Proces formiranja muških polnih ćelija naziva se *spermatogeneza,* a *ženskih oogeneza* (sl. 3.4).

Gametogeneza se sastoji iz tri faze:

1. razmnožavanja
2. rasta
3. sazrevanja

Faza razmnožavanja. U ovoj fazi iz primordijalnih germinativnih ćelija mitotičkom deobom se formira populacija specijalnih ćelija tzv. *gonija,* koje se nazivaju *spermatogonije* u muškom polu, a *oogonije* u ženskom polu. Gonije su slične



Slika 3.4.

u oba pola i često su nešto veće od drugih ćelija sa krupnim ovoidnim ili okruglim jedrom i sadrže diploidan broj hromosoma (2n) kao i somatske ćelije.

Faza rasta. Spermatogonije i oogonije se povećavaju u fazi rasta i diferenciraju se u primarne spermatocite i oocite.

Ova faza je mnogo više izražena u oogeneze, gde razlikujemo dva perioda: *previtelogenezu* i *vitelogenezu.* U previtelogenezi ćelije neznatno rastu, to je period sinteze nukleinskih kiselina i prekursora vitelusa. Vitelogeneza obuhvata period akumulacije energijom bogatih hranljivih materija – vitelusa, kada ćelije znatno porastu i diferenciraju se u *primarne oocite.*

U interfazi koja predhodi formiranju primarnih spermatocita i oocita DNK se replicira i genetički materijal se učetvorostruči. Ovaj fenomen ne označava samo kvantitativno povećanje hromatina, već vrlo preciznu duplikaciju gena, jedinica naslednog materijala.

Faza sazrevanja. Posle faze rasta primarne spermatocite i oocite ulaze u fazu sazrevanja. Ova faza se sastoji iz dve deobe, a ceo proces nosi naziv *mejoza.* Jedna deoba je *redukciona* u kojoj se diploidni (2n) broj hromosoma smanjuje na haploidni broj (n). Druga deoba je *ekvaciona,* izmenjena mitoza.

I *Profaza mejoze.* Predstavlja najduži i najsloženiji stadijum mejotičkog procesa i može se podeliti u pet podfaza:

1. *Leptoten* (leptonema). Na početku leptotena hromosomi postaju vidljivi, kao fini konci, a kasnije se spiralizuju. postaju deblji i kraći i lakše se uočavaju u jedru. Na njima se zapažaju hromomere čiji je broj veličina i položaj na homologim hromosomima konstantan. Hromomere predstavljaju lokalizovane oblasti povećane spiralizacije. Elektronskim mikroskopom se može videti da su

hromosomi svojim krajevima spojeni sa membranom jedra.

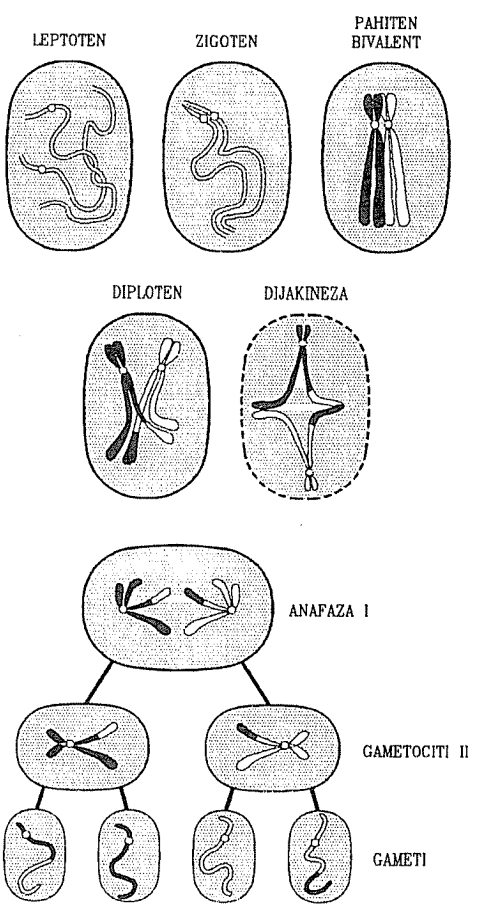
2. ***Zigoten*** (zigonema). U ovoj fazi hromosomi se još više skraćuju, homologi parovi se približavaju i počinju da konjugiraju. Spajanje često počinje na krajevima kojima se hromosomi spajaju sa membranom jedra, a zatim se nastavlja celom dužinom hromosoma. Ovaj proces se naziva sinapsis, a kao rezultat sinapsisa nastaju bivalenti (spareni homologi hromosomi). Postoji mišljenje da se između homologih hromosoma javlja izvesna atraktivna snaga, koja bazira na proteinskim molekulima, koji sa hromosomima stvaraju tzv. ***sinaptički kompleks.*** Zbog toga što su homologi hromosomi intimno priljubljeni, stiče se utisak da se broj hromosoma smanjio na polovinu; ova pojava se naziva ***lažna redukcija.***

3. ***Pahiten (pahinema).*** Kada je sinapsis kompletiran počinje pahiten. Hromosomi se još više skraćuju i zadebljavaju usled kondenzacije a pažljivim posmatranjem se može zapaziti, da se svaki član homologog para sastoji iz 2 hromatide, formiraju se tetrade. Pojedini bivalenti se povezuju sa nukleolusom, kod čoveka to su akrocentrični hromosomi, organizatori nukleolusa.

4. ***Diploten*** (diplonema) homologi hromosomi počinju da se odvajaju jer dolazi do smanjivanja atraktivne snage između njih i nestajanja sinaptičkog kompleksa. Zbog odvajanja homologih hromosoma jasno se uočavaju 4 hromatide (tetrade). Odvajanje međutim, nije potpuno, homologi hromosomi ostaju spojeni na izvesnim tačkama koje se nazivaju ***hijazme*** i predstavljaju mesto genetičkog ***crossingovera.*** Na hijazmama dolazi do izmene homologih segmenata između homologih hromosoma; izmena se vrši između nesestrinskih hromatida, najčešće između dve unutrašnje, a može i između spoljašnje i unutrašnje ili dve spoljašnje hromatide. Broj hijazmi je različit i povezan je sa dužinom bivalenata.

5. ***Dijakinezis*** se neznatno razlikuje od diplotena; hromosomi se i dalje kondenzuju, a hijazme usled toga zauzimaju terminalni položaj, pomeraju se ka krajevima hromosoma. U ovoj fazi se hromosomi često pomeraju ka periferiji jedra. Nukleolus se odvaja od hromosoma organizatora i isčezava, a membrana jedra počinje da se dezintegriše (sl. 3.5).

Metafaza. Membrana jedra potpuno isčezava, obrazuje se segmentaciono vreteno, a bivalenti, još spojeni na hijazmama postavljaju se u ekvatorijalnu ra-



Slika 3.5.

van segmentacionog vretena. Bivalenti sadrže po dve nepodeljene centromere, svaka pripada jednom homologom hromosomu i orijentisana je prema uzdužnoj osi vretena.

Anafaza. Za vreme prve mejotičke anafaze homologi hromosomi se odvajaju na hijazmama, ne dolazi do podele centromera i ***celi hromosomi (dijade) se kreću ka suprotnim polovima segmentacionog vretena.*** Na ovaj način se diploidni broj hromosoma 2n redukuje na haploidni n, međutim, količina DNK je još diploidna, pošto se svaki hromosom sastoji iz dve hromatide.

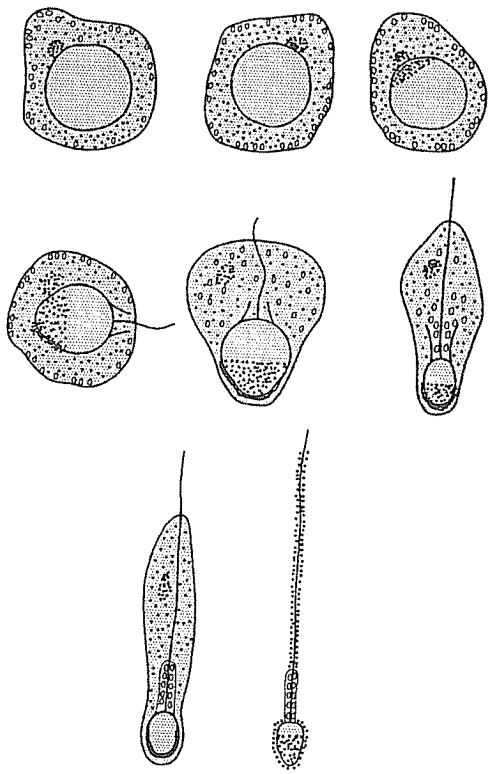
Telofaza – nije tipična, dolazi do rekonstrukcije haploidnih jedara, nastaju dve sekundarne spermatocite, a citoplazma se često ne deli potpuno, pa ćelije ostaju povezane što se vidi elektronskim mikroskopom. Sekundarne spermatocite obično ne ulaze u interfazu jer se nikada ne vrši replikacija DNK između dve deobe u mejozi. Pojava interfaze između dve mejotičke deobe ukazuje, da se vrši dopunska sinteza RNK i proteina neophodnih za kompletiranje mejoze.

Druga deoba mejoze – ekvaciona. Profaza druge deobe traje kratko, i odmah nastupa metafaza; jedrova opna isčezava, obrazuje se segmentaciono vreteno, a hromosomi se postavljaju u ekvatorijalnu ravan ćelije. Anafaza počinje deobom centromera svakog hromosoma, ***hromatide se odvajaju i kreću ka suprotnim polovima segmentacionog vretena.*** Za vreme telofaze nastaju četiri spermatide. Svaka spermatida dobija samo četvrtinu od ukupne količine DNK, koju je sadržala primarna spermatocita od koje su dvema deobama nastale četiri spermatide. Znači, svaka primarna spermatocita sa diploidnim brojem (2n) hromosoma koja ulazi u fazu sazrevanja, daje četiri spermatide sa haploidnim (n) brojem hromosoma. (sl. 3.5).

Spermiogeneza. Ova faza obuhvata proces transformacije spermatida u spermatozoide. Za vreme procesa jedro gubi tečnost, skuplja se u kompaktnu tamno obojenu masu; ćelija postaje polarizovana sa Goldžijevim aparatom na jednom kraju, a mitohondrijama i centriolima na drugom. Jedro se zatim izdužuje a sloj povezanih mikrotubula orijentisanih u pravcu uzdužne ose jedra opkoljava jedro. Goldžijev aparat postaje manje membranozan, pojavljuju se granulacije i nastaje ***akrozom,*** malo telašce koje služi za interakciju spermatozoida sa jajnom ćelijom. Akrozom sa jedrom sačinjava glavu spermatozoida. Na suprotnoj strani ćelije, nalaze se dva centriola, jedan zauzima proksimalni položaj uz jedro, a drugi distalni i leži iza njega. Od ovog drugog nastaju fibrile biča ili repa spermatozoida.

Mitohondrije koje obezbeđuju energiju za kretanje raspoređuju se helikoidno oko distalnog centriola i biča. Deo citoplazme sa ostatkom Goldžijevog aparata se eliminiše, zadržava se samo plazma membrana i tanak sloj iznad jedra i akrozoma koji se pruža i oko srednjeg dela i biča (sl 3.6).

Oogeneza. U osnovnim citološkim procesima oogeneza se ne razlikuje od spermatogeneze, ali se razlikuje u nizu detalja. Kada se primarna oocita podeli posle redukcione deobe u jednoj ćeliji ostaje skoro sva citoplazma sa haploidnim jedrom, to je ***sekundarna oocita,*** a druga ćelija sadrži malo citoplazme i haploidno jedro i naziva se primarna *polocita.* Posle deobe sekundarne oocite nastaju opet dve ćelije različite veličine. Veća predstavlja ***ootidu*** a mala sekundarnu ***polocitu,*** obe sa haploidnim brojem hromosoma. Primarna polocita se takođe može podeliti, pa je ootida – jajna ćelija opkoljena sa tri polocite. Samo ootida predstavlja reproduktivnu ćeliju, dok se polocite resorbuju. (sl. 3.4)



Slika 3.6.

1. Procesom redukcije diploidnog broja hromosoma na haploidni obezbeđuje se stalan broj hromosoma koji je karakterističan za vrstu. Kada ne bi došlo do redukcije, broj hromosoma bi se duplirao sa svakom novom generacijom.

2. Proces mejoze dovodi do genetičke raznovrsnosti, jer se stvaraju gameti sa različitom naslednom osnovom. Ovo omogućuju dva mehanizma:

a) Odvajanje homologih hromosoma koji su poreklom jedan od oca drugi od majke i njihov slučajan raspored u kćeri ćelije za vreme redukcione deobe. Ukoliko je veći broj homologih parova u jedru i broj kombinacija je veći. Čovek sadrži 23 para hromosoma, što znači, da je broj mogućih kombinacija hromosoma u gametima skoro beskonačan.

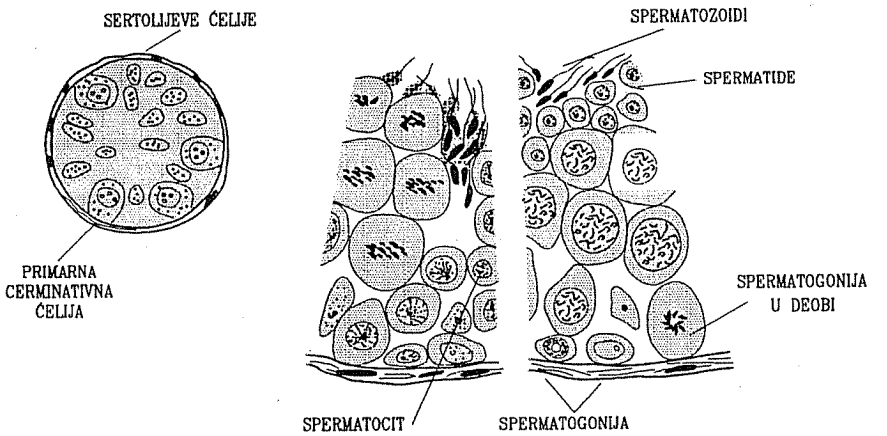
b) Rekombinacije segmenata homologih hromosoma nastale procesom crossing over-a u I profazi mejoze.

Spermatogeneza sisara

Intenzivna deoba spermatogonija sisara i diferencijacija u primarne spermatocite koje ulaze u fazu sazrevanja počinje u pubertetu. U čoveka i relativno malog broja drugih životinja, koje nemaju specijalni period parenja, spermatogeneza teče kontinuirano u toku celog perioda polne zrelosti.

U testisu sisara postoje brojni seminiferni kanalići u kojima se vrši proces spermatogeneze; u njima se nalaze ćelije na različitim stadijumima razvića. Na periferiji kanalića mogu se razlikovati dva tipa ćelija. Jedan tip se sastoji iz krupnih piramidalnih ćelija, koje se pružaju od površine membrane kanalića, skoro do centralnog lumena. To su Sertolijeve ćelije, koje služe kao potpora i za ishranu. Ćelije drugog tipa su spermatogonije, to su ćelije koje se razvijaju iz primordijalnih germinativnih ćelija, sitnije su i nepravilnog oblika sa okruglim jedrom i poređane su u dva sloja na periferiji seminifernih kanalića. Primarne spermatocite koje nastaju iz spermatogonije su sa krupnim gustim jedrom, a sekundarne spermatocite imaju mnogo manje jedro sa haploidnim brojem hromosoma. Spermatide su najsitnije ćelije sa gustom citoplazmom. Spermatozoidi se nalaze u lumenu kanalića pričvršćeni za Sertolijeve ćelije koje ih ishranjuju (sl. 3.7).

U građi spermatozoida se ogleda jasna korelacija između oblika i funkcije. Spermatozoid pliva u pravcu jajne ćelije, njegov oblik je specijalizovan za ovu funkciju kretanja kroz tečnu sredinu. Ispitivanja elektronskim mikroskopom su učinila dostupnom ovu specijalizovanu građu.



Slika 3.7.

Ultrastruktura spermatozoida sisara

Definitivan spermatozoid se sastoji iz pet regiona: glava, vrat, srednji deo, osnovni deo i terminalni deo.

Glava spermatozoida je ovalna. Jedro sa akrosomom obuhvata najveći deo ovog regiona.

Vrat predstavlja region u kome su smeštena oba centriola. Proksimalni centriol zadržava tipičnu građu, dok je distalni znatno modifikovan i ima oblik levka. Distalni centriol predstavlja bazalno telo bića spermatozoida i sastoji se iz tri različita sektora. Svaki od ova tri sektora sastoje se iz fibrila sastavljenih od kontraktilnih proteina, koji se pružaju u srednji deo.

Srednji deo obuhvata deo bića spermatozoida u kome se nalaze spiralno raspoređene mitohondrije, koje obezbeđuju energiju za preživljavanje i kretanje spermatozoida. Na poprečnom preseku bića zapažaju se tri prstena: spoljašnji prsten se sastoji iz 9 krupnih fibrila (700 nm – 1000 nm) unutrašnji prsten od 9 dvostrukih fibrila (180 nm) i dvostruka centralna fibrila utopljena u zajednički matriks.

Osnovni deo obuhvata najveći deo spermatozoida. U ovom delu bič je obuhvaćen koljen proteinskim omotačem. U prednjem delu nalazi se spoljašni prsten, unutrašnji prsten i centralna fibrila, dok u zadnjem delu spoljašnji prsten isčezava

Terminalni deo je bez proteinskog omotača, sastoji se iz unutrašnjeg prstena i centralne fibrile i opkoljen je ćelijskom membranom.

Spermatozoidi imaju različiti oblik u različitim grupama životinja, u izvesnim slučajevima ne postoji bič na primer morski rak, a kod Ascarisa je ameboidan.

Bič spermatozoida može biti različite dužine: kod termita je 1, 5 μ, kod sisara varira između 40 – 250 μm (čovek 53 μm) a kod Discoglossus-a (amfiba) spermatozoid dostiže veličinu 3 milimetra.

Biologija spermatozoida sisara

Pokretljivost. Spermatozoidi su nepokretni pre nego što pređu u muške izvodne kanale; sekrecija ovih kanala ima ulogu u njihovoj pokretljivosti. Unutrašnji prsten fibrila bića sadrži glavne elemente za širenje kontrakcija, a dvostruka centralna fibrila igra ulogu u sprovođenju pokreta spermatozoida, naizmeničnim kontrakcijama jedne i druge strane.

Na pokretljivost spermatozoida utiču različiti joni, jedni stimuliraju pokretljivost (Mg), dok je drugi smanjuju (Ca). Joni Cl i Cu deluju toksično. U pogledu pH postoji velika tolerancija i kreće se između pH 5 i 10.

Preživljavanje spermatozoida i sposobnost oplođenja. In vivo spermatozoidi preživljavaju izvesno vreme u genitalnim odvodima ženke. Sposobnost oplođenja spermatozoida kunića inkubiranih in vivo u uterus počinje naglo da opada posle 20 h. U genitalnim odvodima žene preživljavanje je ograničeno na 48 h, najviše do 3 dana.

Aktivnost spermatogeneze

Produkcija spermatozoida sisara je varijabilna, ali količina spermatozoida u ml semene tečnosti govori o značajnom aktivitetu testisa. Ispitivanja 200 fertilnih muškaraca su pokazala, da se ovaj broj kreće od 2, 25 do 544 mil/ml semene tečnosti, u proseku oko 120 mil/ml. Rezultati drugih istraživača su u saglasnosti sa ovim.

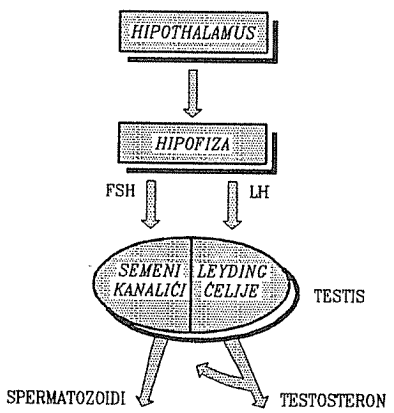
Na aktivnost spermatogeneze utiču i određeni faktori kao što su radijacije ili temperatura. Tako u slučaju criptorhidisma u sisara i čoveka, kada ne dođe do spuštanja testisa u skrotum, nastaje sterilnost jer se polne ćelije degenerišu na temperaturi abdomena, koja je za nekoliko stepeni viša nego u skrotumu.

Anomalije spermiogeneze. Uvek postoji određeni procent abnormalnih spermatozoida koji nisu sposobni za oplođenje. Ove abnormalnosti mogu zahvatiti glavu ili bič ili oba dela. Na primer glava može biti bezoblična, abnormalno velika ili mala, ili dve glave mogu biti spojene sa jednim delom. Postoje i spermatozoidi sa dvostrukim bičem, sa krivim ili izuvijanim bičem. U normalnih muškaraca abnormalni spermatozoidi se kreću oko 10%, ali u slučaju neplodnosti ovaj broj je mnogo veći. Postoji mišljenje da je plodnost narušena kada procenat aberantnih spermatozoida prelazi 20%, dok neki istraživači pomeraju granicu na 30 – 35%. Svi se, međutim, slažu, da je oblik spermatozoida samo jedan od mnogih faktora koji utiču na sposobnost oplođenja.

Kontrolni mehanizmi spermatogeneze. Danas se bez sumnje zna, da je regulacija reprodukcije funkcija recipročne interakcije između hipotalamusa, hipofize i polnih žlezda.

Prednji režanj hipofize luči gonadotropne hormone folikulostimulativni hormon (FSH) u luteinizirajući hormon (LH) koji deluju na polne žlezde – testise. FSH deluje na proces spermatogeneze, u nedostatku ovog hormona ne može doći do formiranja spermatozoida u testisima, LH utiče na produkciju i lučenje muškog polnog hormona testosterona u Leidigovim ćelijama testisa. Testosteron je neophodan za održavanje integriteta semenih kanalića testisa i završnu fazu spermatogeneze te i LH posrednim putem kontroliše spermatogenezu (sl. 3.8).

Sekrecija i oslobađanje gonadotropnih hormona prednjeg režnja hipofize su pod kontrolom neurohormona hipota-



Slika 3.8.

lamusa koji nose naziv oslobađajući (releasing) faktori – RH – FSH stimulira lučenje FSH, a RH – LH lučenje LH. Kontrola ovog sistema bazira na principu negativne povratne sprege. Višak polnih hormona u cirkulaciji deluje inhibitorno, a nedostatak stimulativno preko hormona hipotalamusa na lučenje gonadotropnih hormona hipofize.

Oogeneza sisara

Proces oogeneze se vrši u ženskim polnim žlezdama, ovarijumima. Oogonije nastale od primordijalnih germinativnih ćelija u toku diferencijacije ovarijuma, dele se intenzivno mitotičkom deobom i kod žene na primer formira se populacija od 6–7 miliona ćelija. Neke od ovih prestaju da se dele, rastu i diferenciraju se u primarne oocite pre rođenja. Primarna oocita se okružuje slojem folikularnih ćelija i formira se ***primarni folikul.*** (sl. 3.9a). Kod nekih kičmenjaka međutim, kao što su košljoribe i vodozemci, oocite se formiraju i znatno kasnije čak i u toku polne zrelosti.

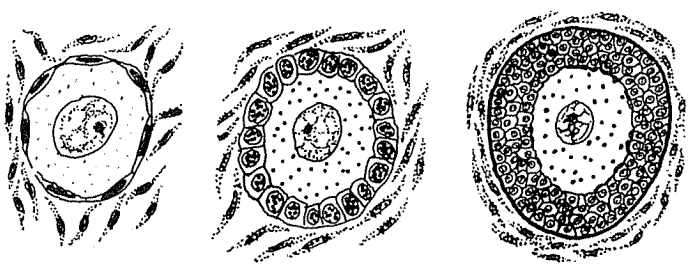
U toku sedmog meseca trudnoće skoro sve oogonije su transformisane u primarne oocite. U ovo vreme većina folikula podleže degenerativnom procesu pa u ovarijumu ženskog novorođenčeta ostaje svega 700.000–2.000.000 oocita. Ovaj fenomen se naziva ***atrezija folikula*** i nastavlja se i posle rođenja, te se broj oocita do puberteta smanji na 40.000 a u ženke pacova od 250.000 smanjuje se na oko 70.000 oocita. Faza sazrevanja oocita sisara počinje još u toku fetalnog života.

Profaza prve mejotičke deobe dostiže stadijum diplotena. U ovom stadijumu proces oogeneze se zaustavlja i primarne oocite ulaze u takozvani ***diktioteni stadijum*** ili stadijum "mirovanja". Diploteni bivalentni se despiralizuju, postaju končasti i odgovaraju četkastim hromosomima, koji se zapažaju u oocitama amfiba.

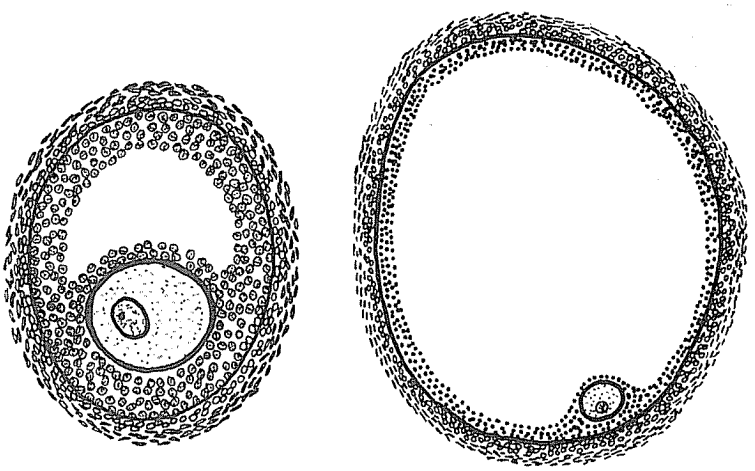
U stadijumu diplotena oocite ostaju sve do polne zrelosti kada se proces mejoze nastavlja i formiraju se zrele polne ćelije. U žene ovaj stadijum traje 10–50 godina; oocite koje sazrevaju na kraju reproduktivnog perioda imaju znači veoma dug stadijum diplotena.

U pubertetu kada folikul počinje da sazreva, folikularne ćelije oko oocite se intenzivno dele i formira se debeo sloj folikularnih ćelija ***stratum granulosum.*** Membrana oocite postaje gušća i nosi naziv ***plazmalema*** ili ***oolema.*** Iznad plazmaleme nalazi se jedna prozračna opna, koja je u nekih sisara i čoveka skoro bez strukture i naziva se ***zona pellucida.*** U njenom formiranju učestvuju folikularne ćelije i sama oocita. Neposredno na zonu pellucidu naležu ćelije corona radiata, ove su preko protoplazmatičnih produžetaka koji se pružaju kroz zonu pellucidu, povezane sa citoplazmom oocite i tako omogućuju njenu ishranu, u toku rasta i sazrevanja. Iznad stratum granulosum je vezivni omotač ***theca folliculi,***

SAZREVANJE FOLIKULA



Slika 3.9a.



Slika 3.9b

koji se diferencira u dva sloja: spoljašnji, fibrozni i unutrašnji membranozan, bogato prožet krvnim sudovima sa velikim brojem žlezdanih ćelija. Ovo je ***sekundarni folikul*** (sl. 3. 9.a).

U toku daljeg rasta sekundarnog folikula, između folikularnih ćelija se pojavljuje šupljina ispunjena tečnošću koja se brzo širi. Ova šupljina se naziva ***antrum,*** a tečnost koja je ispunjava ***liquor folliculi.*** Folikularna tečnost odvaja ćelije stratum granulosum od sloja ćelija koja oblaže oocitu – corona radiata. Sama oocita zauzima ekscentričan položaj i nalazi se u jednom izvratu folikularnih ćelija koja se naziva cumulus oophorus. Ovakva formacija nosi naziv tercijerni ili De Graafov folikul.

U toku rasta folikula primarna oocita sazreva. Konačasti bivalenti iz diktioten stadijuma se kondenzuju i skraćuju, hijazme se terminalizuju i procesi mejoze dalje teku na ranije opisani način. Posle prve mejotičke deobe nastupa ***ovulacija,*** folikul prska, a sekundarna oocita opkoljena ćelijama corona radiata se oslobađa i prelazi u ovidukt. Kada sekundarna oocita i primarna polocita pređu u ovidukt, nastupa druga mejotička deoba ekvaciona. Ekvaciona deoba se ne završava već ostaje na stadijumu metafaze do momenta oplođenja.

U ranim fazama razvoja folikuli su obično raspoređeni duboko u stromi ovarijuma. Kada počnu da se pune tečnošću, folikuli se postupno pomeraju prema površini i zapažaju se u vidu ispupčenja. Takav folikul je pripremljen za ovulaciju.

Biologija jajne ćelije sisara

Trajanje života i sposobnost oplođenja – dužina života neoplodjene jajne ćelije je uvek ograničena. Tako kod žena iznosi 24 časa (u uterusu) kada jajne ćelije počinju da se dezintegrišu. Sposobnost za oplodjenje jajne ćelije kod nekih sisara održava se do 30 časova, a u nekim slučajevima samo nekoliko časova. Kod kunića je utvrđeno da starenje jajnih ćelija pre oplođenja dovodi do povećanja smrtnosti embriona kao i do poremećaja pri implantaciji. Sa starenjem jajnih ćelija povećava se i procenat polisperije a takođe dolazi i do pojave hromosomskih aberacija.

Aktivnost oogeneze – u poređenju sa spermatogenezom, oogeneza je manjeg intenziteta. Za vreme reproduktivnog perioda žene npr. samo 450–520 oocita se diferencira u jajnu ćeliju, jer svakog meseca sazreva samo jedna jajna ćelija.

Atrezija folikula. Ranije je naglašeno da većina folikula u ovarijumu sisara nikad ne dostiže punu zrelost. Oni podležu degenerativnim promenama na različitim stadijumima razvića. Atrezija folikula je normalna pojava.

Inicijalni stadijumi mejoze u žena se pojavljuju u toku fetalnog života. Ispitivanjem gonocita u ovarijumima različite gestacione starosti pokazalo se da se oko 5. meseci gestacije broj oocita kreće oko 7 miliona, pa se zatim procesom atrezije, njihov broj smanjuje na 2 miliona do rođenja.

Detaljnijim posmtranjem ponašanja hromosoma u tom periodu utvrđeno je da se samo u 53, 6% oocita sa konstitucijom 46,XX odigrava normalan sinapsis između homologih hromosoma. U preostalim oocitima sa normalnim hromosomskim komplementom javljaju se poremećaji sinapsisa između homologih hromosoma, a može doći i do sinapsisa između nehomologih hromosoma.

Ove anomalije u formiranju sinapsisa u normalnim oocitima mogle bi biti važan uzrok atrezije folikula.

Seksualni ciklus

Oslobađanje i izlazak jajne ćelije sisara iz Grafovog folikula – ovulacija, praćeno je nizom složenih promena u polnim organima, endokrinom sistemu i seksualnom ponašanju ženki, koje omogućuju pripreme za proces oplođenja, prihvatanje i razvitak ploda.

Seksualna periodičnost, svojstvena većini životinjskih vrsta, kod ženki sisara je jače izražena, nego kod mužjaka. Kod jelena na primer, posle perioda intenzivne seksualne aktivnosti nastupa period prestanka spermatogeneze praćen polnim mirom. Kod drugih sisara, naročito kod Primata, tokom čitave polne zrelosti mužjak je polno aktivan. Polna aktivnost mužjaka, u najvećem broju slučajeva se poklapa sa jakim nagonom ženke za parenjem, u periodu ovulacije.

Ukoliko u trenutku ovulacije ne dođe do oplođenja, kod ženke nastupa period smanjivanja polnog nagona, povlačenja i smanjivanja svih fizioloških priprema za oplođenje. Nakon perioda seksualnog mira čitav organizam ženke se priprema za novu mogućnost oplođenja. Serija ovakvih cikličnih promena u organizmu ženke sisara naziva se estralni ciklus. Na osnovu anatomskih, histoloških i fizioloških ispitivanja utvrđene su pojedine faze estralnog ciklusa. Kratak period potpune pripremljenosti organizma ženke za oplođenje, praćen ovulacijom i jakom željom za parenjem, naziva se estrus. Ukoliko do oplođenja ne dođe, nastupa period regresije svih organskih priprema za oplođenje – metaestrus. Period seksualnog mira, posle metaestrusa, naziva se diestrus, nakon koga dolazi faza novih priprema za oplođenje – proestrus.

Pojava estralnog ciklusa je različita kod pojedinih vrsta sisara. Izvesni sisari, na primer, srna, kod kojih se estralni ciklus javlja jedanput godišnje, obično u periodu najpogodnijem za podizanje potomaka, nazivaju se monoestričnim. Sisari, koji imaju dva estralna ciklusa godišnje, na primer mačka, su diestrične, dok se sisari sa više estralnih ciklusa godišnje (čovek, glodari) nazivaju poliestričnim.

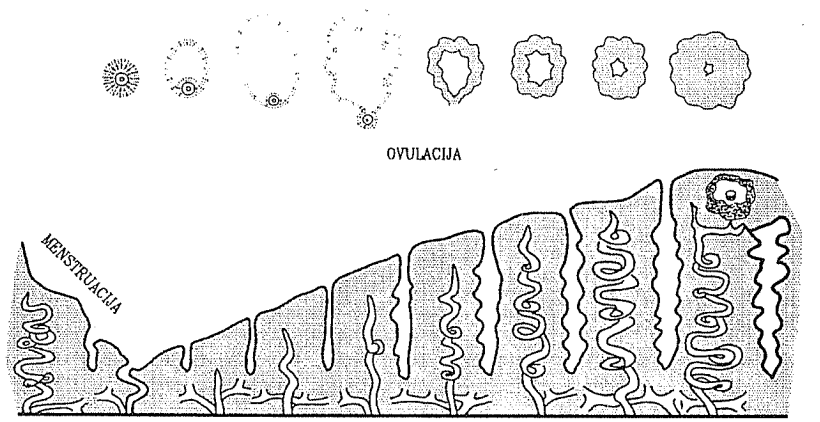
Na pojavu i tok estralnog ciklusa utiču mnogobrojni spoljašnji i unutrašnji faktori (klima, ishrana, dužina svetlosnog dana, obolenja). Predpostavlja se da su preci sisara pripadali poliestričnim organizmima, a da je monoestričnost i diestričnost sisara evoluciono nastala kao

posledica prilagođavanja nepovoljnim uslovima sredine i produženom trajanju embrionalnog razvoja.

U seksualnom ciklusu viših Primata i žene, povremeno se odstranjuju zadebljali slojevi zida uterusa, uz prskanje zidova kapilara i oslobađanja krvi – menstruacija. Kod žene menstruacioni ciklus počinje da se javlja između 13–15 godina života, pojavljuje se svakog 28 dana i traje do 30–50 godina života, kada prestaje – menopauza. Potrebno je naglasiti da postoje izrazite individualne razlike u pogledu godina života u kojima počinje i prestaje menstruacioni ciklus, dužine trajanja i obilnosti krvarenja.

Na osnovu morfo-fizioloških manifestacija, menstruacioni ciklus se može podeliti na tri karakteristične faze. Proliferativna faza nastupa neposredno posle menstruacionog krvarenja, u ovoj fazi, brojnim deobama ćelija bazalnog sloja epitela uterusa regenerišu zidovi materice. Nakon ovulacije, proliferacijom zida uterusa povećavaju i sazrevaju kompleksi žlezda uterusa, njihove se ćelije ispunjavaju sekretom, a krvni sudovi uterusa se granaju i dopiru do površine epitela. U toku svih ovih procesa, višestruko zadebljali zid uterusa je spreman za implantiranje i ishranu embriona. Ukoliko ne dođe do oplođenja ili do implantacije sekretorna faza se završava i nastupa ishemija površinskih slojeva uterusa, uz prskanje zidova kapilara i izlazak krvi sa uništenim i deskvamiranim površinskim slojevima i sekretom uterusa, menstruacioni procesi, koji postepeno zahvataju čitav zid uterusa (Sl. 3.10).

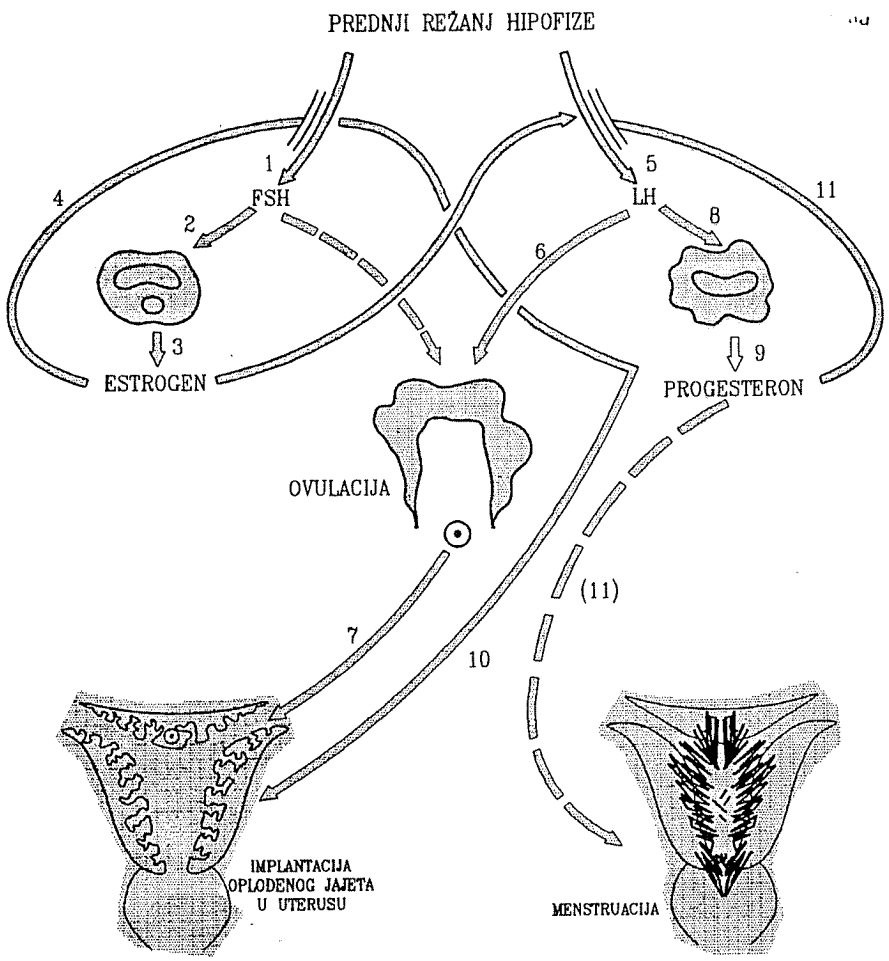
Seksualni ciklus ženki sisara je pod uticajem gonadotropnih hormona hipofize (GH), kao i neurohormona hipotalamusa koji uslovljavaju ciklične promene u gonadama polno zrelih jedinki. U ovaj proces uključeni su i hormoni ovarijuma estrogen i progesteron. Gonadotropni hormoni hipofize, folikulostimulirajući (F S H) i luteinizirajući (LH), izlučuju se pod dejstvom stimulirajućih hormona hipotalamusa. Rast folikula jajnika i sazrevanje jajnih ćelija u njima se vrši pod uticajem FSH i manjih količina LH. Uporedo sa razvojem folikula, u njemu se luči ženski polni hormon, estrogen koji stimuliše zadebljavanje zida uterusa. Najjače izlučivanje estrogena se poklapa sa momentom potpune fiziološke spremnosti jajne ćelije za izlazak iz folikula. Povećani nivo estrogena u krvi ženke deluje kao inhibitor na FSH-stimulativni centar u hipotalamusu, što izaziva smanjenje sekrecije FSH adenohipofize. Istovremeno povećani nivo estrogena u krvi stimuliše LH-stimula-



Slika 3.10. Proliferaciona faza i sekretorna faza

tivni centar hipotalamusa, što izaziva povećano lučenje LH prednjeg režnja hipofize. Kada se koncentracija LH u krvi dovoljno poveća a ovo povećanje je pod kontrolom cikličnog centra hipotalamusa nastupa prskanje folikula i oslobađanje zrele jajne ćelije – ovulacija. Nakon ovulacije, pod dejstvom luteinizirajućeg hormona (LH) uz sadejstvo izvesne koncentracije FSH, hipofize, ćelije prsnutog folikula proliferišu i formiraju grupu žućkastih ćelija sa razgranatom mrežom kapilara. Novonastala struktura se naziva žuto telo, corpus luteum koji pored estrogena, luči veće količine novog hormona-progesterona. Na lučenje polnih hormona u žutom telu, pretežno progesterona, utiče gonadotropni hormon prednjeg režnja hipofize, luteotropni (LTH). Ovaj hormon takođe aktivira mlečne žlezde da luče mleko, pa se zato naziva i prolaktin (sl. 3.11).

Dejstvom progesterona, zid uterusa se postepeno priprema za stvaranje svih uslova potrebnih za prijem, ishranu i razvoj embriona, a ujedno, inhibirajući F S H, onemogućuje sazrevanje i prskanje novih folikula u jajnicima sisara.



Slika 3.11

Ukoliko do oplođenja ne dođe, žuto telo se smanjuje i degeneriše. Pod uticajem F S H, počinje obrazovanje i sazrevanje novih folikula u kojima sazreva jajna ćelija.

Oplođenje

Kada se formiraju reproduktvne ćelije-gameti dolazi do spajanja ovih gameta-oplođenja, jer se gameti (sem u slučaju partenogeneze) ne mogu samostalno razvijati u novu jedinku. Spajanjem gameta nastaje oplođena jajna ćelija zigot, koji se složenim procesima razvija u novi organizam.

Oplođenje, fertilizacija, ili fekondacija, je proces spajanja muške i ženske polne ćelije. Od momenta dodira polnih ćelija, do formiranja definitivnog zajedničkog jedra, nastupa niz složenih pojava. Međutim, mogu se istaći tri posebna značajna momenta u toku oplođenja: to su ***aktivacija spermatozoida, kortikalna reakcija jajne ćelije*** (aktivacija jajne ćelije) i ***spajanje jedara polnih ćelija*** (pronukleusa), pri čemu dolazi do kombinacije naslednih faktora roditelja – ***amphimixis.***

Spermatozoid dodiruje primarnu opnu jajeta prednjim delom glave, akrosomom, ovo izaziva ***akrosomsku reakciju.***

Akrosomska reakcija se sastoji u oslobađanju sadržaja akrosomske vezikule i izduživanju akrosoma u obliku tubule. Vrh akrosomske tubule se spaja sa primarnom opnom jajne ćelije. Prodiranje spermatozoida u jajnu ćeliju omogućuje jedan litički enzim ili enzimi koje oslobađa akrosomska vezikula.

Dodir spermatozoida i jajne ćelije izaziva kortikalnu reakciju u delu jajne ćelije ispod primarne opne – cortexu. Ovaj deo sadrži krupne vakuole ispunjene glikoproteinskim granulama. Na mestu dodira spermatozoida i jajne ćelije počinje prskanje vakuola. Oslobađanjem sadržaja kortikalnih vakuola ispod vitelinske opne razara se ćelijska membrana i stvara se jedan prostor ispunjen tečnošću – ***perivitelinski prostor.*** Ovaj prostor odvaja vitelinsku opnu na površini koja sada predstavlja oplodnu, fertilizacionu opnu a ispod ovog prostora obrazuje se nova plazmatična membrana jajne ćelije, verovatno ugrađivanjem fragmenata membrane koja je oblagala kortikalne vakuole. Fertilizaciona opna se formira istog momenta kada prvi spermatozoid dodirne površinu jajne ćelije i sprečava ulazak većeg broja spermatozoida u jaje – monospermija.

Na mestu dodira spermatozoida i citoplazme jajne ćelije stvara se ispupčenje na površini jajeta – ***atraktivni konus,*** pomoću koga se glava i vrat spermatozoida pasivno uvlače u jajnu ćeliju. Bič spermatozoida može da ostane van jajne ćelije, ili u atraktivnom konusu, a kod nekih životinjskih vrsta (sisari) i bič spermatozoida prodire u citoplazmu. Atraktivni konus uvlači spermatozoid u dublje slojeve citoplazme. Put kretanja spermatozoida kroz citoplazmu jajeta naziva se *staza ulaska* u citoplazmu. Najverovatnije pod uticajem strujanja citoplazme jajne ćelije, spermatozoid se okreće za 180 i zauzima položaj u kome se vrat sa centrosom nalazi ispred glave. Oko centrosoma se formiraju zrakasto poređane niti, koje obrazuju aster, za koga se predpostavlja da privlači jedro jajne ćelije, ženski pronukleus, koji počinje da se kreće u pravcu muškog pronukleusa. Put pronukleusa, u toku međusobnog približavanja naziva se staza kopulacije. U daljem procesu, centrosom spermatozoida se deli, formiraju se dva astera, pronukleusi gube svoje membrane, hromosomi se međusobno mešaju i izgrađuje se jedro sa diploidnim brojem hromosoma. Sinteza DNK se vrši nekoliko časova posle oplođenja. Period sinteze traje kratko. Spajanje muškog i ženskog pro-

nukleusa naziva se amphimixix, a novonastalo jedro amphinucleus Između dva astera stvara se deobno vreteno u čijem se ekvatoru postavljaju hromosomi amfinukleusa. Položaj deobnog vretena određuje pravac prve deobe zigota i naziva se staza segmentacije. Jajna ćelija ne poseduje centrosom, tako da su centrosom i deobno vreteno zigota derivati spermatozoida (sl. 3.12).

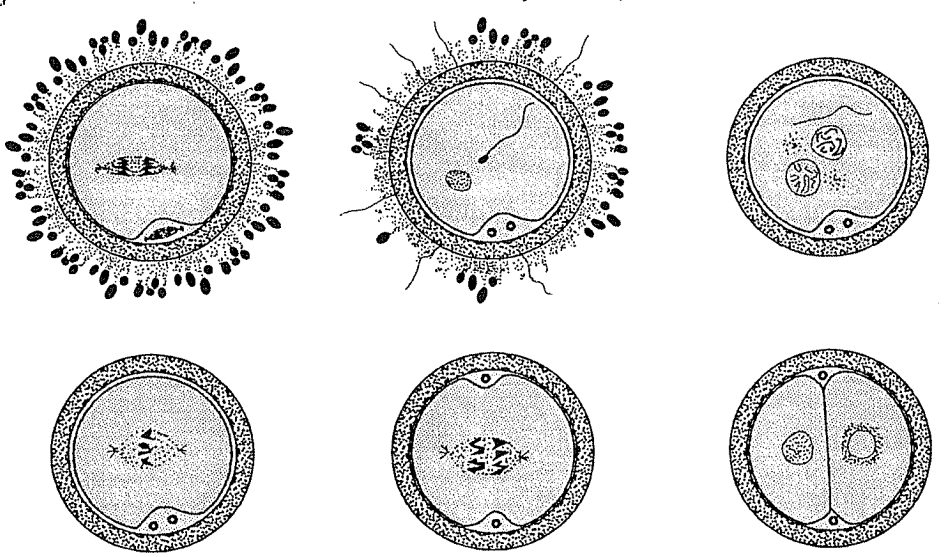
Proces oplođenja je praćen nizom promena u jajetu, cirkulacijom i preraspodelom materijala citoplazme. Pri aktivaciji jajne ćelije uvećava se stupanj disperzije koloida. Viskozitet protoplazme se znatno povećava posle oplođenja, a menja se i propustljivost ćelije, koja je u vezi sa koloidnim promenama u kortikalnom sloju jajne ćelije. Promena propustljivosti ima veoma važnu ulogu u regulisanju razmene materija između jajnih ćelija i okolne sredine. U nekim jajnim ćelijama (morski jež) aktivacija spermatozoida dovodi do intenzivnijih oksidacionih procesa u ćeliji što je praćeno povećanjem proizvodnje toplote u jajetu.

Oplođenje kod sisara

Oplođenje je unutrašnje i vrši se u polnim odvodima ženke, tj. proksimalnom delu Milerovog kanala. U malog broja sisara oplođenje se vrši u ovarijumu. Pristizanje spermatozoida na mesto oplođenja vrši se za oko 15 minuta u pacova, miša, psa, a za oko 1 – 4 časa u kunića.

Da bi došlo do oplođenja jajna ćelija i spermatozoid moraju biti sposobni za oplođenje, što znači da mora da postoji tačna sinhronizacija između kopulacije i ovulacije, kao što je slučaj u većine sisara, ili se kopulacija mora vršiti češće da bi se obezbedilo prisustvo vijabilnih spermatozoida u vreme ovulacije (npr. neki Primata i čovek).

Transport spermatozoida do mesta oplođenja pored pokretljivosti samog spermatozoida, može biti potpomognut cilijama i kontrakcijama ženskog polnog trakta, naročito kontrakcijama mišića uterusa. Semena tečnost sadrži grupu vrlo potentnih agenasa prostaglandina, koje stvaraju vesicule seminalis mužjaka,



Slika 3.12

a ovi povećavaju pokretljivost uterusa u vreme ovulacije i olakšavaju transport spermatozoida iz vagine u uterus.

Velika većina spermatozoida nikada ne dospe u ovidukt. Od mnogo miliona spermatozoida u jednom ejakulatu čoveka, samo nekoliko hiljada prolaze kroz uterus, kod kunića 500 – 1000, kod pacova 12 – 43, a obično samo jedan ulazi u jajnu ćeliju.

Ako spermatozoid sisara dospe u blizinu mesta oplođenja neposredno pred ovulaciju, on još nije sposoban za oplođenje. Spermatozoidi moraju provesti izvesno vreme u polnim odvodima ženke, kada nastupaju značajne promene u nivou akrosoma, koje osposobljavaju spermatozoid za prodiranje u jajnu ćeliju. Ovaj proces naziva se ***kapacitacija*** ili ***maturacija.***

Eksperimentalnim putem je dokazano da je za spermatozoide kunića potrebno oko 4 časa, a za spermatozoide pacova oko 2 časa, da provedu u polnim odvodima ženke pre ovulacije. Prēdpostavlja se da ženski polni odvodi luče jednu supstancu, koja deluje na akrosom spermatozoida.

Posle ovulacije u ženskim polnim odvodima se luče dve supstance sa antagonističkim dejstvom: a. ***Fertilizin,*** produkuje ga oocita, ova supstanca odbija spermatozoide koji nisu prošli kroz proces maturacije; i d. ***Antifertilizin,*** koji stvaraju polni odvodi ženke, ubrzo posle lučenja fertilizina. Antifertilizin koči dejstvo fertilizina.

Kada dođe do kontakta spermatozoida sa jajnom ćelijom posle maturacije akrosom spermatozoida luči dva enzima: a) ***Hijalorunidazu,*** koji razlaže mukopolisaharide sastavljene od polimera hijaluronske kiseline, koji povezuju ćelije corona radiata oko oocite, što obezbeđuje prolaz kroz ovu membranu; b) ***Spermolizin,*** razlaže zonu pelucidu i omogućuje prolaz spermatozoida u oocitu. Posle ulaska spermatozoida završava se druga mejotička deoba.

Biološki značaj oplođenja se sastoji u spajanju gameta, sa različitom naslednom osnovom, što obezbeđuje najrazličitije kombinacije roditeljskih svojstava u potomstvu.

Modifikacija procesa oplođenja

Polispermija. U jajnu ćeliju ulazi jedan spermatozoid prilikom oplođenja – monospermija. Promena u kortikalnom sloju i pojava fertilizacione opne sprečavaju prodiranje većeg broja spermatozoida u jajnu ćeliju. U monospermičnih vrsta ulazak većeg broja spermatozoida – polispermija – dovodi do uništenja jajne ćelije. U nekih kičmenjaka, kao što su izvesne ribe, amfibi, reptili i ptice, polispermija predstavlja normalnu pojavu. Međutim, i u slučaju polispermije, samo jedan spermatozoid se spaja sa ženskim pronukleusom, a ostali se dezintegrišu.

Partenogeneza. U nekih organizama se često događa da se ne sretnu odgovarajući gameti suprotnog pola. Većina takvih gameta propada, ali u izuzetnim slučajevima pojedini gameti mogu da se razvijaju u novi organizam. Ovaj fenomen je poznat kao partenogeneza i označava razviće gameta bez oplođenja .

Androgeneza i partenogeneza kod čoveka

U procesu gametogeneze i oplođenja mogu da se odigraju neuobičajeni procesi, koji dovode do formiranja diploidnog "zigoida" sa oba genoma poreklom od jednog roditelja.

Jedan proces je označen kao androgeneza i prouzrokuje kompletne hidatidiformne mole. Više od 90% mola ima 46,XX kariotip, a mali broj ima 46 XY kariotip. Na osnovu genetičkih markera

utvrđeno je da je gonozomna konstitucija uvek poreklom od oca. Mole sa XX konstitucijom nastaju oplođenjem ootida bez funkcionalnog jedra haploidnim spermatozoidom, što je praćeno duplikacijom genoma ili se "prazna" ootida oplodi sa dva haploidna spermatozoida koji se fuzionišu. Prve mole su homozigotne, a druge heterozigotne, zbog heterozigotnosti određenog broja njihovih gena.

Partenogeneza kod čoveka rezultira ovaraijalnim teratomima. Teratomi mogu nastati iz premejotskih ćelija ili usled poremećaja u mejozi I, a mogu nastati i zbog greške u mejozi II ili duplikacijom haploidne ootide.

4

Aberacije hromosoma

UVOD

Godine 1956, švedski istraživači Tjio i Levan su utvrdili da se hromosomski komplement čoveka sastoji od 46 hromosoma i zato se ova godina može smatrati početkom moderne humane citogenetike. Vrlo brzo tehnike za identifikaciju hromosoma nalaze primenu u kliničkoj praksi. Naime, francuski lekar i eminentni genetičar Lejeune sa saradnicima 1959. god. otkriva da se u ćelijama pacijenata sa Downovim sindromom nalazi jedan hromosom više, i on je kasnije određen kao hromosom 21.

Iste godine Jacobs i saradnici pronalaze tri X hromosoma u žene sa lakim mentalnim poremećajem i XXY konstituciju u osoba sa Klinefelterovim sindromom, a Ford sa sar. otkriva nedostatak jednog X hromosoma u pacijenata sa Turnerovim sindromom. Tri godine kasnije Penrose i Dunhalty utvrđuju hromosomske aberacije i u tkivima spontano abortiranih fetusa, a danas se procenjuje da čak 50% blastocista čoveka ima abnormalnu hromosomsku konstituciju i da od toga 99% ne preživi intrauterini period razvića. Približno 5-7% prepoznatljivih trudnoća je sa hromosomskom aberacijom, a veliki broj hromosomskih aberacija nađenih u tkivima spontano abortiranih fetusa nikada se ne pojavljuje u živorođenoj populaciji. Ipak, prema zbirnim podacima iz velikog broja citogenetičkih laboratorija, na svakih 160 novorođenčadi rađa se jedno sa hromosomskom anomalijom.

Još 1934. god. znatno pre nego što se znao tačan broj hromosoma čoveka, nekoliko istraživača je ukazalo na promene hromosoma u ćelijama tumora pacova i čoveka. Tek najnovija istraživanja poslednjih godina su otkrila specifične hromosomske anomalije u različitim tumorima čoveka.

Posle svih ovih saznanja postaje jasno da su mnoge bolesti čoveka povezane sa specifičnim abnormalnostima hromosoma, pa humana citogenetika postaje kamen temeljac u razumevanju funkcije gena i odnosa između funkcije i strukturne organizacije genetičkog materijala.

Održavanje integriteta genoma je od vitalnog značaja za održavanje normalnih funkcija i preživljavanje jednog organizma.

U genomu čoveka, kao i u ostalih organizama, pojavljuju se vidljive promene označene kao ***mutacije*** ili ***aberacije hromosoma.***

Hromosomske promene mogu obuhvatiti cele setove hromosoma, pojedinačne hromosome ili delove hromosoma, pa razlikujemo: ***numeričke aberacije*** – pro-

mene broja hromosoma – i *strukturne aberacije* – promene strukture hromosoma.

NUMERIČKE ABERACIJE HROMOSOMA

Postoje dve grupe numeričkih aberacija u čoveka: *poliploidije* i *aneuploidije.*

Poliploidija označava povećanje celog seta hromosoma ili, tačnije, umnožavanje kompletnog haploidnog seta (3n, 4n itd.). Za čoveka su karakteristične triploidija – 3n = 69 (sl. 4.1) hromosoma i tetraploidija 4n = 92 hromosoma.

Triploidija može nastati različitim citološkim mehanizmima: a) poremećajem mitoze u gonijama, odnosno pojavom endoreduplikacije u njima, b) poremećajem I ili II deobe mejoze – oba mehanizma dovode do pojave diploidnih gameta, i c) dispermijom, oplođenjem sa dva spermatozoida, što je, prema najnovijim podacima, najčešći uzrok triploidije u čoveka.

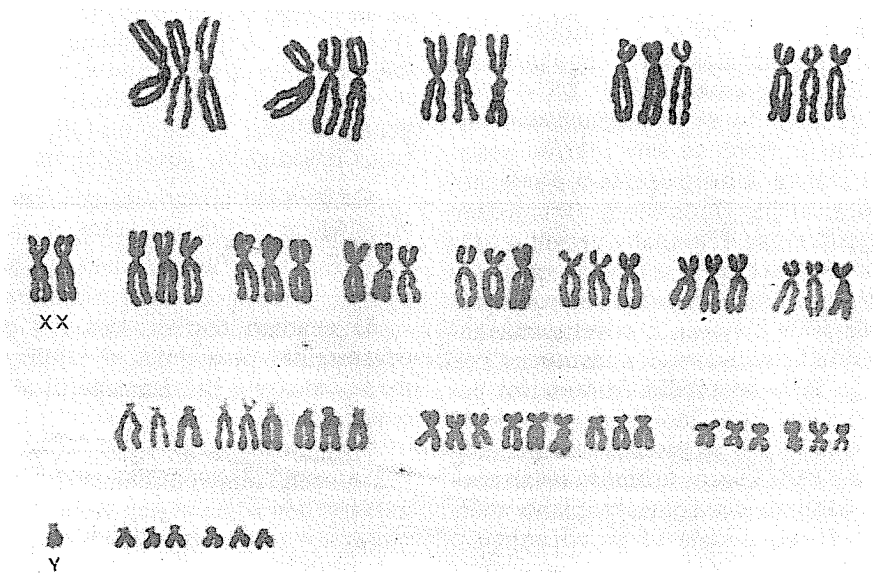
Tetraploidija nastaje uglavnom u postzigotnom stadijumu, supresijom deobe zigota, kada su hromosomi udvojeni, a izostane deoba citoplazme.

Ne može se isključiti ni mogućnost oplođenja sa tri spermatozoida. Za razliku od drugih organizama, naročito biljnih, poliploidija je štetna za čoveka, uglavnom je letalna. Zašto su poliploidije tako štetne za čoveka?

Jedan od mogućih činilaca je nesklad između broja hromosoma majčinog i fetalnog dela placente. Ova mogućnost je potkrepljena činjenicom da je u triploidnih fetusa horion često abnormalan i pokazuje hidatidiformne promene. (Hidatidiformna mola nastaje nenormalnim rastom horiona.)

Nužno je napomenuti da poliploidija u čoveka može biti i normalna pojava, prisutna samo u delu ćelija nekih tkiva, npr. u tkivu placente, zatim u jetri u toku regeneracije ovog organa i drugim tkivima, gde nastaje procesom endomitoze.

U ovim tkivima i ćelijama poliploidija verovatno predstavlja zaštitnu adaptaciju na česte promene genoma, naročito na pojavu strukturnih aberacija, koje se jav-



Slika 4.1 – Triploidija, 69 hromosoma.

ljaju u ćelijama jetre i nekim drugim tkivima sisara.

Aneuploidija

Ranije je naglašeno da se u diploidnoj hromosomskoj garnituri čoveka (2n) hromosomi nalaze u parovima, koji su označeni kao homologi hromosomi. Promene u pojedinačnim parovima hromosoma označene su kao aneuploidije i nastaju usled grešaka u mejozi i mitozi, koje se zajedničkim imenom nazivaju ***nerazdvajanje hromosoma*** (nondisjunction).

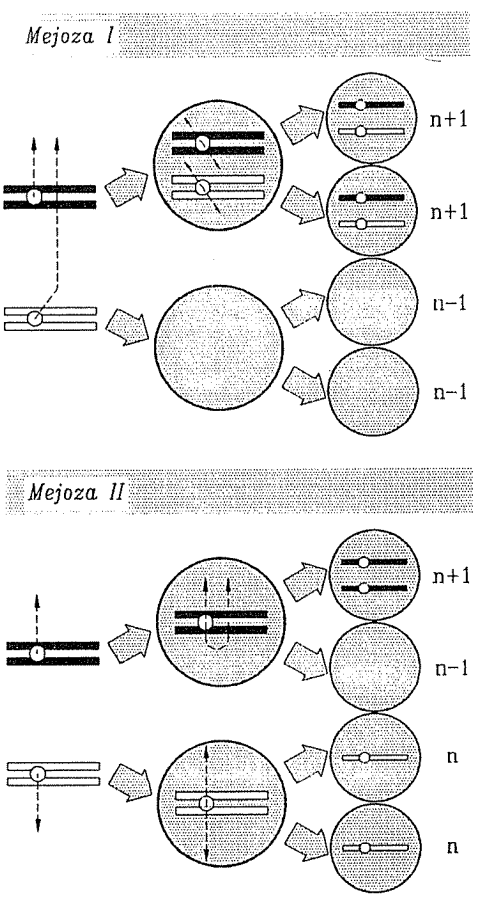
Poremećaj u razdvajanju homologih hromosoma u anafazi prve deobe mejoze može nastati zbog *asinapsisa* ili *desinapsisa.* Asinapsis je pojava kada dva homologa hromosoma ne konjugiraju i ne formiraju hijazme, a desinapsis nastaje kada se sinaptički kompleks ili hijazme razdvajaju pre vremena. Posledica oba ova mehanizma je da dva homologa hromosoma ulaze u metafaznu ploču kao ***univalenti,*** pa se njihove centomere mogu orijentisati prema istom polu segmentacionog vretena, što će dovesti do formiranja aneuploidnih gameta (sl. 4.2). Nerazdvajanje hromosoma može nastati i zbog nepravilnog funkcionisanja segmentacionog vretena, izazvanog fiziološkim faktorima, koji utiču na polimerizaciju i organizaciju mikrotubula. Ovi faktori najverovatnije deluju i na segmentaciono vreteno somatskih ćelija, o čemu svedoči pojava aneuploidije u nekim somatskim ćelijama osoba koje su podložne mejoznom neodvajanju.

Zaostajanje hromosoma u kretanju u anafazi takođe može biti uzrok aneuploidija.

Pretpostavlja se da bi nerazdvajanje hromosoma u striktnom smislu moglo nastati zbog razlike u veličini heterohromatičnih regiona, koja je karakteristična za hromosome sa velikim blokovima heterohromatina u centromernom regionu, kao što su hromosomi 1, 9, 16, i dvostrukim NOR-ovima akrocentričnih hromosoma. Razlika u veličini ovih segmenata mogla bi poremetiti normalno razdvajanje homologih parova.

Neodvajanje hromosoma se može odigrati i u II deobi mejoze (sl. 4.2) mada dosadašnja ispitivanja porekla dodatnog hromosoma u trisomijama ukazuju da je neodvajanje hromosoma najčešće u I deobi mejoze i uglavnom se dešava u mejozi majke (oogenezi).

Nerazdvajanjem hromosoma nastaju ***disomični*** i ***nulisomični*** gameti. Gameti sa abnormalnom hromosomskom konstitucijom su vijabilni i mogu da učestvuju u



Slika 4.2 – Nerazdvajanje hromosoma u I i II deobi mejoze.

oplođenju. Jajne ćelije sa aberantnom hromosomskom konstitucijom su vijabilne, zato što je njihov samostalan život kratak, od ovulacije do oplođenja, a spermatozoidi zato što im je ceo genom kondenzovan i ne vrši nikakve sintetske funkcije. Kada se aberantni gameti spoje sa normalnim gametima suprotnog pola, nastaju *trisomični* (2n + 1) i *monosomični* (2n - 1) zigoti.

Znatno ređe do nerazdvajanja hromosoma dolazi i u I i u II deobi mejoze. Kao posledica dvostruke greške pojavljuje se više tipova gameta sa različitom aberantnom hromosomskom konstitucijom, ali i sa normalnim komplementom. Oplođenjem trisomični i tetrasomični gameti daju *polisomične* zigote.

Do sada su otkivene samo *polisomije* polnih hromosoma u živorođenim humanim populacijama.

Nerazdvajanje hromosoma u I ili II deobi mejoze naziva se *primarnim nerazdvajanjem.*

U retkim slučajevima, kada su osobe sa aberantnim kariotipom fertilne (npr. 47,XX + 21 ili 47, XXX), njihove gonije su trisomične i u procesu mejoze obično se formiraju *trivalenti* ili *bivalenti* i *univalenti.* U toku razdvajanja hromosoma u anafazi I dva hromosoma migriraju prema jednom polu, a jedan prema drugom polu ćelije, pa nastaju disomični ili normalni gameti. Ovo je označeno kao *sekundarno nerazdvajanje.* Na osnovu podataka iz literature odnos trisomičnih i normalnih potomaka majki sa trisomijom 21 je približno 30 : 70%. S obzirom na izraženu mentalnu retardaciju povezanu sa trisomijom hromosoma 21, mali broj ovih osoba ostavlja potomstvo. Međutim, u majki sa trisomijom X hromosoma taj odnos je još više poremećen u korist dece sa normalnim kariotipom, što ukazuje da postoje biološki mehanizmi koji ovo obezbeđuju. Jedan od mogućih mehanizama je da bivalent češće odlazi u polocitu u anafazi I mejoze, pa ootida dobije normalan hromosomski komplement.

Miksoploidija – mozaicizam

Mozaicizam podrazumeva pojavu u organizmu dve ili više ćelijskih linija, sa različitim hromosomskim komplementom poreklom od istog zigota.

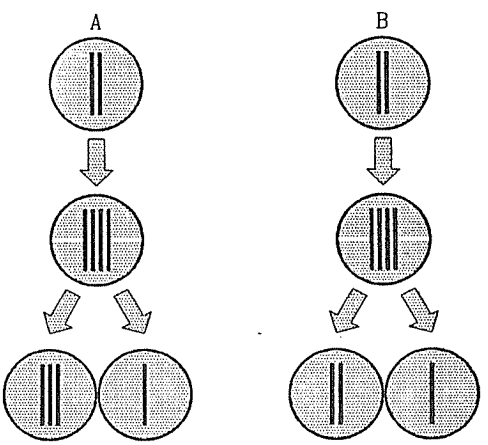
Mozaicizam nastaje usled grešaka u mitozi u postzigotnom stadijumu, bilo nerazdvajanjem hromatida (sl. 4.3A) ili zaostajanjem hromosoma u anafazi. (sl 4.3B).

Neodvajanje hromosoma u zigotu rezultira pojavom dve ćelijske linije sa različitim hromosomskim konstitucijama. Može se pojaviti i više od dve ćelijske linije zavisno od stadijuma embriogeneze u kome je nastala greška.

Ako greška u mitozi nastane u ranom stadijumu organogeneze, kada u embrionu nema više od nekoliko stotina ćelija, mozaicizam se može utvrditi ispitivanjem samo jednog tkiva.

Ako greška u mitozi nastupi kasnije u fetalnom razviću, tada mozaicizam može ostati neotkriven ako se ispituje samo jedno tkivo.

Ćelijska linija sa monosomijom autosoma uglavnom završava letalno, a mo-



Slika 4.3 – Miksoploidija – hromosomski mozaik.

zaicizam, kada se otkrije, najčešće se sastoji od jedne normalne i jedne trisomične ćelijske linije (46/47 hromosoma). Međutim, postoje i mnogo složeniji mozaični kariotipovi koji su karakteristični samo za polne hromosome.

U mozaicizmu odnos modalnog i nemodalnog broja hromosoma varira od tkiva do tkiva ili jedno tkivo može imati samo normalan hromosomski komplement (46,XX ili 46,XY), a u drugom se pojavljuje aberantna ćelijska linija. Na primer, u limfocitima periferne krvi je normalan kariotip, a u fibroblastima kože hromosomski mozaik.

Fenotipski efekti mozaicizma zavise od zastupljenosti i rasporeda normalne i aberantne ćelijske linije. Ako je aberantna hromosomska konstitucija samo neznatno zastupljena, tada i ne dovodi do vidljivih fenotipskih manifestacija.

Proliferativna miksoploidija – nastaje posle embrionalnog razvića, posledica je poremećene mitoze u toku procesa starenja ili se sreće u neoplazmama.

Etiologija aneuploidija

Uzroci neodvajanja hromosoma u mejozi i mitozi mogu biti sredinski i genetički, što potvrđuju brojni eksperimenti na biljkama i životinjama.

Sve više se obraća pažnja na jonizujuće zračenje, mnoge hemijske supstance i virusne infekcije koji bi mogli dovesti do nepravilne segregacije hromosoma u mejozi i mitozi.

Autoimune bolesti, izgleda, imaju izvesnu ulogu u neodvajanju hromosoma. Zapažena je korelacija između visokog nivoa antitireoidnih antitela u majki i trisomije hromosoma 21 u njihove dece.

Jedini siguran uzrok neodvajanja hromosoma čoveka je starost majke. Na primer, rizik rađanja dece sa trisomijom 21 je 1/1920 novorođenčadi u majki starih 20 godina, dok je u majki preko 45 godina rizik znatno veći i iznosi 1/46 novorođenčadi. Sličan efekat starosti majke se zapaža i u drugim trisomijama 18, 13, XXX, XXY i dr.

Spontani abortusi prouzrokovani aneuploidijama hromosoma su takođe češći u starijih majki.

Ranije je naglašeno da se neodvajanje hromosoma češće događa u I deobi mejoze u oba pola i da broj hijazmi u mejozi ima značaja u procesu segregacije hromosoma.

U starijih majki češće je neodvajanje hromosoma sa malim brojem hijazmi, a i oocite koje nastavljaju sazrevanje kasnije imaju manji ukupan broj hijazmi nego one koje sazrevaju ranije, što povećava broj univalenata sa posledičnim greškama u segregaciji hromosoma. Poremećaj endokrine kontrole funkcije ovarijuma može biti uzrok aneuploidije.

Najnovija istraživanja su pokazala da starost oca nema značajnijeg uticaja na neodvajanje hromosoma.

Genetički uzroci neodvajanja

Poznato je da se u hromosomskom komplementu čoveka može naći više od jedne aneuploidije. Na primer, trisomija 21 sa gonosomnom trisomijom XXX ili XXY, ili sa X0 konstitucijom. Opisani su i drugi tipovi dvostrukih aneuploidija, koje se znatno ređe nalaze u kariotipu čoveka. U pri'og genetičkih uzroka aneuploidije govore i porodice sa više dece sa istim ili različitim aneuploidijama ili sa ponovljenim aneuploidnim spontanim pobačajima. Njihovi roditelji ili imaju normalan kariotip ili je jedan od roditelja nosilac diskretne aberantne ćelijske linije koja ne utiče na njegov fenotip.

Za ovakve osobe pretpostavljamo da imaju predispoziciju za neodvajanje hromosoma.

U nekim porodicama izgleda postoji predispozicija za neblagovremenu (vanfaznu) podelu centromera hromosoma. Pri kraju metafaze mitoze centromere hromosoma dele se verovatno genetički kontrolisanim redosledom. Na primer, centromera hromosoma 18 deli se rano, a centromera hromosoma 21 kasno. Postoje podaci da u nekih roditelja dece sa trisomijom 18 dolazi do kasne deobe centromere ovog hromosoma, a u nekih roditelja dece sa trisomijom 21, zapažena je rana deoba centromere hromosoma 21. Ova vanfazna deoba centromera mogla bi biti jedan od uzroka nepravilne segregacije hromosoma i pojave aneuploidije u potomstvu.

STRUKTURNE ABERACIJE HROMOSOMA

Ovaj tip aberacija je posledica prekida i poremećaja linearnog kontinuiteta hromosoma. Prekidi se ponekad javljaju spontano, ali mogu biti i indukovani različitim mutagenim agensima. Ova činjenica ima izuzetan značaj, jer su humane populacije danas izložene biološkim, fizičkim i skoro nebrojenim hemijskim mutagenima.

Hromosomi se mogu prekidati na bilo kom stadijumu ćelijskog ciklusa G_1, S i G_2 fazi interfaze u toku mitoze ili mejoze.

Različiti tipovi ćelija i ćelijskih stadijuma pokazuju vrlo različite odgovore na agense koji vrše prekide na hromosomima.

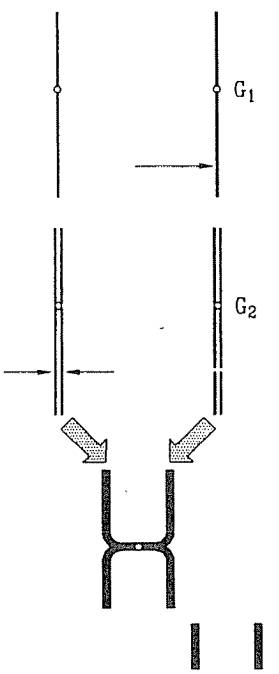
Ako se prekid dogodi u G_1 fazi interfaze, kada se hromosom sastoji samo od jedne hromatide, označen je kao ***hromosomski prekid.*** Ako prekid nastane u G_2 fazi samo u jednoj hromatidi, to je ***hromatidni prekid,*** a ako prekid zahvati obe hromatide u istom lokusu, nastane izohromatidni prekid (sl. 4.4).

Bar tri različita sistema popravke mogu biti uključena u spajanje prekinutih delova hromosoma. Ako ne dođe do popravke, prekinuti deo bez centromere se gubi u narednim deobama, a ako je više od jednog prekida u ćeliji, nastaju strukturni preraspoređi hromosoma koji mogu biti ***intrahromosomski,*** kada se proces odigrava u jednom hromosomu i ***interhromosomski,*** kada se preraspoređi vrše između dva ili više hromosoma.

Za razliku od normalnih krajeva hromosoma (telomera), prekinuti delovi imaju hemijski afinitet za međusobno spajanje. Da bi se dva prekinuta hromosoma spojila, treba da budu blizu jedan drugog. Vreme za povezivanje prekinutih delova hromosoma (preraspored) je ograničeno.

Razlikujemo četiri osnovna tipa strukturnih aberacija hromosoma:

a) delecije, b) duplikacije, c) inverzije i d) translokacije



Slika 4.4 – Hromosomski i hromatidni prekidi

Uzroci prekida hromosoma

Spontani prekidi i prerasporedi hromosoma se javljaju u malom broju ćelija svakog čoveka. Njihova učestalost varira od osobe do osobe, a u proseku se sreću u oko 0,8% ćelija. Očigledno je da genotip svake individue određuje osnovni nivo aberacija. Određeni hromosomi kao što su X, 2, 10, 11, 12, 17, 20, a naročito 16q imaju osetljiva mesta, koja su podložna prekidima. Na primer, takvo osetljivo mesto na 2q je dovelo do toga da su dva hromosoma ancestora Primata posle prekida spojena u jedan hromosom, hromosom 2 čoveka.

Indukovani prekidi i prerasporedi

Različiti tipovi jonizujućeg zračenja kao i ultravioletno zračenje, predstavljaju snažne agense koji vrše prekide na hromosomima. Jonizujuće zračenje kao mutageni agens je deo prirodne sredine čoveka i u širokoj je upotrebi u medicini i industriji, kao i potencijalno snažan mutageni faktor u ratu. Posle prestanka zračenja učestalost aberacija se tokom vremena smanjuje, ali se znatan deo iznad spontanog nivoa zadržava godinama posle dejstva zračenja.

Korišćenjem kratkotrajne kulture limfocita periferne krvi može se ispitivati mutageni efekat zračenja u osoba koje su izložene ovom agensu. Strukturne hromosomske aberacije i razmena sestara hromatida služe kao indikatori genotoksičnosti u ovih osoba. Jonizujuće zračenje dovodi do hromosomskih prekida na svim stadijumima mitoze ili u mejozi, mada postoji diferencijalna osetljivost različitih faza u različitih organizama.

Pojava prekida se linearno povećava sa povećanjem doze zračenja.

Mnoga istraživanja su posvećena objašnjavanju mehanizama nastajanja aberacija pod dejstvom radijacije. Predložena je jedna teorija, po kojoj direktan pogodak hromosoma rezultira prekidom – *target teorija.*

Druga teorija je označena kao *hemijska,* koja pojavu prekida objašnjava posrednim putem; radijacije indukuju pojavu različitih supstancija i radikala u ćeliji koji su snažni *klastogeni* i vrše prekide na hromosomima.

Prekidi indukovani hemijskim supstancijama

Do sada je utvrđen veliki broj supstancija koje prekidaju hromosome, a ta lista se svakodnevno povećava. To su alkilirajući agensi, analozi nukleinskih kiselina, purini, antibiotici, azotna jedinjenja i dr. Ove supstancije se zbog svog klastogenog dejstva često nazivaju radiomimeticima. Većina hemijskih supstancija vrši prekide u G_2 fazi interfaze.

Prekidi hromosoma indukovani virusima

Odnedavno je poznato da i virusi mogu indukovati prekide na hromosomima, ali se još uvek malo zna o interakciji između virusa i hromosoma koja uslovljava prekide na hromosomima. U akutnim virusnim infekcijama se zapažaju različita oštećenja hromosoma koja variraju od hromosomskih i hromatidnih prekida do prerasporeda i kompletne pulverizacije hromosomskog komplementa.

Genetički uzroci prekida hromosoma

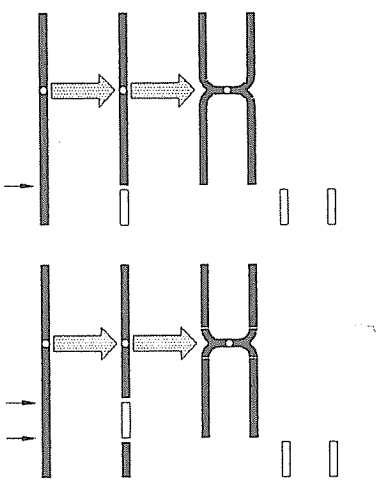
U ranijem tekstu je naglašeno da različite osobe imaju različitu stopu spontanih hromosomskih prekida. Do sada je dobro definisano nekoliko sindroma kao što su Fanconijeva anemija, Bloomov sindrom i dr., koji se odlikuju naslednom nestabilnošću hromosoma. Ove osobe su podložne malignoj transformaciji. Mnogi interspecijski hibridi pokazuju širok ras-

pon hromosomskih aberacija u njihovim somatskim ćelijama.

Hromosomski prekidi se ne javljaju slučajno u hromosomima čoveka. Tehnike traka su otkrile da su prekidi skoro uvek u euhromatičnim regionima (Q-tamne i G-svetle trake). Nije jasno da li se prekidi prvenstveno javljaju u ovim segmentima ili je u pitanju različit sistem popravki oštećenja hromosoma. Treba napomenuti da različiti mutageni agensi vrše prekide na različitim mestima u hromosomima. Na primer, u čoveka mitomicin C indukuje prekide poglavito u heterohromatinu hromosoma 1, 9, 16 i oblasti NOR-ova u akrocentricima.

Delecija ili parcijalna monosomija

Delecije se mogu svrstati u dve grupe: *čiste delecije* – koje su posledica prekida na hromosomu i gubitka prekinutog dela bez centromere. Centromera je neophodna za povezivanje hromosoma sa mikrotubulama deobnog vretena i kretanje hromosoma ka suprotnim polovima ćelije u deobi. Ako se na hromosomu pojavi samo jedan prekid, takva delecija je *terminalna,* a ako se u nivou jednog kraka dogode dva prekida, pa se deo hromosoma između prekida izgubi, delecija je *intersticijalna* (sl. 4.5).



Slika 4.5 – Terminalna i intersticijalna delecija

Druga grupa delecija predstavlja kombinaciju sa duplikacijama i nastaje usled balansiranih strukturnih prerasporeda u roditelja, inverzija i translokacija. Delecije su u suštini *parcijalne monosomije.*

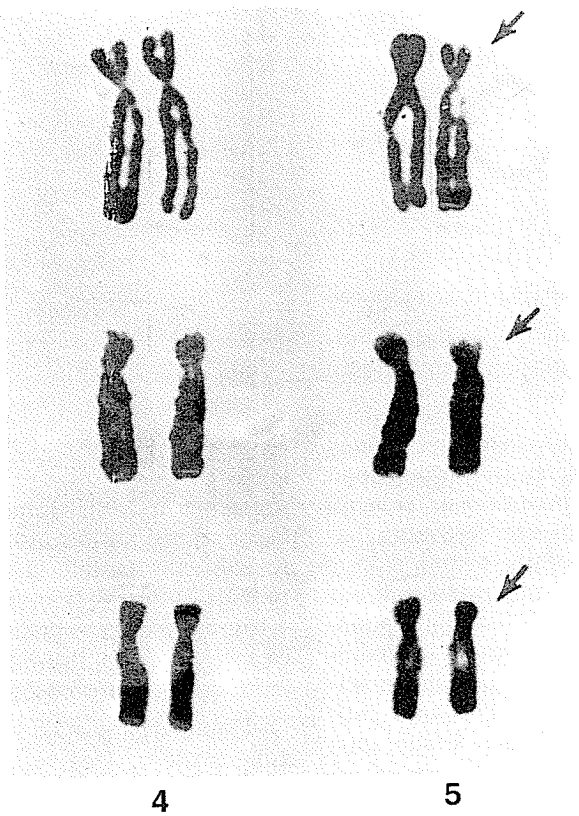
Delecije autosoma su uvek štetne. U homozigotnom stanju su letalne, jer je većina regiona hromosoma neophodna za normalan vijabilitet jedinke. Delecije u heterozigotnom stanju, a ove su najčešće, takođe mogu biti letalne, zavisno od značaja izgubljenih genetičkih segmenata koji prouzrokuju različite fenotipske efekte ili funkcije gena na neoštećenom homologom hromosomu, jer se štetni recesivni geni sada mogu neometano izraziti u fenotipu. Ova pojava je označena kao pseudodominacija (izražajnost recesivnog gena u jednostrukoj dozi).

Prvi delecioni sindrom je definisao Lejeune sa saradnicima 1963. god. To je bila delecija kratkog kraka hromosoma 5 (del 5p), (sl 4.6a). Neke delecije su relativno česte, npr. $4p^-$, $9p^-$, $11p^-$, $11q^-$, $13q^-$, $19p^-$ i $18q^-$, (sl. 4.6b) dok su druge nađene samo po nekoliko puta.

Ring-hromosom

Prema klasičnoj definiciji, ring-hromosom predstavlja deleciju u genetičkom smislu, jer nastaje posle prekida na oba kraja hromosoma (sl. 4.7) kada se izgube telomerni regioni koji obezbeđuju stabilnost hromosoma. Mada se telomere morfološki ne razlikuju od ostalog dela hromosoma, one su neophodne za održavanje njihovog linearnog integriteta. Zato prekinuti krajevi bez telomere kao da su "lepljivi", međusobno se spajaju u jednu prstenastu strukturu označenu kao ring-hromosom. Ring-hromosomi su nađeni u svim hromosomima čoveka.

Nedavna analiza ring-hromosoma različitih autosoma je pokazala da je pore-

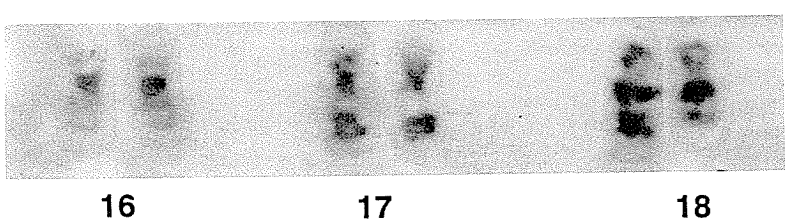


Slika 4.6a – Parcijalni kariotip deteta sa cri du chat sindromom, i del (5p).

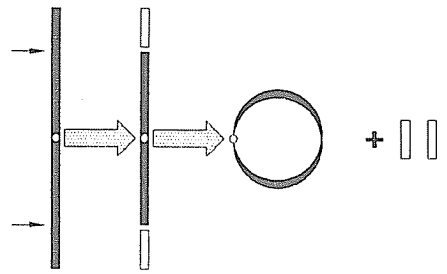
mećaj rasta najizrazitija fenotipska karakteristika ove hromosomske aberacije, jer se javlja u većini slučajeva.

U nekih pacijenata su opisane major i minor somatske anomalije i laka mentalna retardacija, ali u mnogih nosilaca ring-hromosoma nema somatskih anomalija(sl. 4.8).

Na izrazitu fenotipsku varijabilnost utiču: a) veličina deleciranih segmenata, b) stabilnost ring-hromosoma (neki ring-hromosomi pokazuju veću stabilnost nego drugi; stabilniji su oni u kojih je učestalost izmena sestara hromatida mala) i c) vijabilnost ćelijskih linija sa aberantnim ring-hromosomima. Nedostatak



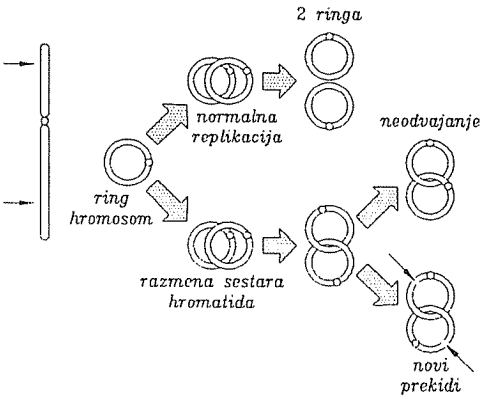
Slika 4.6b – Parcijalni kariotip novorođenčeta sa anomalijama i del (18q).



Slika 4.7 – Mehanizam nastajanja ring hromosoma

fenotipskih anomalija je verovatno uslovljen minutnim delecijama i stabilnošću ringa.

Ova analiza je dovela do još jednog značajnog zaključka, da ring-hromosomi u nizu slučajeva ne predstavljaju deleciju u genetičkom smislu već verovatno nastaju fuzijom telomernih regiona jednog hromosoma. Ovakav ring-hromosom bez delecije utiče na fenotip svojim ponašanjem u deobi, strukturnom nestabilnošću i pojavom kontinuiranih sekundarnih aneuploidija (sl. 4.9) koje prouzrokuju smrt ćelija. S druge strane, smrt ćelija dovodi do izrazitog poremećaja rasta, bez major malformacija i specifičnog delecionog sindroma, sa malo ili bez minor anomalija i lake mentalne retardacije. Ovaj fenotip može biti označen kao "ring–sindrom" jer ne zavisi od hromosoma od koga ring vodi poreklo.



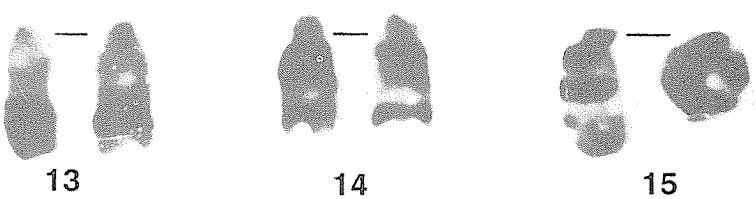
Slika 4.9 – Ponašanje ring hromosoma u deobi, pojava sekundarnih anomalija hromosoma

Duplikacija ili čista parcijalna trisomija

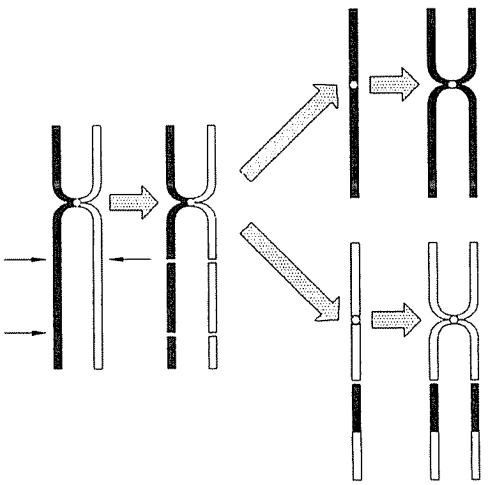
Prisustvo dela hromosoma u višku u hromosomskom komplementu označeno je kao ***duplikacija.*** Povećanje određenog segmenta u hromosomu, ***tandem duplikacija,*** može nastati insercijom segmenta iz jedne hromatide u drugu, posle tri prekida u sestrinskim hromatidama (sl. 4.10), insercijom segmenta sa jednog lanca DNK u drugi, ili insercijom segmenta iz homologog hromosoma.

Duplikacija nastaje i nepravilnim crossing overom, kada se homologi hromosomi asimetrično sparuju (sl. 4.11), ili nepravilnom razmenom sestara hromatida u mitozi i mejozi. Susedni duplicirani segmenti se mogu javiti u tandem redosledu ili u invertovanom redosledu, što određuje i način sparivanja homologih hromosoma (sl. 4.12).

Nepravilan crossing over pored duplikacije u jednom dovodi do delecije u drugom homologom hromosomu. Ilustrativan primer takve tandem duplikacije u jednom i delecije u drugom homologom hromosomu su geni za hemoglobin



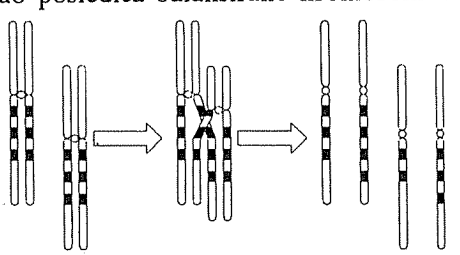
Slika 4.8 – Ring hromosom (15) u deteta sa anomalijama.



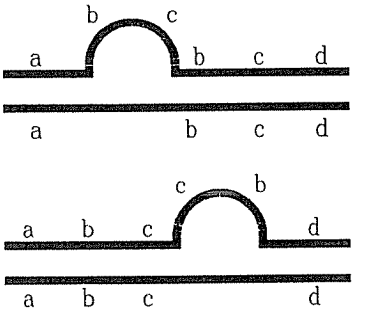
Slika 4.10 – Mehanizam nastajanja tandem duplikacija

čoveka. Molekuli hemoglobina su sastavljeni od dve vrste lanaca (subjedinica) a ove subjedinice su različite na različitim stadijumima razvića. Sinteza subjedinica je kontrolisana različitim genima. Retke patološke forme hemoglobina Lepore i Kenya nastaju usled nepravilnog crossing overa između segmenata koji sadrže vezanu grupu gena za β lanac i njemu slične lance hemoglobina. Ovi geni su smešteni na hromosomu 11 čoveka. Delecione varijante hemoglobina (Lepore i Kenya) prouzrokuju jaku anemiju, dok su varijante sa duplikacijom normalne (sl. 4.13).

Duplicirani segmenti ne moraju uvek biti susedni u istom hromosomu, a mogu se nalaziti i u različitim hromosomima kao posledica balansirane hromosomske

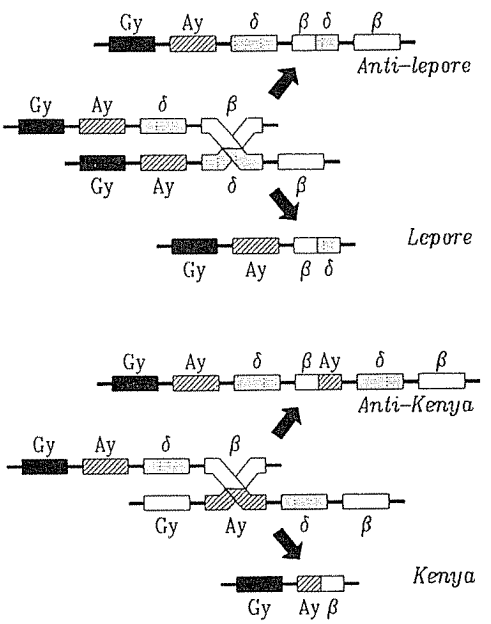


Slika 4.11 – Duplikacije i delecije, rezultat nepravilnog crossing over-a



Slika 4.12 – Tandem i reverzni redosled segmenata u duplikaciji

aberacije jednog od roditelja. U izvesnim slučajevima mogu se javiti kao samostalan deo hromosoma sa centromerom. Obično su to delecirani akrocentrični hromosomi ili se dodatni hromosom u kariotipu sastoji iz centričnog dela neakrocentričnog hromosoma. Ponekad je to mali ring hromosom koji se otvori i ponaša kao običan hromosom. Sve ove duplikacije predstavljaju parcijalne trisomije.



Slika 4.13 – Nepravilan crossing over u γ–δ–β regionu hromosoma 11 čoveka

Duplikacije manje oštećuju fenotip nego delecije. Ipak duplikacije određenih genetičkih regiona deluju slično genskim mutacijama i mogu prouzrokovati jasnu kliničku sliku, dok su u drugim slučajevima fenotipski efekti vrlo blagi (sl. 4.14).

Slika 4.14 – Parcijalni kariotip deteta sa anomalijama i duplikacijom distalnog regiona 14q

Duplikacije su značajne hromosomske promene sa stanovišta evolucije, jer obezbeđuju dodatni genetički materijal, potencijalno sposoban za nove funkcije (divergencija gena).

Izohromosomi i telocentrični hromosomi

Pravilo je da se centromera hromosoma deli uzdužno u anafazi mitoze na dve hromatide. Nekada može doći do greške, centromera se podeli poprečno (crosswise) pa nastaju telocentrični hromosomi, koji su uglavnom nestabilni, a u sledećoj replikaciji nastaju dva metacentrična izohromosoma koji se sastoje od dva identična duga ili kratka kraka hromosoma.

X hromosom čoveka je posebno podložan pogrešnoj deobi. Do sada su otkriveni izohromosomi i telocentrični hromosomi samo za dugi krak X hromosoma, jer je centar inaktivacije X hromosoma na dugom kraku, pa izohromosom kratkog kraka ostaje uvek aktivan, a inaktiviše se normalan X hromosom, što ima letalan efekat.

U profazi mejoze I hromosomi se retko mogu naći kao univalenti i pogrešno orijentisani u deobnom vretenu, što može dovesti do "crosswise" podele centromere i odvajanja dva kraka hromosoma (sl. 4.15). Ako se pri kraju metafaze II telocentrični hromosom ne podeli, u zigotu će se pojaviti izohromosom Xq. Ukoliko se u metafazi II centromera podeli, u zigotu se pojavljuje telocentrični Xq hromosom. Međutim, pre prve deobe zigota može nastupiti nova greška pa se centromera telocentrika ne podeli (sl. 4.15) kada nastaje mozaik od dve ćelijske linije 45,X/46Xi (Xq). Telocentrični Xq hromosomi mogu biti i stabilni u hromosomskom setu, ne moraju se uvek preobratiti ili bar ne u svim ćelijama u isohromosom (sl. 4.16).

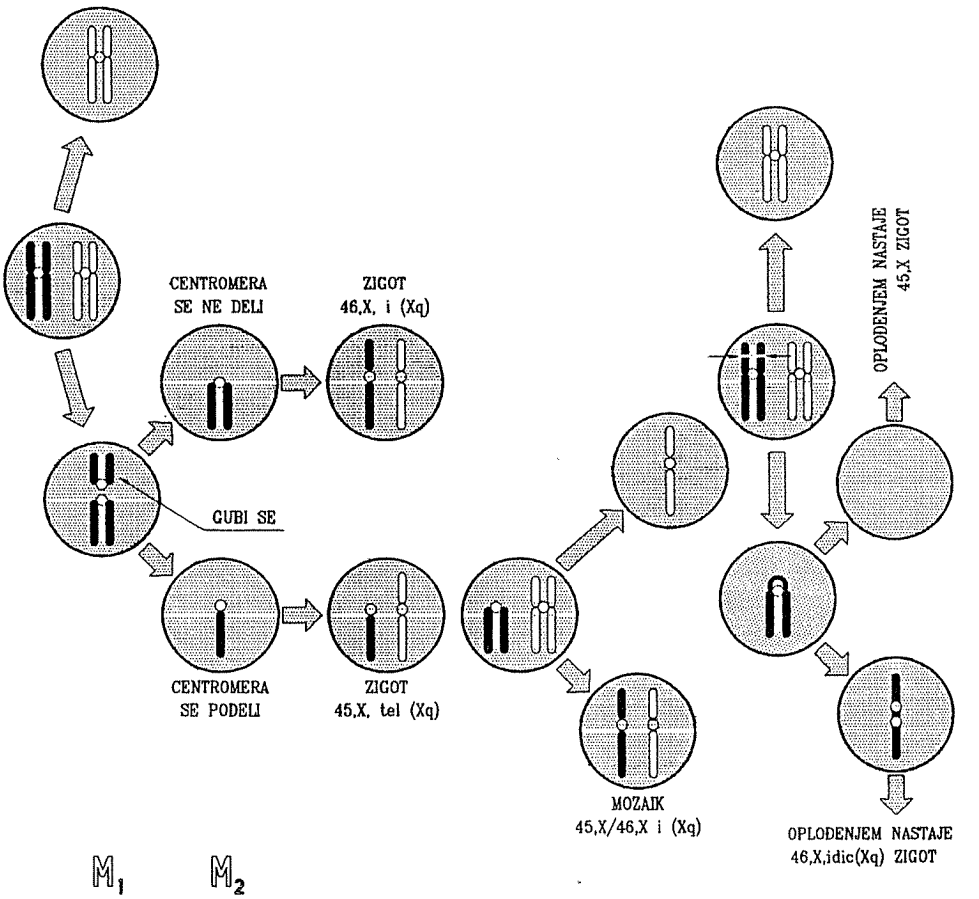
Izohromosomi mogu biti i dicentrični. Ovi nastaju izolokusnim prekidima hromatida jednog hromosoma i spajanjem prekinutih delova (sl. 4.17 a,b).

Izohromosom može nastati i prekidima sestara hromatida iznad i ispod centromere i preraspoređom prekinutih delova (sl. 4.18). Ovaj mehanizam nastajanja i(Xq)i(Yq) dokazan je u čoveka.

Izohromosomi i telocentrični hromosomi autosoma su retki.

Homologe translokacije akrocentričnih hromosoma mogu biti izohromosomi.

Poprečni prekidi centromere metacentričnih i submetacentričnih autosoma se samo izuzetno javljaju. Do sada su opisani izohromosomi 9p i 18q i stabilni telocentrični 4, 7 i 10 hromosomi. Ako su u ćelijama prisutni telocentrici oba kraka, tada nema genetičkog debalansa, pa su njihovi nosioci fenotipski normalni.

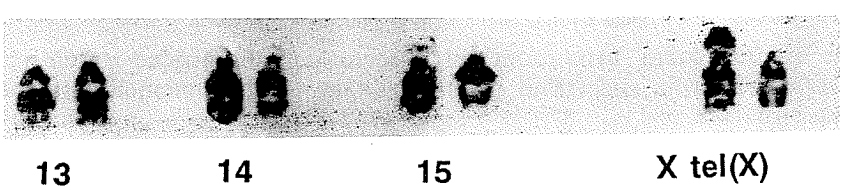


Slika 4.15 – Formiranje i ponašanje telocentrika i izohromosoma X u mejozi

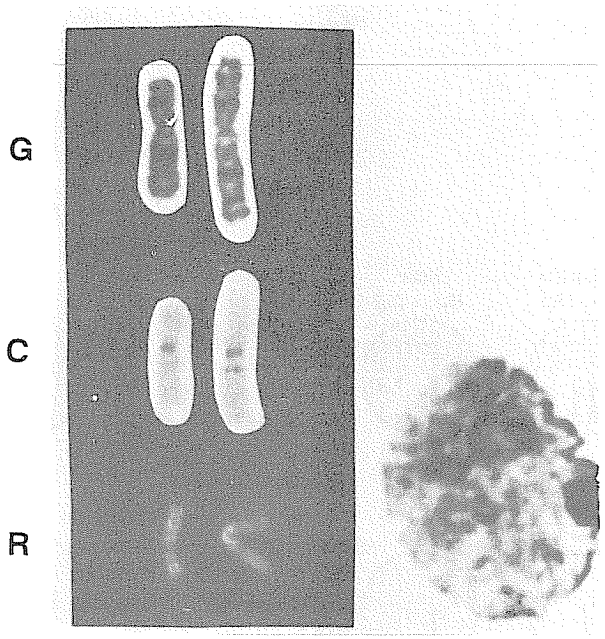
Dicentrični hromosomi

Ova hromosomska aberacija retko nastaje spontano, ali se vrlo često sreće u ćelijama na koje je delovao neki mutagen u G_1 ili G_2 fazi.

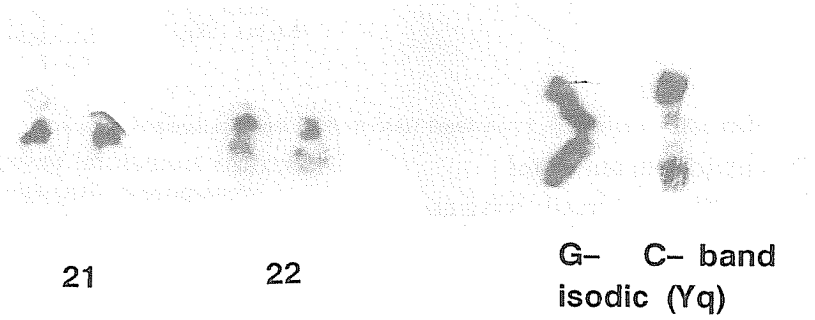
Dicentrični hromosomi nastaju posle prekida i preraspореda dva nehomologa ili dva homologa hromosoma (sl. 4.19). Ako se prekidi vrše na istim tačkama sestara hromatida jednog hromosoma,



Slika 4.16 – Telocentrični X hromosom u pacijentkinje sa gonadalnom disgenezom i malim rastom.



Slika 4.17a – Isodic (Xq) u pacijentkinje sa Turnerovim sindromom



Slika 4.17b – Isodic (Yq) u infertilnog muškarca

nastaje izodicentrični hromosom (sl. 4.20) koji predstavlja simetričnu palindromsku strukturu.

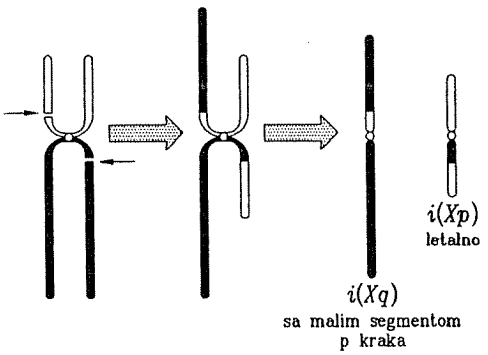
Većina dicentrika je rezultat prekida u G_2 fazi i translokacije između hromatida dva homologa ili nehomologa hromosoma koji formiraju kvadriradijalne figure u deobi (sl. 4.20). Susedni položaj centromera u metafazi dovodi do segregacije dicentrične i acentrične hromatide i dve neizmenjene hromatide (sl. 4.20). Ponekad se hromosomi međusobno povezuju telomerama.

U nekim slučajevima dicentrici su stabilni u hromosomskom setu čoveka.

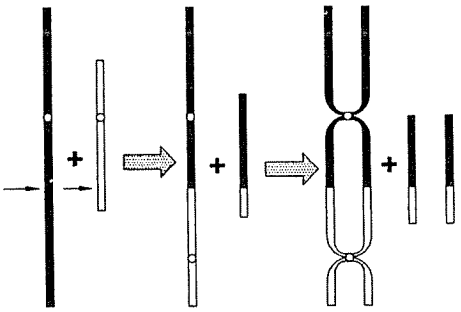
Stabilnost je obezbeđena ako su dve centromere postavljene vrlo blizu pa hromosom funkcioniše kao monocentričan

ili ako se jedna centromera odmah inaktiviše. U tom slučaju zapaža se samo jedna primarna konstrikcija, ali mesta obe centromere se obeležavaju C-trakama.

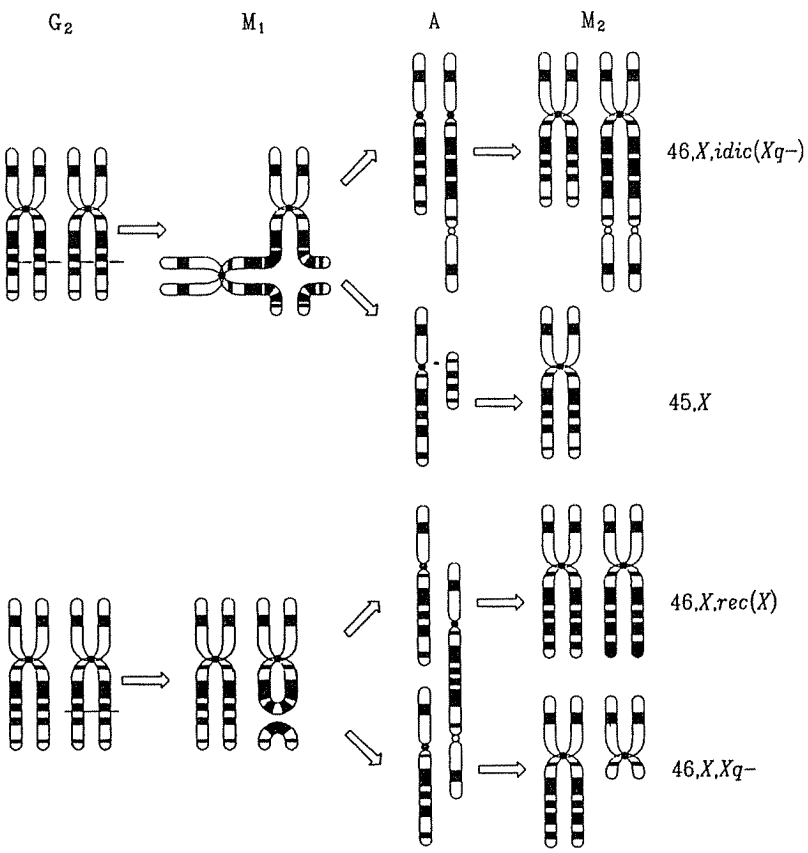
Inaktivna centromera verovatno podleže nekom tipu mutacije koja je održava



Slika 4.18 – Nastanak izohromosoma pre I deobe zigota



Slika 4.19 – Mehanizam nastajanja dicentričnih hromosoma



Slika 4.20 – Mehanizmi nastajanja dicentričnih hromosoma.

u nefunkcionalnom stanju. Priroda promene u inaktivnoj centromeri još nije poznata.

Ne zna se tačan momenat kada se druga centromera inaktiviše, ali se to mora dogoditi brzo posle formiranja dicentrika, pošto hromosom sa dve aktivne centromere ne bi mogao da preživi naredne mitoze. U tom slučaju centromere migriraju na suprotne polove ćelije, između njih se formira anafazni most, koji se može prekinuti na bilo kom mestu. Novonastale ćelije će biti aneuploidne (sl. 4.20) ili će mitoza biti poremećena. U čoveka su poznati stabilni izodicentrici X i Y hromosoma (sl. 4.17a,b).

Inverzije

Ova hromosomska aberacija nastaje posle dva prekida u okviru jednog hromosoma i obrtanja segmenta između prekida za 180°. Na ovaj način se remeti linearni raspored gena u jednom hromosomu.

Ako inverzija nastane u nivou samo jednog kraka hromosoma i ne obuhvata centromeru, označava se kao ***paracentrična inverzija.*** (sl. 4.21). Prekidima na oba kraka hromosoma, kada segment između prekida zahvata i centromeru, nastaje ***pericentrična inverzija.***

U pericentričnoj inverziji menja se položaj centromera ukoliko prekidi nisu na istom rastojanju od centromere. Ako su male, ove simetrične inverzije mogu ostati nezapažene. Paracentrične inverzije nisu mogle biti otkrivene pre primene tehnika traka, jer se oblik hromosoma ne menja u ovoj aberaciji.

Učestalost inverzija u opštoj populaciji je teško utvrditi.

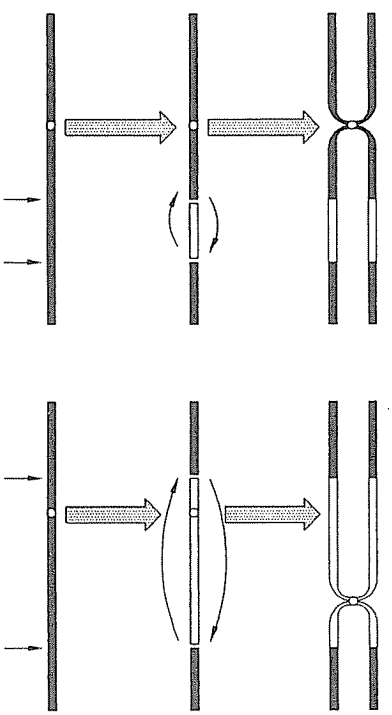
Nedavno je jedna epidemiološka studija hromosoma preko 70.000 novorođenčadi pokazala da je učestalost pericentričnih inverzija 0,14:1.000, isključujući inverziju heterohromatičnog segmenta hromosoma 9, koja je česta i iznosi ±1% u različitim populacijama (sl. 4.22). Paracentrične inverzije su 10 puta ređe od pericentričnih ili se takav utisak stiče zato što se ove inverzije teže otkrivaju.

Utvrđeno je da se neki tipovi inverzija ne javljaju slučajno. Određeni regioni hromosoma su naročito podložni prekidima, koji se ponavljaju u različitim serijama ispitanika.

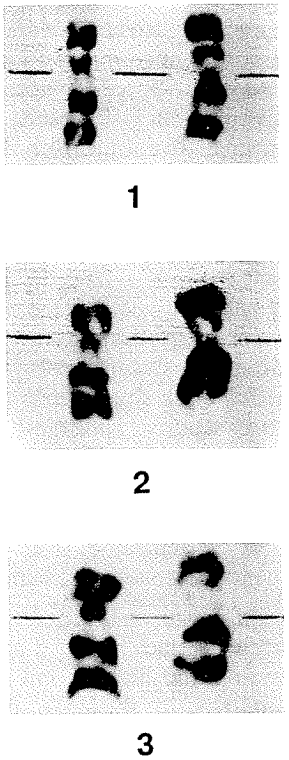
Iste inverzije se javljaju i kod drugih Primata što potvrđuje neslučajnost pojedinih inverzija.

Nosioci inverzija su uglavnom fenotipski normalne osobe, jer ne postoji genetički debalans u ovoj aberaciji.

Štetnost inverzije se izražava u potomstvu. Zbog specifičnog ponašanja hromosoma u profazi mejoze nastaju aberantni hromosomi koji se prenose na potomstvo.



Slika 4.21 – Mehanizmi nastajanja paracentrične i pericentrične inverzije.



Slika 4.22 – Pericentrična inverzija hromosoma 9 u osoba sa reproduktivnim poremećajima.

Pericentrične inverzije opisane su u svim hromosomima izuzev hromosoma 20. Posle inverzije hromosoma 9, najčešće su inverzije hromosoma 2, 8, 3, 1 i 5.

U procesu mejoze osoba heterozigotnih nosilaca pericentrične inverzije homologi par hromosoma koji je zahvaćen inverzijom treba da konjugira, kao i ostali parovi hromosoma. Dobro je poznato da je proces konjugacije homologih hromosoma vrlo precizan proces i da se homologi regioni hromosoma međusobno sparuju. Kako je u nosilaca inverzije segment jednog hromosoma u obrnutom redosledu (invertovan) u procesu sinapsiranja u zigotenu se formira ***inverziona petlja,*** koja obezbeđuje sparivanje homologih delova hromosoma (sl. 4.23). Postoje tri mogućnosti sinapsiranja hromosoma u vezi sa dužinom invertovanog segmenta:

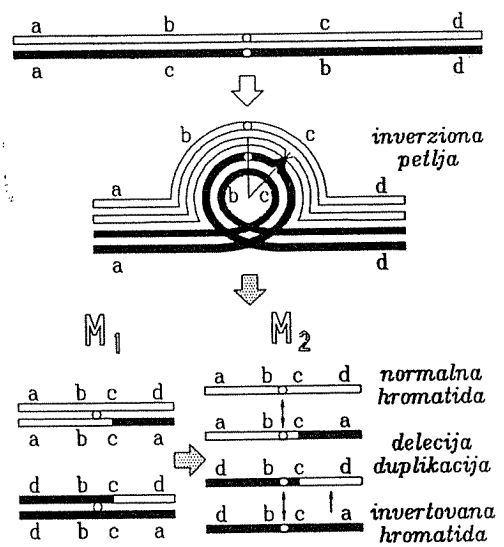
a) u invertovanom hromosomu se formira petlja oko normalnog segmenta u drugom homologom hromosomu;

b) u ekstremno malim inverzijama nema sinapsiranja u regionu inverzije;

c) u ekstremno velikim inverzijama ne sinapsiraju delovi hromosoma izvan invertovanog segmenta.

Ako u pahitenu dođe do crossing overa unutar inverzione petlje, nastaju dve hromatide sa genetičkim debalansom (rekombinacijom) – tačnije, hromatide sa delecijom i duplikacijom segmenata koji nisu obuhvaćeni inverzijom. Hromatide koje nisu učestvovale u crossing overu biće neizmenjene, jedna sa normalnim redosledom segmenata, a druga sa invertovanim redosledom segmenata (sl. 4.23).

Tako, heterozigotni nosilac inverzije formira četiri tipa gameta. Jedan tip sa potpuno normalnim hromosomskim kom-



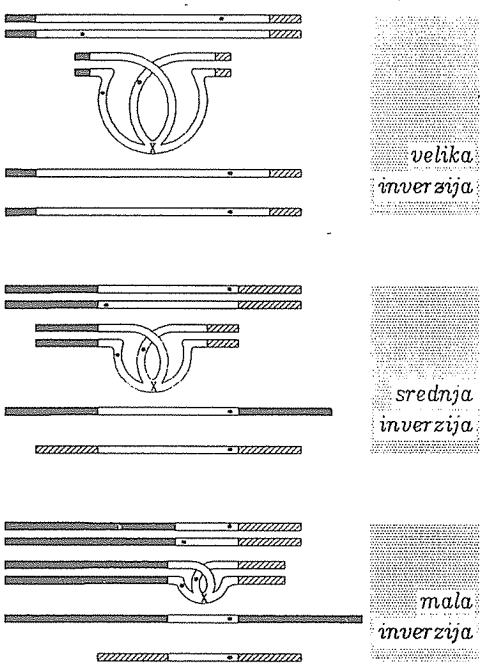
Slika 4.23 – Pericentrična inverzija, crossing over u inverzionoj petlji.

plementom, drugi tip sa balansiranom invertovanom hromatidom, i dva tipa gameta sa anomalijama, odnosno rekombinovanim hromatidama (sl. 4.23).

Ako uporedimo veličinu invertovanih segmenata i inverzionih petlji u sinapsiranim hromosomima, uočava se da veliki invertovani segment, veći od 1/3 hromosoma, sa jednim crossing overom unutar inverzione petlje formira aberantne hromatide sa malom delecijom i malom duplikacijom. Obrnuto, mali segment u inverziji daje hromatide sa velikom delecijom i duplikacijom (sl. 4.24).

Medicinski značaj inverzije

Kada se jedna inverzija otkrije preko deteta rođenog sa anomalijama i aberantnim kariotipom, jasno je da su ove dve pojave povezane (sl. 4.25). Zato je izuzetno značajno da saznamo sa kojom učestalošću se u populaciji pojavljuje potomstvo nosilaca inverzije sa vijabilnim aberantnim hromosomom. Podaci iz literature su vrlo oprečni, učestalost se kreće od 7 do 34%. Rizik zavisi od mesta prekida u invertovanom hromosomu, što je invertovani segment veći, genetički debalans je manji, kompatibilan sa životom, pa se rađaju deca sa različitim anomalijama.

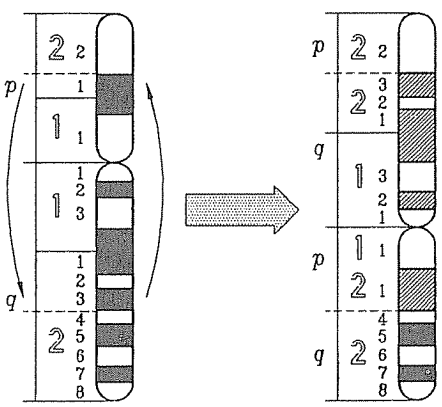


Slika 4.24 – Posledice crossing overa u inverzionim petljama različite veličine

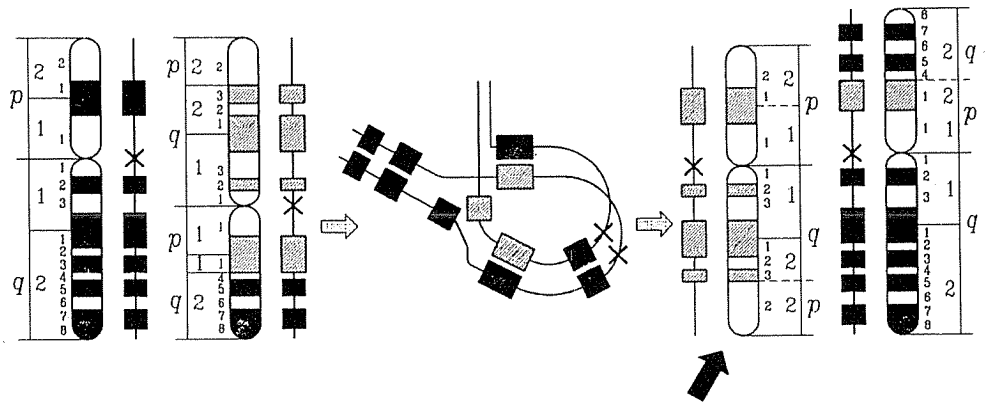
Jasno je da će veći hromosomski debalans prouzrokovati spontane pobačaje, a to se dešava u slučaju srednjih i malih inverzija. Još uvek se ne može pouzdano govoriti o učestalosti spontanih pobačaja koji su posledica crossing overa u inverzionoj petlji jednog od roditelja. Verovatno se rizik kreće oko 10%. Treba naglasiti da se crossing over ređe pojavljuje u malim inverzionim petljama.

Inverzije mogu smanjiti fertilitet heterozigotnih nosilaca muškog pola, naročito kada su veliki hromosomi zahvaćeni inverzijom, i tada se može poremetiti mejoza. Na proces mejoze u oogenezi inverzije izgleda ne utiču.

Za sve inverzije je poznata porodična pojava. Nasleđuju se po Mendelovim zakonima, odnos normalnih potomaka i fenotipski normalnih nosilaca inverzije je približno 1:1, uključujući i inverziju hro-



Slika 4.25a – Pericentrična inverzija hromosoma X, u majke pacijentkinje sa gonadalnom disgenezom. Levo, normalan hromosom X, desno, isti hromosom posle inverzije.



Slika 4.25b – Crossing over u inverzionoj petlji majke. Strelicom označena aberantna hromatida koju je nasledila pacijentkinja sa gonadalnom disgenezom.

mosoma 9, koja je česta u populacijama čoveka, pa se pretpostavljalo da se preferencijalno nasleđuje.

Ređe se inverzije javljaju kao nova mutacija. Nosioci nove mutacije mogu ponekad pokazivati kliničke simptome nepoznate etiologije. Smatra se da je u slučaju nastajanja ***de novo*** inverzije došlo do mikroduplikacije ili mikrodelecije, ili je prekid na hromosomu narušio integritet genetičke informacije u nivou nekog gena.

Pericentrične inverzije su ponekad udružene sa aneuploidijama, npr. sa trisomijom hromosoma 21, 18 ili sa trisomijama polnih hromosoma i drugim aberacijama.

Inverzije su vrlo značajne sa evolucionog stanovišta. Velika je njihova uloga u specijaciji čovekolikih majmuna i čoveka.

Paracentrična inverzija

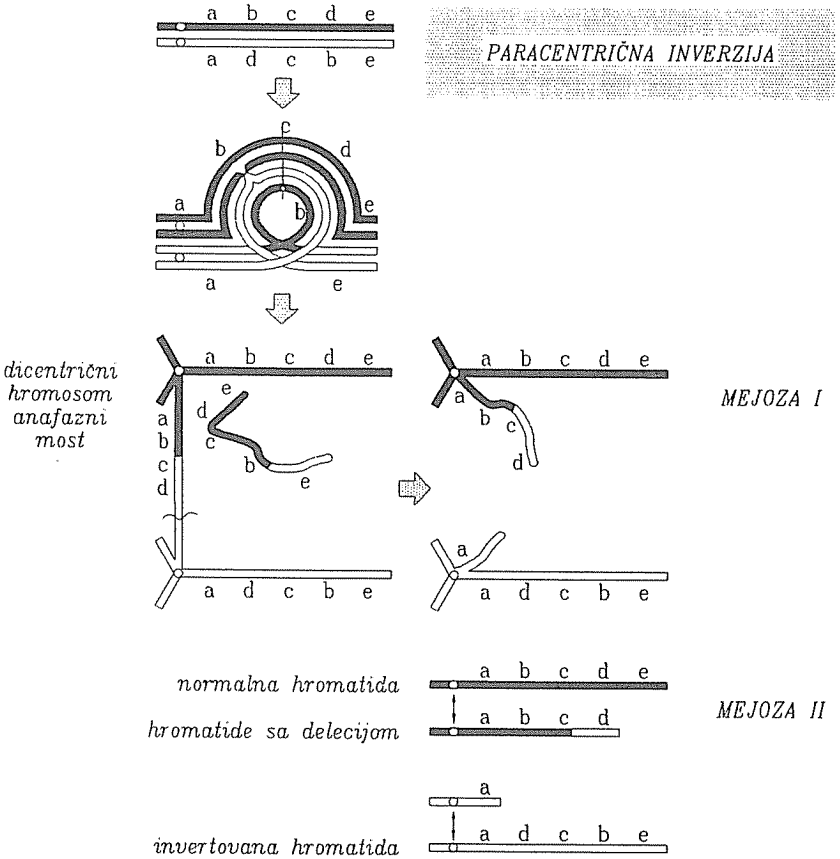
Ove inverzije su postale dostupne ispitivanju tek posle primene tehnika traka. Tako je prva paracentrična inverzija prikazana tek 1974. god. Paracentrične inverzije su do sada otkrivene u 20 različitih hromosoma, od kojih su 21 na p-kraku i 87 na q-kraku. Mada se mogu pojaviti u različitim trakama hromosoma, ipak se prekidi preferencijalno javljaju u 1p22, 1p36, 3p16, 3p25, 7q11 i 7q22.

Kao i u heterozigotnih nosilaca pericentrične inverzije, u procesu mejoze homologi hromosomi sinapsiraju, formira se inverziona petlja u homologom paru sa inverzijom.

Ako dođe do crossing overa u inverzionoj petlji, dve hromatide koje su zahvaćene crossing overom daju sledeće aberantne rekombinante: jedna hromatida biće sa dve centromere (dicentrik), a druga bez centromere (acentrični fragment). Hromatide koje nisu učestvovale u crossing overu ostaju neizmenjene.

U narednoj deobi acentrična hromatida se gubi, a dicentrični hromosom stvara velike teškoće jer se između centromera nalazi anafazni most (sl. 4.26), koji se lako prekida na bilo kom mestu i sekundarno nastaju defektne hromatide. Do sada je opisan samo jedan slučaj stabilnog dicentrika (akrocentrični hromosom), i mali broj slučajeva defektnih hromatida u potomaka nosilaca paracentrične inverzije.

Jedan ilustrativan primer pokazuje kako fenotip potomaka nosilaca paracentrične inverzije može varirati zavisno od mesta prekida u anafaznom mostu (sl. 4.27).



Slika 4.26 – Paracentrična inverzija, crossing over u inverznoj petlji

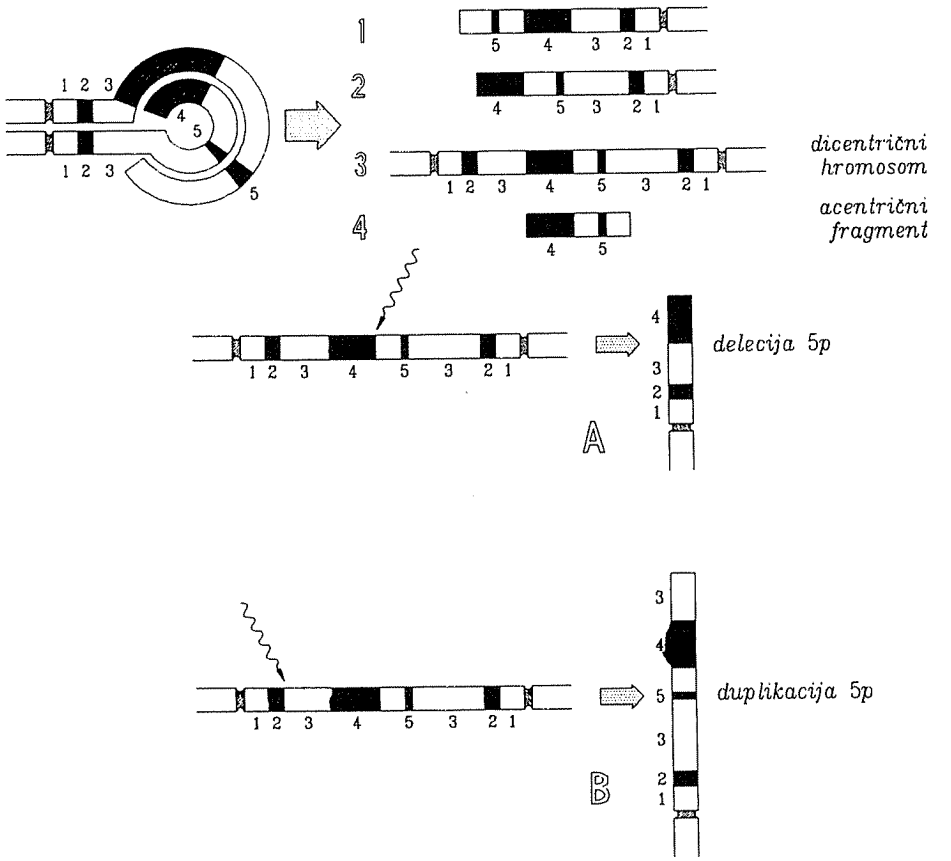
U jednoj porodici majka je nosilac paracentrične inverzije kratkog kraka hromosoma 5p. Jedno dete je nasledilo hromatidu sa delecijom segmenta koja prouzrokuje sindrom, ***cri du chat*** a drugo dete, skoro potpuno normalno, nasledilo je duplikaciju jednog segmenta 5p, pošto je prekid bio na drugom mestu u anafaznom mostu.

Za sada je teško reći koliki je rizik pojave nebalansiranog kariotipa u potomaka nosilaca paracentrične inverzije. Za takav zaključak je potrebno da se ispita znatno veći broj porodica sa različitim paracentričnim inverzijama.

Teoretski postoji visok rizik za nosioce paracentričnih inverzija da rađaju potomstvo sa defektnim hromosomima, koji su rezultat prekida dicentričnog hromosoma.

Međutim, ovaj rizik je još uvek nepoznat u humanim populacijama. Vijabilitet rekombinantnih hromosoma zavisi od količine i prirode genetičkog materijala u duplikaciji ili deleciji.

Hromosomski materijal distalno od invertovanog segmenta uvek pretrpi deleciju u procesu crossing overa i formiranja dicentrika u inverzionoj petlji. Tako crossing over u distalnim inverzionim petljama rezultira manjim delecijama, pa se može očekivati rađanje abnormalnog potomstva.



Slika 4.27 – Paracentrična inverzija kratkog kraka hromosoma 5 u majke i crossing over u inverzionoj petlji. Prekid dicentričnog hromosoma na različitim mestima u anafaznom mostu i pojava različitih rekombinantnih hromosoma u njene dece

Paracentrične inverzije se javljaju u porodicama, odnos normalnih potomaka i balansiranih nosilaca inverzije je približno 1:1, iako u nekim porodicama postoje odstupanja u korist nosilaca paracentrične inverzije. De novo paracentrične inverzije su uglavnom praćene određenom kliničkom slikom. Objašnjenje ovog fenomena je isto kao i u slučaju pericentričnih inverzija.

Translokacije

Translokacije predstavljaju izmenu segmenata između homologih i nehomologih hromosoma. Razlikuju se tri tipa:

a) recipročne translokacije – mutualne izmene hromosomskih segmenata između bilo koja dva hromosoma uključujući i polne hromosome;

b) Robertsonove translokacije – mutualna izmena hromosomskog materijala između dva akrocentrična hromosoma;

c) nerecipročne translokacije – insercije – prenos genetičkog materijala jednog hromosoma u drugi hromosom. Za ovaj tip translokacije su potrebna tri prekida na dva hromosoma.

Svi hromosomi i svi kraci hromosoma čoveka su uključeni u translokacije.

Recipročne translokacije

Nosioci recipročnih translokacija su uglavnom fenotipski normalne osobe, koje u procesu gametogeneze mogu formirati gamete sa abnormalnom hromosomskom konstitucijom, zbog specifičnog ponašanja translociranih hromosoma i njihovih normalnih homologih hromosoma u mejozi. Homologi hromosomi u zigotenu obrazuju sinapsis, precizno se sparuju homologi segmenti. Ovo pravilo važi i za translocirane segmente, pa zbog toga sinapsiraju četiri hromosoma. Normalni hromosomi i hromosomi sa translokacijom formiraju jednu krstoliku strukturu – kvadrivalent – koja omogućuje sparivanje homologih segmenata između ova četiri hromosoma (sl. 4.28).

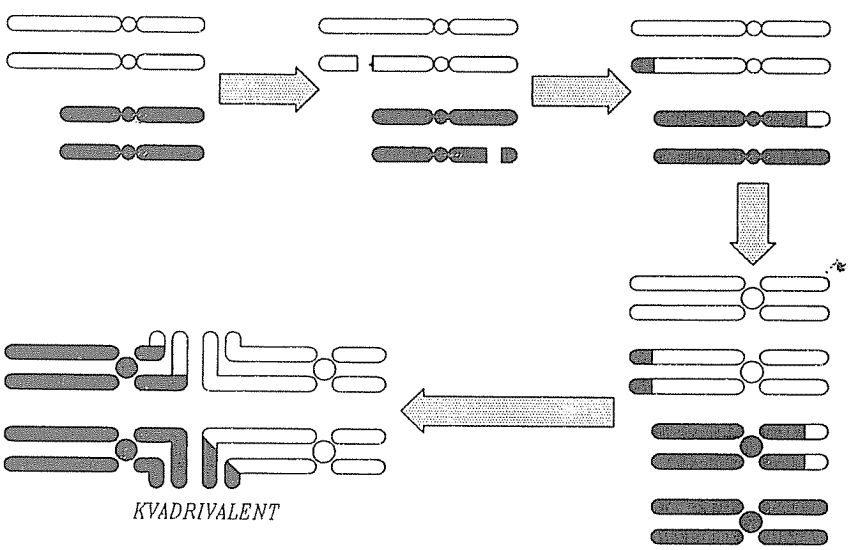
Kada se sinaptički kompleks dezintegriše, hromosomi ostaju povezani hijazmama i u diplotenu se vide u obliku ringa ili lanca.

U anafazi ova četiri hromosoma se razdvajaju. Na način segregacije hromosoma utiče orijentacija kvadrivalenata u ekvatorijalnoj ravni deobnog vretena. Orijentacija kvadrivalenata zavisi od dužine krakova pahitenske krstolike figure i od broja i rasporeda hijazmi. Postoje četiri načina razdvajanja (segregacije) ovih hromosoma.

Ako na suprotne polove ćelija odlaze po dva hromosoma, to je segregacija 2:2.

1. *Alternativna segregacija* – na jedan pol ćelije polaze oba normalna hromosoma, a na drugi pol oba hromosoma sa translokacijom, tako će jedan tip gameta imati potpuno normalnu hromosomsku konstituciju, a drugi tip gameta imaće balansiranu translokaciju. Oplođenjem će ovi gameti dati potomstvo sa normalnim kariotipom i fenotipom i potomstvo sa balansiranim kariotipom i normalnim fenotipom (sl. 4.28a).

2. *Susedna segregacija – 1* nastaje kada se homologe centromere razdvajaju i na suprotne polove ćelije polaze po jedan normalan hromosom i jedan hromosom sa translokacijom. Oplođenjem sa normalnim gametom nastaju zigoti sa nebalansiranim kariotipom, delecijom i duplikacijom za određene segmente (sl. 4.28a).



Slika 4.28 – Balansirana recipročna translokacija

3. ***Susedna segregacija*** – *2*: homologe centromere se orijentišu prema istom polu ćelije, pa se u gametima nađu normalan hromosom i njegov homologi hromosom sa translokacijom (sl. 4.28a). Ovaj tip segregacije se retko dešava, a genetički debalans je znatno veći nego u susednoj – 1 segregaciji. Procenjuje se da je samo 3-4% potomaka sa nebalansiranim kariotipom rezultat susedne – 2 segregacije i tada su uglavnom akrocentrični hromosomi i hromosom 9 uključeni u translokaciju.

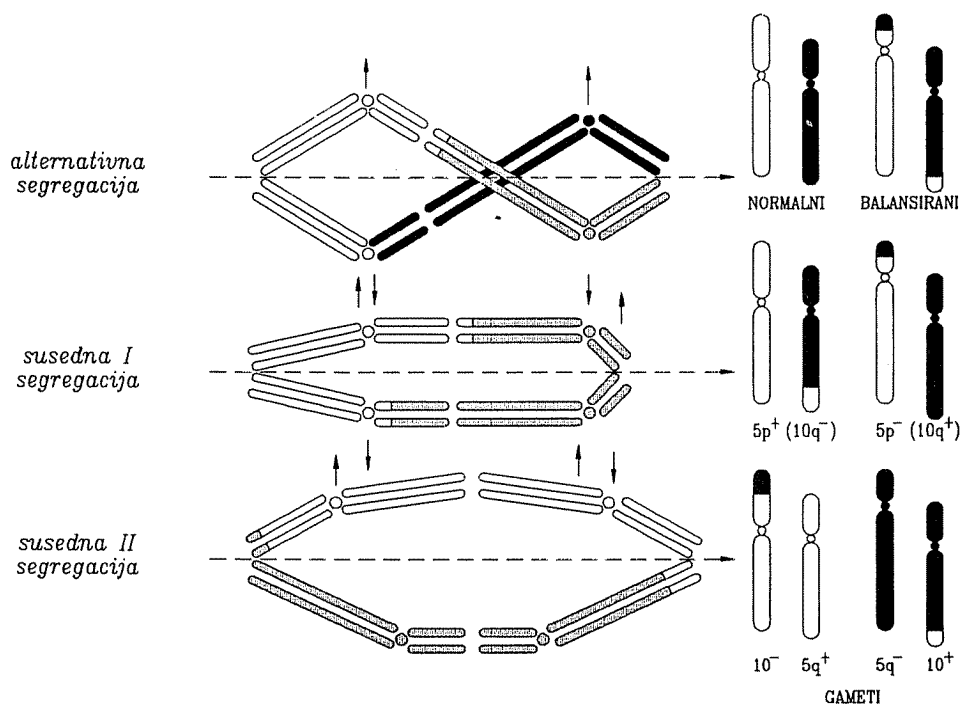
3:1 segregacija nastaje kada tri hromosoma odlaze na jedan pol, a jedan hromosom na drugi pol ćelije. Različite kombinacije hromosoma se mogu naći u gametima u ovom tipu segregacije. Oplođenjem ovi gameti daju zigote sa kompletnom i parcijalnom trisomijom i monosomijom hromosoma.

4:0 segregacija je teorijski moguća, ali kod čoveka još nije dokazana. Na osnovu ova četiri načina segregacije hromosoma u nosilaca balansirane translokacije očekujemo 50% potomaka sa nebalansiranim kariotipom i abnormalnim fenotipom, 25% nosilaca balansirane translokacije i 25% genotipski i fenotipski normalnih potomaka.

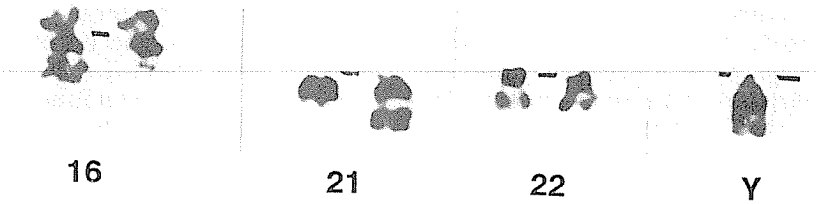
Na sreću, ove očekivane proporcije potomaka se ne ostvaruju, broj dece sa aberantnim kariotipom je znatno manji, jer selekcija može delovati počev od gameta sa nebalansiranim kariotipom preko zigota do različitih faza embrionalnog i fetalnog razvića.

Prosečan rizik za rađanje abnormalnog potomstva je 7% ako je majka nosilac balansirane translokacije i 3% ako je otac nosilac.

Ispitivanjem recipročnih translokacija u dve grupe nosilaca balansirane translokacije, jedna sa živorođenom decom sa anomalijama (sl. 4.29), a druga sa više-



Slika 4.28a



Slika 4.29 – Balansirana recipročna translokacija (16q; 21q) u oca novorođenčeta sa multiplim anomalijama i nasledjenom parcijalnom trisomijom hromosoma 16

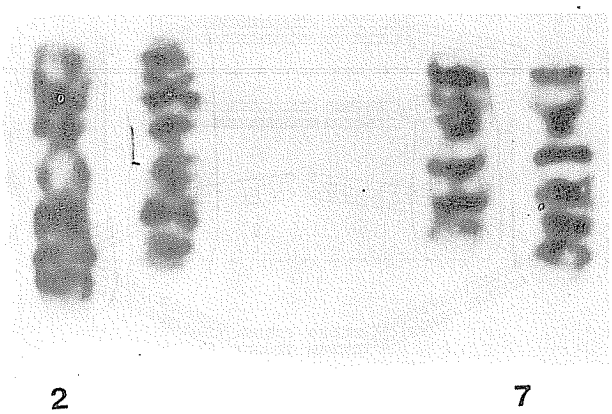
strukim spontanim abortusima (sl. 4.30), utvrđeno je sledeće: fenotipski efekat zavisi od veličine i genetičkog sadržaja translociranog segmenta, a veličina određuje i način segregacije hromosoma. Veći translocirani segmenti povećavaju učestalost 3:1 segregacije. Genetički debalans genoma oko 2,2% ima letalan efekat i prouzrokuje rani spontani pobačaj. U živorođene dece sa nebalansiranim kariotipom genetički debalans se kretao oko 1,6% po haploidnom setu.

Utvrđeno je zatim da je u grupi nosilaca balansirane translokacije sa spontanim abortusima distribucija hromosoma koji učestvuju u translokaciji skoro slučajna, dok u grupi sa živorođenom oštećenom decom distribucija hromosoma nije slučajna. Povećana je zastupljenost hromosoma 9, 21 i 22, dok je učestalost hromosoma 1, 2, 3, 6, 8, 17 i 18 smanjena.

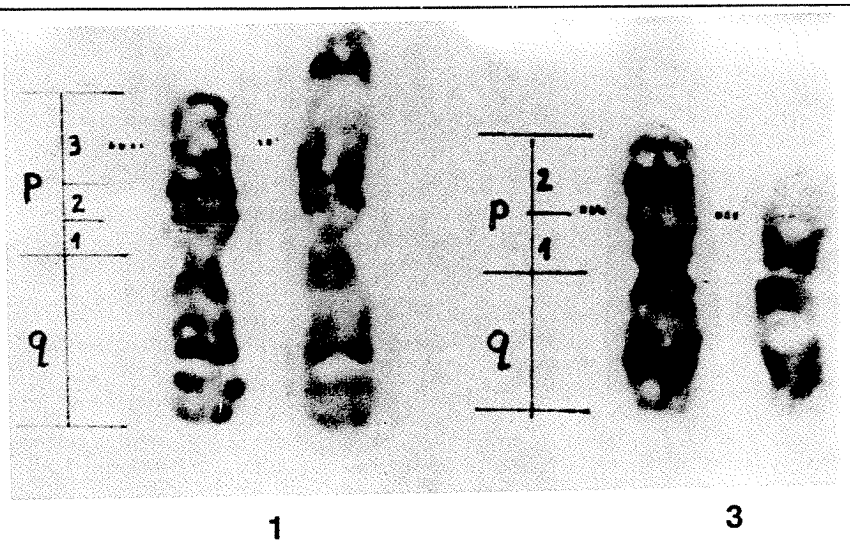
Balansirane recipročne translokacije utiču na fertilitet nosilaca muškog pola (sl. 4.31). Incidencija ovih translokacija je veća u muškaraca sa azoospermijom i oligozoospermijom nego u opštoj populaciji. Za sada ostaje otvoreno pitanje zašto nije u svih nosilaca recipročne translokacije mejoza prekinuta ili poremećena.

Infertilitet u žena prouzrokuje samo recipročna translokacija između X hromosoma i autosoma (sl. 4.32).

U ranijem tekstu je napomenuto da su nosioci balansiranih translokacija uglavnom fenotipski normalne osobe. Pojavljuju se, međutim, i nosioci na izgled uravnotežene translokacije koji imaju određene nespecifične anomalije koje ne odgovaraju ni jednom poznatom sindromu (sl. 4.33). Ovo se naročito odnosi na de novo translokacije, pa se pretpostavlja



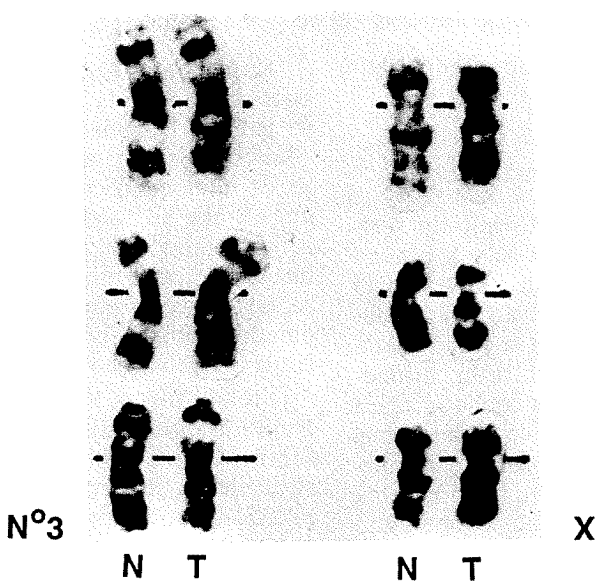
Slika 4.30 – Balansirana recipročna translokacija t(2q; 7q) u žene sa ponavljanim spontanim pobačajima



Slika 4.31 – Recipročna translokacija t(1p; 3p) u infertilnog muškarca

da je prekid u hromosomu mogao oštetiti neki gen, izmeniti genetičku informaciju, ili je u pitanju pozicioni efekat, koji je poremetio položaj određenih gena značajan za njihovu funkciju.

Ponekad se u nosilaca uravnotežene translokacije, kao i u nosilaca inverzije, javljaju i druge hromosomske anomalije, npr. trisomije polnih hromosoma i autosoma. Ova pojava se objašnjava interhromosomskim efektom u mejozi, ali se



Slika 4.32 – Recipročna translokacija t(3q; Xq) u pacijentkinje sa gonadalnom disgenezom

Slika 4.33 – Balansirana recipročna translokacija t(1q; 11q) i Robertsonova translokacija t(14q; 22q) u fenotipski normalnog oca i deteta sa oligofrenijom

još mora proučavati do donošenja definitivnog zaključka.

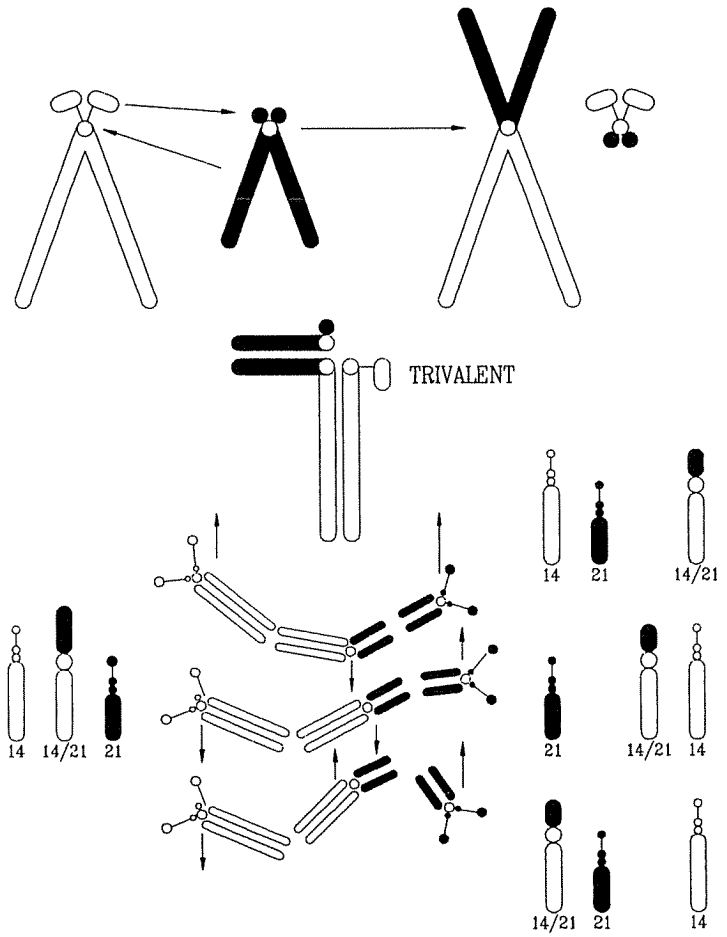
Robertsonova translokacija

Ovo je nešto jednostavniji tip recipročne translokacije koja se vrši između akrocentričnih homologih i heterologih hromosoma i podrazumeva spajanje dugih krakova akrocentrika u jedan metacentričan ili submetacentričan hromosom. Zato se u kariotipu osoba nosilaca ovih translokacija nalazi 45 hromosoma. Uprkos ovoj činjenici, nosioci ove aberacije su uglavnom fenotipski normalni, jer se u procesu translokacije gube samo kratki kraci akrocentrika, koji sadrže gene za rRNK, ali ovaj nedostatak ne utiče na fenotip (sl. 4.34).

Robertsonova translokacija može nastati posle prekida u blizini centromere, na jednom hromosomu iznad, a na drugom ispod centromere. Tada se formira jedan monocentrični hromosom od dva duga kraka homologog para hromosoma ili dva duga kraka nehomologih hromosoma i jedan minutni hromosom, koji se, iako sa centromerom, obično izgubi u narednoj deobi. Ovaj tip translokacije se često označava kao ***centrička fuzija.***

Prekidi u oba hromosoma koji učestvuju u translokaciji mogu da budu iznad centromere u nivou sekundarne konstrukcije, pa se formira dicentrični translokacioni hromosom, koji se često javlja u Robertsonovim translokacijama.

Iako su poznate sve moguće kombinacije akrocentričnih hromosoma u



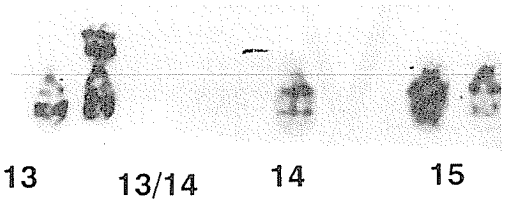
Slika 4.34 – Robertsonova translokacija, tri tipa segregacije hromosoma u mejozi I

Robertsonovim translokacijama, očigledno je da učešće pojedinih akrocentrika i njihove kombinacije nisu slučajne (tab. 4.1). Iz tabele se vidi da su među heterologim translokacijama najčešće kombinacije 13q:14q (sl. 4.35) i 14q:21q. Među homologim translokacijama preovlađuju 21q:21q. U profazi mejoze I heterozigotnih nosilaca Robertsonove heterologe translokacije spajanjem homologih delova hromosoma u zigotenu se formira jedna trivalentna figura, jer se četvrti minutni hromosom gubi. Odvajanje hromosoma u anafazi zavisiće od položaja centromera hromosoma u trivalentnoj figuri (sl. 4.34).

Tabela 4.1

HROMOSOMI					
	13	14	15	21	22
13	43	479	28	32	11
14		9	34	447	18
15			24	46	98
21				245	30
22					16

Na primeru translokacije 14q:21q može se pratiti segregacija hromosoma u anafazi (sl. 4.34).



Slika 4.35 – Parcijalni kariotip, heterologa Robertsonova translokacija t(13q; 14q)

Alternativna segregacija. Dva neizmenjena hromosoma migriraju ka jednom, a translocirani hromosom ka drugom polu deobnog vretena, što će obezbediti normalne gamete i gamete sa balansiranom translokacijom. Spajanjem ovih gameta sa gametima suprotnog pola potomstvo će biti potpuno normalno ili fenotipski normalni nosioci balansirane translokacije.

Susedna – 1 segregacija daće gamete sa disomijom hromosoma 14 i bez hromosoma 14. Spajanjem ovih gameta sa normalnim gametima nastaju translokaciona trisomija 14 i monosomija 14. Obe ove hromosomske konstitucije su letalne.

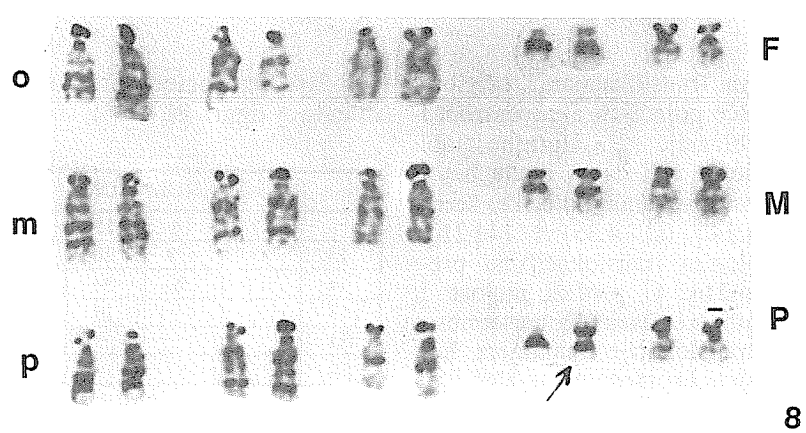
Susedna – 2 segregacija obrazuje gamete sa disomijom hromosoma 21 i bez hromosoma 21. Spajanjem ovih gameta sa normalnim gametima nastaju translokaciona trisomija hromosoma 21 (Downov sindrom) i monosomija hromosoma 21, koja je letalna.

Rizik rađanja oštećenog potomstva u nosilaca balansirane heterologe Robertsonove translokacije zavisi od tipa translokacije i od toga koji je roditelj nosilac. Nosioci oba pola česte translokacije 13q: 14q imaju mali rizik rađanja trisomičnog potomstva, jer većina trisomičnih fetusa bude rano eliminisana spontanim pobačajem.

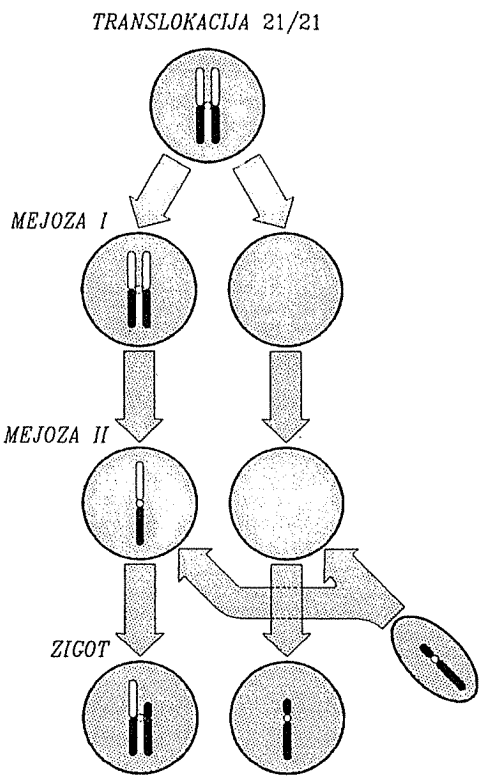
Veći rizik za rađanje trisomičnog potomstva imaju nosioci translokacije u koju je uključen hromosom 21, naročito ako je majka nosilac – 13%, a ako je otac nosilac translokacije, rizik je 3%.

Robertsonove translokacije takođe remete mejozu muškaraca i dovode do infertiliteta, najčešće prouzrokuju oligozoospermiju.

U slučaju homologe translokacije, npr. 21q: 21q, postoje samo dve mogućnosti za potomstvo balansiranog nosioca translokacije (sl. 4.37). Pošto procesom translokacije dva hromosoma 21 formiraju jedan metacentrični hromosom, u procesu mejoze nastaju samo dva tipa gameta: disomični i nulisomični za hromosom 21. Spajanjem ovih gameta sa normalnim gametom rađaju se deca sa translokacionom trisomijom 21 (sl. 4.36),



Slika 4.36 – Akrocentrični hromosomi roditelja i de novo homologa translokacija u deteta sa Down-ovim sindromom nastala u mejozi majke



Slika 4.37 – Segregacija translokacionog hromosoma 21 u mejozi

a monosomija 21 je letalna. U ovom tipu translokacije rizik za rađanje oštećenog potomstva je 100%, bez obzira na to koji je roditelj nosilac translokacije. Zahvaljujući primeni novih citogenetičkih tehnika, danas je na osnovu citogenetičkih markera moguće odrediti poreklo de novo translokacije. Ovi markeri su heterohromatične varijante akrocentričnih hromosoma, karakteristične za kratak krak ovih hromosoma. (sl. 4.36)

Učestalost recipročnih i Robertsonovih balansiranih translokacija je 1:500 novorođenčadi. Analiza hromosoma bračnih parova sa spontanim pobačajima, mrtvorođenom decom i decom sa kongenitalnim anomalijama je pokazala da se u ovoj grupi ispitanika učestalost recipročnih i Robertsonovih translokacija kreće od 2,2% do 6,2%. Obično je broj recipročnih i Robertsonovih balansiranih translokacija isti.

Insercije

Znatno su ređe od hromosomskih preraspoređa sa dva prekida. Mogu se javiti između dva hromosoma ili unutar jednog hromosoma, umetnuti segment može biti u pravilnom ili u invertovanom položaju (sl. 4.38).

Translokacije mogu biti i složene, kada prekidi i preraspoređi nastaju na više od dva hromosoma.

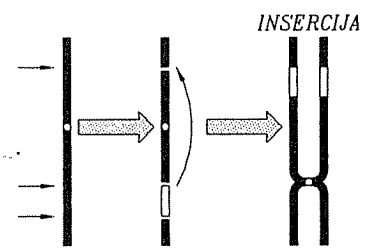
Inverzije i translokacije dovode do semisteriliteta nosilaca ovih preraspoređa, jer su njihovi mejotski produkti (nebalansirani kariotipovi) često letalni.

Homozigotnost hromosomskih preraspoređa je retka u čoveka.

Pericentrična inverzija hromosoma 9, iako jedan od najčešćih strukturnih preraspoređa, opisana je u homozigotnom stanju samo četiri puta.

Homozigotni nosioci pericentričnih inverzija hromosoma 3 i 4 su takođe poznati, a paracentrična inverzija hromosoma 12 je utvrđena u mentalno retardiranog dečaka čiji su roditelji bili heterozigotni nosioci ove inverzije.

Opisana je i porodica sa tri homozigotna nosioca Robertsonove translokacije (13q14q) i fetus sa homozigotnom translokacijom (14q21q).



Slika 4.38 – Inserciona translokacija.

Do sada nema mnogo dokaza o uzročnoj vezi između homozigotnosti hromosomskog prerasporeda i abnormalnog fenotipa. Kako postoje opisani slučajevi sa abnormalnim fenotipom, može se pretpostaviti da je došlo do:

a) oštećenja gena u tački prekida ili pozicionog efekta koji se izražava samo u homozigotnom stanju;
b) male duplikacije ili delecije izazvane nepravilnim crossing overom u inverzionoj petlji u pahitenu;
c) izražajnosti recesivnih alela u homozigotnom stanju.

HROMOSOMSKE ABERACIJE U SPONTANIM POBAČAJIMA

Procenjuje se da se 15-20% svih prepoznatljivih trudnoća završava spontanim pobačajem u I tromesečju trudnoće, a oko 50-60% ovih ranih abortusa nastaje usled hromosomskih aberacija. Poliploidije obuhvataju oko 20% od ukupnog broja aberacija fetusa, a triploidije su češće od tetraploidije (tab. 4.2). Mali broj poliploidnih fetusa preživi intrauterini period (samo 1/10.000). Fenotip poliploidne novorođenčadi se odlikuje multipnim anomalijama i većina novorođene dece umire već prvog dana života.

Tabela 4.2

OSNOVNI TIPOVI HROMOSOMSKIH ANOMALIJA U SPONTANIM POBAČAJIMA	
	PROCENAT
TRISOMIJA	52
XO	18
TRIPLOIDIJA	17
TRANSLOKACIJA	2 – 4

Mejotska aneuploidija u čoveka se javlja sa visokom učestalošću i predstavlja glavni uzrok ranih spontanih pobačaja. Trisomije autosoma su zastupljene sa približno 52% od ukupnog broja hromosomskih aberacija (tab. 4.2). Savremenim citogenetičkim tehnikama su, u tkivima rano abortiranih fetusa otkrivene trisomije svih autosoma, izuzev hromosoma 1 koji obuhvata oko 10% genoma, što predstavlja veliki genetički disbalans, koji selekcija eliminiše vrlo rano, pre nego što embrion postane dostupan ispitivanju. Ako pretpostavimo da svi hromosomi imaju istu podložnost za neodvajanje, zapažamo da se relativna učestalost pojedinih trisomija znatno razlikuje od očekivane. Najčešća je trisomija hromosoma 16, prisutna u oko 32,3% fetusa sa hromosomskom aberacijom, a relativno često se sreću i trisomije akrocentričnih hromosoma, kao i hromosoma 18. Trisomije i polisomije polnih hromosoma se retko nalaze u tkivima rano abortiranih fetusa (tab. 4.3).

Tabela 4.3

BROJ TRISOMIJA RAZLIČITIH AUTOSOMA U SPONTANIM ABORTUSIMA		
HROMOSOM	BROJ TRISOMIČNIH ABORTUSA	PROCENAT
1	0	0,0
2	33	9,4
3	4	0,6
4	17	2,5
5	1	0,2
6	3	0,5
7	27	4,0
8	26	3,9
9	18	2,7
10	13	2,0
11	2	0,3
12	7	1,0
13	31	4,6
14	31	4,6
15	52	7,7
16	216	32,3
17	4	0,6
18	34	5,1
19	1	0,2
20	18	2,7
21	63	9,4
22	68	10,2
UKUPNO	669	100,0

Kako neodvajanje hromosoma može dovesti do dva tipa abnormalnih zigota, na osnovu zakona segregacije hromo-

soma u mejozi, očekivali bismo i istu učestalost monosomija u ćelijama fetusa abortiranih u I trimestru trudnoće. Međutim, monosomije autosoma su izuzetno retke, što nam govori da ih prirodna selekcija eliminiše znatno ranije, možda u implantacionom ili čak preimplantacionom stadijumu embriona. Ova pretpostavka je i potvrđena uspostavljanjem eksperimentalnog animalnog modela monosomije u miša; pokazalo se da se one mogu otkriti samo pre ili u toku blastulacije, a ni jedan tip monosomije nije utvrđen u srednjoj ili kasnoj gestaciji. Znači da je nedostatak hromosoma štetniji od viška hromosoma. Ovi štetni efekti se mogu tumačiti ne samo efektom doze normalnih alela već i činjenicom da se recesivni geni mogu fenotipski izraziti u hemizigotnom stanju, što znači u jednostrukoj dozi, jer nema alelnih gena koji bi sprečili njihovu ekspresiju. Jedina česta monosomija, zastupljena u 17-25% fetusa sa hromosomskom anomalijom, jeste monosomija X hromosoma. Oko 99% fetusa sa monosomijom X umire in utero. Ispitivanja su pokazala da bi uzrok visoke letalnosti monosomije X mogao biti produženo generacijsko vreme ovih ćelija (usporene deobe ćelija embriona). Interesantno je da malobrojni fetusi XO (1-2%) koji prežive intrauterini stadijum imaju sasvim dobre prognoze za život u postnatalnom periodu.

Spontani abortusi u II trimestru trudnoće su u manjem stepenu uslovljeni hromosomskim aberacijama. Spektar hromosomskih anomalija u abortusima u I i II trimestru se razlikuje. Retke su poliploidije i trisomije 16, a češće se sreću aberacije koje se nalaze i u živorođenoj populaciji.

U mrtvorođenih hromosomske aberacije se nalaze u 5-10%, a trisomija hromosoma 18 je najčešća hromosomska aberacija.

Ranije pomenute procene učestalosti hromosomskih aberacija su nepotpune. Japanski istraživači su analizom hromosoma fetalnih tkiva spontanih i iz socioekonomskih razloga indukovanih abortusa utvrdili da je incidencija hromosomskih aberacija bila slična, 6,8 i 6,4%. Još uvek međutim, nije poznata incidencija klinički neotkrivenih ranih spontanih pobačaja, pa se na osnovu nekih ispitivanja procenjuje da 33% embriona spontano abortira pre nego što se klinički utvrdi graviditet. Ako uzmemo u obzir, kako je ranije naglašeno, da se trisomije i monosomije hromosoma javljaju sa istom učestalošću, tada bi oko 50% konceptusa bilo aneuploidno.

Na prvi pogled, ovaj veliki gubitak potomaka prouzrokovan hromosomskim aberacijama ukazivao bi na značajan nedostatak u reproduktivnoj adaptivnoj vrednosti naše vrste. Dubljim uvidom, međutim, problem se može posmatrati i sa drugog aspekta, koji je doveo do sledeće hipoteze: potomstvo čoveka zahteva mnogo nege roditelja za duži vremenski period. Bilo koji mehanizam koji smanjuje broj živorođenih od mogućeg maksimalnog na optimalni i produžuje interval rađanja, a život majke ne dovodi u opasnost, može imati selektivnu prednost.

Rani abortusi prouzrokovani hromosomskim aberacijama mogli su zadovoljiti ove zahteve u primitivnim uslovima života naših predaka, jer majke nisu bile izlagane čestom rađanju dece. Tako se u humanim populacijama ukupan broj dece po majci značajno smanjivao mehanizmom spontanih pobačaja.

HROMOSOMOPATIJE U ŽIVOROĐENOJ POPULACIJI

Mada je letalnost autosomnih trisomičnih zigota vrlo velika, neke trisomije su kompatibilne sa životom i prisutne su u živorođenoj populaciji (tab. 4.4).

Tabela 4.4

BRIJ ŽIVOROĐENIH SA TRISOMIJOM AUTOSOMA				
BROJ DECE SA TRISOMIJOM				
Hromosom	Nemozaičan tip	Mozaik	Nepoznato	Ukupno
1				0
2				0
3			2	2
4				0
5				0
6				0
7	2	4		6
8	4	81	13	98
9	10	16		26
10	1	6		7
11				0
12		2		2
13				1/12000
14		8	1	9
15	1			1
16	1	2	3	6
17				0
18				1/6000
19		1		1
20	2			1
21				1/700
22	30	2		32

Trisomija hromosoma 21 (Downov sindrom)

Ova autosomna trisomija je najčešća, jedno dete na 700 živorođene dece ima trisomiju 21. Podsetimo se da je incidencija ove aberacije znatno veća u momentu začeća, ali više od 60% trisomičnih fetusa spontano abortira, a oko 20% su mrtvorođeni.

Najizrazitiji fenotipski efekti trisomije 21 su mentalna retardacija i kongenitalne anomalije srca praćene u različitom stepenu izraženim anomalijama drugih organa.

Trisomiju hromosoma 21 karakteriše i povećan rizik za pojavu akutne leukemije i prevremeno starenje.

Na osnovu ispitivanja parcijalnih trisomija utvrđeno je da je samo distalni deo dugog kraka (21q22) odnosno 1/8 do 1/5 hromosoma 21 značajan za patogenezu ovog sindroma.

Najveći broj slučajeva Downovog sindroma (95%) ima prostu trisomiju hromosoma 21 (sl. 4.39). Trisomija najčešće nastaje usled grešaka u mejozi majke. Mozaicizam se javlja u 1-2% pacijenata i klinička slika je u ovim slučajevima slabije izražena. U oko 5% slučajeva trisomija 21 nastaje usled translokacije, kada je jedan roditelj nosilac balansirane translokacije u kojoj učestvuje hromosom 21 ili translokacija nastane de novo u mejozi jednog od roditelja. (sl. 4.36)

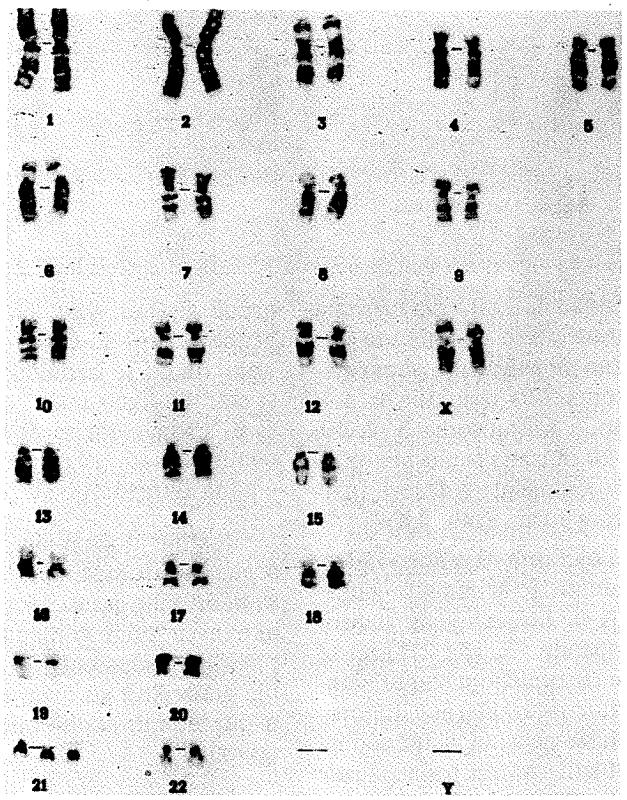
Najnovija istraživanja su pokazala da se Downov sindrom javlja i u dece sa naizgled normalnim kariotipom. U ovim slučajevima je u pitanju duplikacija malog segmenta 21q 22 oko 2.000 kb koji je odgovoran za fenotipske karakteristike ovog sindroma. Ovaj duplirani segment može biti posledica roditeljske balansirane translokacije ili inverzije.

Trisomija hromosoma 18 (Edwardsov sindrom)

Incidencija ove trisomije je 1/6.000 novorođenčadi, dok 95% fetusa sa ovom trisomijom završava spontanim pobačajem (sl. 4.40). Među živorođenom decom preovlađuje ženski pol, što dokazuje da se fetusi muškog pola češće eliminišu spontanim pobačajem. Fenotip novorođenčadi sa ovom trisomijom se odlikuje multiplim anomalijama. Ova deca umiru brzo posle rođenja, samo oko 10% preživi prvu godinu života. Neodvajanje hromosoma u mejozi roditelja je glavni uzrok ovog sindroma. Retko sindrom nastaje usled balansirane translokacije jednog od roditelja, a još ređe se javlja mozaicizam koji prouzrokuje znatno blažu kliničku sliku.

Trisomija hromosoma 13 (Patauov sindrom)

Učestalost ove trisomije se kreće oko 1/12.000 novorođenčadi. Deca su sa multiplim malformacijama i, kao u prethod-



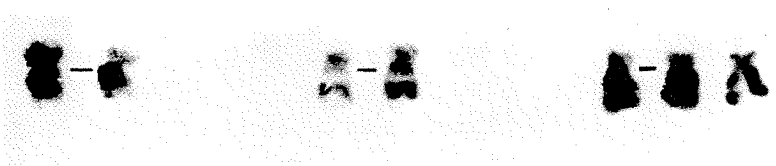
Slika 4.39 – Kariotip deteta sa trisomijom hromosoma 21

nom slučaju, samo oko 10% preživi prvu godinu. Najčešći uzrok trisomije 13 je neodvajanje hromosoma u mejozi roditelja. U oko 20% slučajeva jedan roditelj je nosilac balansirane translokacije, a u 5% slučajeva je prisutan mozaicizam (sl. 4.41).

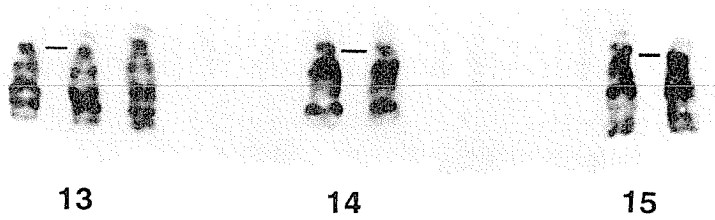
Trisomija hromosoma 8

Pre primene tehnika traka nije bilo moguće definisati ovaj sindrom, jer se nije znalo koji je hromosom iz grupe C u trisomičnom stanju. Većina do sada opisanih pacijenata ima ovu trisomiju u mozaičnoj formi uz prisustvo normalne ćelijske linije, pa zato i njihov fenotip varira zavisno od distribucije ćelijskih linija u organizmu. U svetskoj literaturi do sada je opisano oko 100 slučajeva trisomije 8 (sl. 4.42).

Ostale trisomije autosoma u živorođenim populacijama se javljaju toliko



Slika 4.40 – Parcijalni kariotip novorođenčeta sa trisomijom hromosoma 18



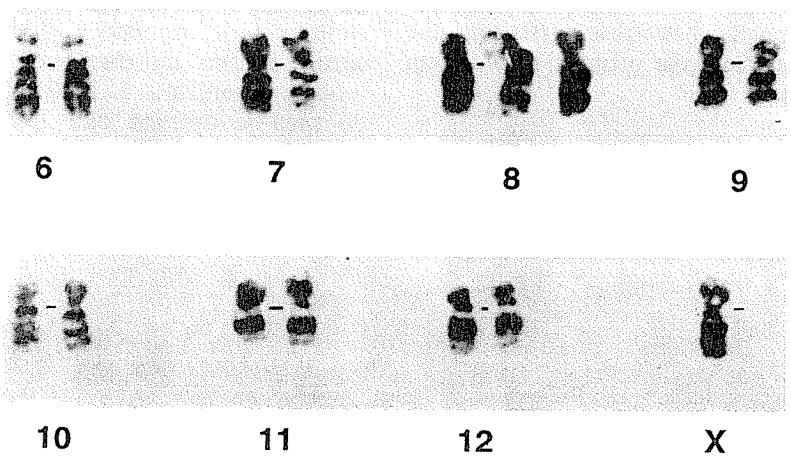
Slika 4.41 – Parcijalni kariotip novorođenčeta sa trisomijom hromosoma 13

retko da se ne može dati nikakva procena njihove učestalosti. Kao kompletne trisomije potvrđene su više puta samo trisomija hromosoma 22 i trisomija 9, dok su ostale trisomije hromosoma 3, 7, 10, 12, 15, 16, 19 i 20 opisane samo nekoliko puta ili kao pojedinačni slučajevi, najčešće u mozaičnoj formi (tab. 4.4).

Učestalost pojedinih trisomija autosoma u živorođenih je u izrazito negativnoj korelaciji sa brojem gena u hromosomu. Hromosomi 13, 18 i 21, koji se najčešće sreću u trisomičnom stanju, imaju veliku količinu interkalarnog heterohromatina i prema genskoj mapi sadrže najmanji broj lokalizovanih gena (izuzev hromosoma 20). Od drugih trisomija, najčešća je trisomija 8 u mozaičnoj formi, to je hromosom sa najmanjim brojem lokalizovanih gena među hromosomima grupe C (tab. 4.5). Drugi hromosom iz grupe C koji se češće nalazi u trisomičnom stanju je hromosom 9, koji takođe sadrži relativno malo lokalizovanih gena. Ovaj hromosom se često sreće kao parcijalna trisomija, a nađene su čak i parcijalne tetrasomije 9.

Postoje dokazi da rano replicirajući segmenti hromosoma (Q tamni, G svetli) sadrže važne housekeeping gene, koji su aktivni u svim ćelijama, dok kasno replicirajući segmenti (Q svetli) imaju manje gena, koji su osim toga aktivni samo u određenim stadijumima ili određenim tkivima.

Čak i među genetički aktivnijim Q-tamnim regionima postoji razlika, neki su bogatiji genima nego drugi i/ili sadrže posebno značajne gene.



Slika 4.42 – Parcijalni kariotip pacijenta sa trisomijom hromosoma 8

Tabela 4.5

BROJ ŽIVOROĐENIH SA TRISOMIJOM, SPONTANIH POBAČAJA SA TRISOMIJOM, LOKALIZACIJA GENA, I % DUŽINE HROMOSOMA

HROMOSOM	BROJ ŽIVOROĐENIH SA TRISOMIJOM	BROJ ABORTUSA SA TRISOMIJOM	BROJ LOKALIZOVANIH GENA	% DUŽINE HROMOSOMA
1	0	0	69	9,25
2	0	53	37	8,63
3	2	8	20	7,12
4	0	26	32	6,69
5	0	1	22	6,41
6	0	3	62	6,23
7	6	46	38	5,58
8	98	37	19	5,08
9	26	33	26	4,95
10	7	22	21	4,76
11	0	2	53	4,78
12	2	9	38	4,70
13	1/12000	63	16	3,29
14	9	51	31	3,12
15	1	75	19	2,89
16	0-6	326	28	3,27
17	0	7	32	3,03
18	1/6000	51	13	2,80
19	1	1	32	2,43
20	2	28	9	2,35
21	1/700	89	14	1,26
22	0-32	107	18	1,38

Parcijalne trisomije

Mada su poznate parcijalne trisomije svih hromosoma, pomenućemo samo nekoliko:

- trisomija-4p – anomalije lica, anomalije prstiju, deformiteti stopala,
- trisomija-5p – mentalna retardacija, klinodaktilija, nanizam,
- trisomija-9p – anomalije lica, velike, nisko postavljene uši, mentalna
- retardacija,
- trisomija-12p – anomalije lica, kratki prsti ruku i nogu,
- trisomija-14p – anomalije lica, klinodaktilija, kongenitalna bolest srca.

Među živorođenom decom skoro nema kompletne monosomije autosoma i, kako je ranije naglašeno, vrlo malo je utvrđeno i u tkivima spontano abortiranih fetusa. Izuzetno retko se sreće kompletna monosomija hromosoma 21; prvi put je opisana 1972. god. Danas postoje mogućnosti da se na dva načina dokaže kompletna monosomija hromosoma 21: ispitivanjem enzima SOD-1 (bakar-superoksid-dismutaza) i hibridizacijom in situ.

Smanjena doza ovog enzima za 50% potvrđuje da je u pitanju kompletna monosomija (gen za ovaj enzim je lociran u 21q 22), a hibridizacija in situ potvrđuje da ne postoji u hromosomskom komplementu mali fragment sa hromosoma 21 translociran na neki drugi hromosom.

Delecije ili parcijalne monosomije hromosoma

del ($4p^-$) – Wolf-Hirschornov sindrom, odlikuje se mentalnom retardacijom, izrazitim poremećajem rastenja, anomalijama lica i dr. Ove aberacije u 90% slučajeva nastaju de novo, a 10% je

rezultat mozaicizma ili translokacije u jednog roditelja.

del (5p14 – 15) – sindrom mačjeg plača (cri du chat). I ova delecija se uglavnom javlja sporadično, a u 10% slučajeva je posledica mozaicizma i roditeljske translokacije, inverzije ili ring hromosoma.

Novorođenče sa ovim sindromom se oglašava karakterističnim, monotonim plačem, kao maukanje mačke. Sindrom se sreće u 1% dece sa mentalnom retardacijom. Niz anomalija, među kojima su mikrocefalija, antimongoloidni položaj očiju, uši nisko postavljene, karakteriše ovaj sindrom. Mnogi bolesnici dožive zrelost iako su umno teško zaostali.

Nedavna ispitivanja na nivou DNK osoba sa delecijama 5p su pokazala, da postoje dva kritična regiona za ovaj sindrom. Region koji je odgovoran za mačji plač mapira se u 5p15.3, i jedan mali region za sve ostale kliničke karakteristike sindroma mapira se u 5p15.2.

Delecije koje ne obuhvataju ova dva hromosomska regiona određuju različite fenotipske karakteristike od mentalne retardacije do normalnog fenotipa. Zato je tačna identifikacija delecije izuzetno značajna za prenatalnu dijagnozu i kliničko predviđanje fenotipa.

del (13q$^-$) odlikuje se mentalnom i motornom retardacijom, mikrocefalijom, anomalijama lica i dr. Delecija segmenta 13q prouzrokuje retinoblastom (tumor oka).

del (18q$^-$) – De Grouchijev sindrom, sa izraženom mentalnom retardacijom, oblikom usta kao u šarana, anomalijama uški, u većini slučajeva se javlja sporadično, a može biti i posledica balansiranih strukturnih prerasporeda hromosoma jednog od roditelja.

del (18p$^-$) – De Grouchijev sindrom, karakterišu mentalna retardacija, anomalije oka, ušiju i centralnog nervnog sistema. Skoro svi opisani slučajevi su sporadični.

del (21q$^-$) – antimongoloidni položaj očiju, poremećaj rasta, mikrognatija, skeletne anomalije. Ova delecija je uglavnom posledica balansiranih strukturnih prerasporeda u jednog od roditelja.

5

Determinacija i diferencijacija pola

Prva saznanja o hromosomima koji imaju ulogu u determinaciji i diferencijaciji pola usledila su krajem prošlog veka. Naučni prilaz rešavanju ovog problema postao je moguć tek posle otkrića Mendelovih zakona i citološkog proučavanja hromosoma. Najrasprostranjeniji tip genetičkog mehanizma determinacije pola kod viših životinja i nekih biljaka je izražen u pojavi homogametskog i heterogametskog pola, tj. XX- i XY-gonosomne konstitucije, i zato je odnos polova u populaciji ovih grupa 1:1.

Razlikuje se genetički, gonadni i fenotipski pol. Genetički pol je određen hromosomskom konstitucijom zigota, gonadni pol je određen prisustvom gonada jednog ili drugog pola, a fenotipski pol označava spoljašnje manifestacije pola.

Gonade predstavljaju primarne polne odlike, a sekundarne polne odlike obuhvataju: polne odvode, spoljašnje polne organe i sve fenotipske odlike koje karakterišu polove. Na primer, kod čoveka u ženskog pola su izražene mlečne žlezde, razvijeni su kukovi, karakteristični su ženski stas, ženski tip kosmatosti, odsustvo brade i brkova, glas, ponašanje i dr.

U kariotipu čoveka nalazi se, znači, i par hromosoma označenih kao polni hromosomi, jer sadrže gene za determinaciju, diferencijaciju i funkciju pola.

Ženski pol se odlikuje parom istih hromosoma XX, u kojima se pored gena za diferencijaciju pola nalazi i veliki broj drugih gena, koji kontrolišu različita somatska svojstva pa i vijabilitet jedinke. Do sada je mapirano oko 170 genskih lokusa na ovom hromosomu. Muški pol se karakteriše sa dva različita polna hromosoma X i Y. Za razliku od X-hromosoma, Y-hromosom je znatno manji i po veličini i obliku odgovara grupi G-hromosoma.

Y hromosom se sastoji od euhromatičnog i heterohromatičnog regiona koji sadrži 30-40% DNK Y hromosoma. Euhromatični deo obuhvata ceo kratak krak (Yp) i proksimalni deo dugog kraka (Yq), a heterohromatični distalni deo dugog kraka i centomerni region, (sl. 5.1). Distalni delovi kratkih krakova X i Y hromosoma se sastoje iz terminalnih subregiona koji su homologi i između njih se vrši crossing over. Ovaj deo X i Y hromosoma je označen kao "pseudoautosomni" region, (sl. 5.2) jer geni smešteni u tom delu ne slede pravila nasleđivanja vezana za polne hromosome. Ispod pseudoautosomnih regiona su subregioni specifični za X i Y hromosome.

Sada postoje dokazi da i u distalnim delovima dugih krakova X i Y hromosoma postoje homologi, pseudoautosom-

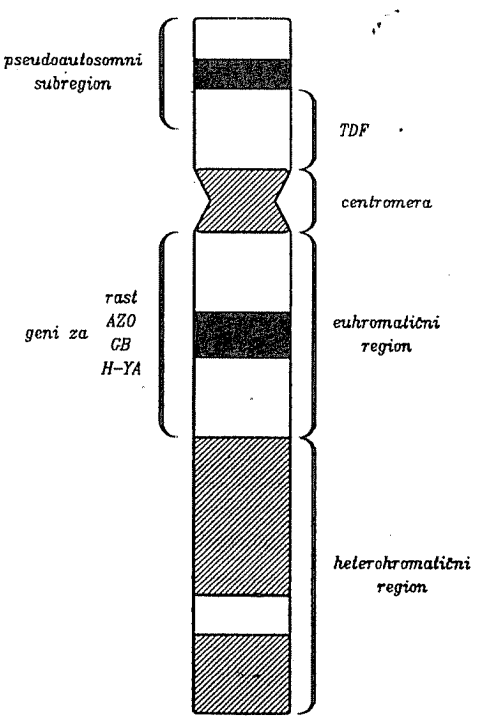
ni regioni između kojih se formira sinaptonemalni kompleks i vrši crossing over u mejozi muškarca.

U čoveka ženski pol je homogametski, jer obrazuje samo jedan tip gameta sa X-hromosomom, a muški pol je heterogametski, sa dva tipa gameta koji sadrže X- ili Y-hromosom.

Uprkos činjenici da u individua muškog pola postoji samo jedan X-hromosom, a u ženskog pola dva, polovi se međusobno razlikuju samo po primarnim i sekundarnim polnim odlikama.

Još 1949. god. dva kanadska istraživača, Barr i Bertram zapazili su kondenzovana hromatinska tela u interfaznim jedrima nervnih ćelija ženke mačke, koja nisu bila prisutna u ćelijama mužjaka. Kasnije su ova tela nađena i u drugim tkivima.

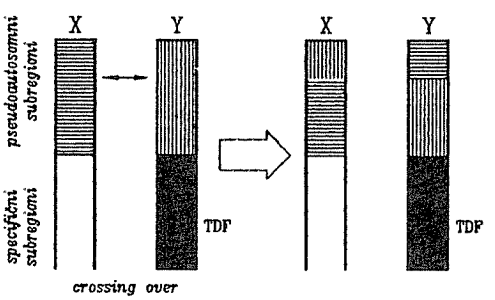
Deset godina kasnije Russell i Ohno, nezavisno jedan od drugog, ukazali su da



Slika 5.1 – Genska mapa Y hromosoma.

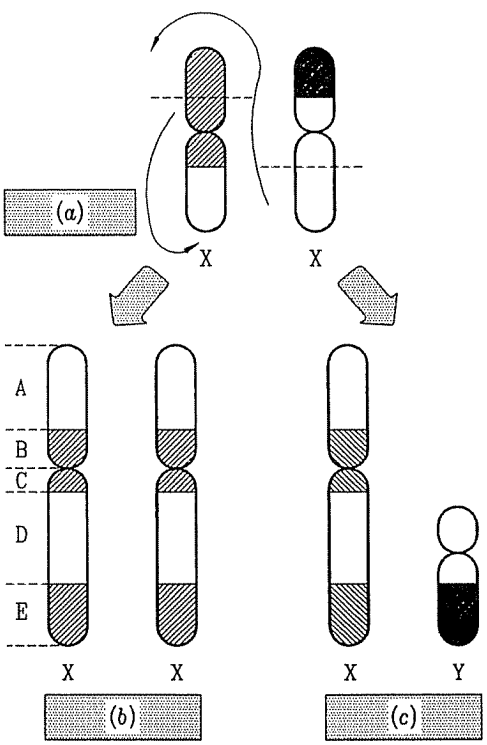
ovo kondenzovano hromatinsko ili Barrovo telo predstavlja jedan X-hromosom, a Taylor (1960) pokazuje da se ovaj kondenzovani X-hromosom replicira u kasnoj S-fazi. Potom M. Lyon uspostavlja vezu između prisustva polnog hromatina i njegovog funkcionalnog značaja i dokazuje da kondenzovani X-hromosom može biti očevog ili majčinog porekla i da je funkcionalno inaktivan. Za ovo je M. Lyon dala niz dokaza, najpre da je samo jedan X-hromosom neophodan za normalno razviće individue ženskog pola, a zatim da su heterozigoti za određene gene smeštene na X-hromosomima funkcionalni mozaici, što se može jasno uočiti analizom aktivnosti enzima glukozo-6-fosfat-dehidrogenaze-(G6FD). Ovaj enzim se nalazi u skoro svim formama života pa i u čoveka. Prisustvo ovog enzima je neophodno u svim tkivima jednog organizma. U čoveka postoje različite varijante ovog enzima. Muškarci sa jednim X-hromosomom imaju uvek samo jednu varijantu enzima, a žene sa dva X-hromosoma mogu biti heterozigoti za ovaj gen, pa imaju po dve forme istog enzima, koje se mozaično javljaju u različitim tkivima zavisno od toga koji je X-hromosom aktivan. Ovakvo ponašanje X-hromosoma je odlika ženskog pola svih sisara i čoveka.

Inaktivacija X-hromosoma. Mehanizam, evolutivno poreklo i značaj fenomena inaktivacije X-hromosoma pokušali su da objasne M. Lyon i Hoo. Prema



Slika 5.2 – Shematski prikaz kratkih krakova X i Y hromosoma.

njihovim teorijama, progresivna modifikacija jednog u evolutivnoj prošlosti homologog para hromosoma dovela je do pojave malog diferencijalnog segmenta na Y-hromosomu, koji sadrži gene za diferencijaciju muških gonada. Translokacijom velikog dela homologih regiona sa Y-hromosoma na X-hromosom nastupila je duplikacija znatnog broja gena u X-hromosomu (sl. 5.3). Prema ovom modelu, segmenti A i D su homologi i u evolutivnoj prošlosti naše vrste su bili smešteni na dugim kracima jednog homologog para hromosoma. U ovim segmentima nalazili bi se geni koji kontrolišu somatska svojstva. Geni neophodni za diferencijaciju i funkciju ovarijuma bili su na kratkim kracima, a to su segmenti B i E u X-hromosomu savremenog čoveka (sl. 5.3).

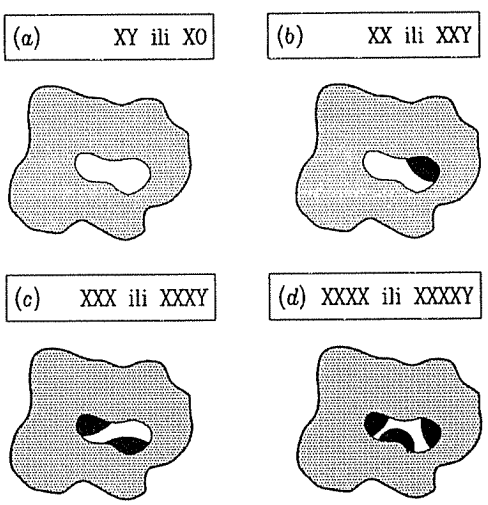


Slika 5.3 – Evolutivni model formiranja X i Y hromosoma

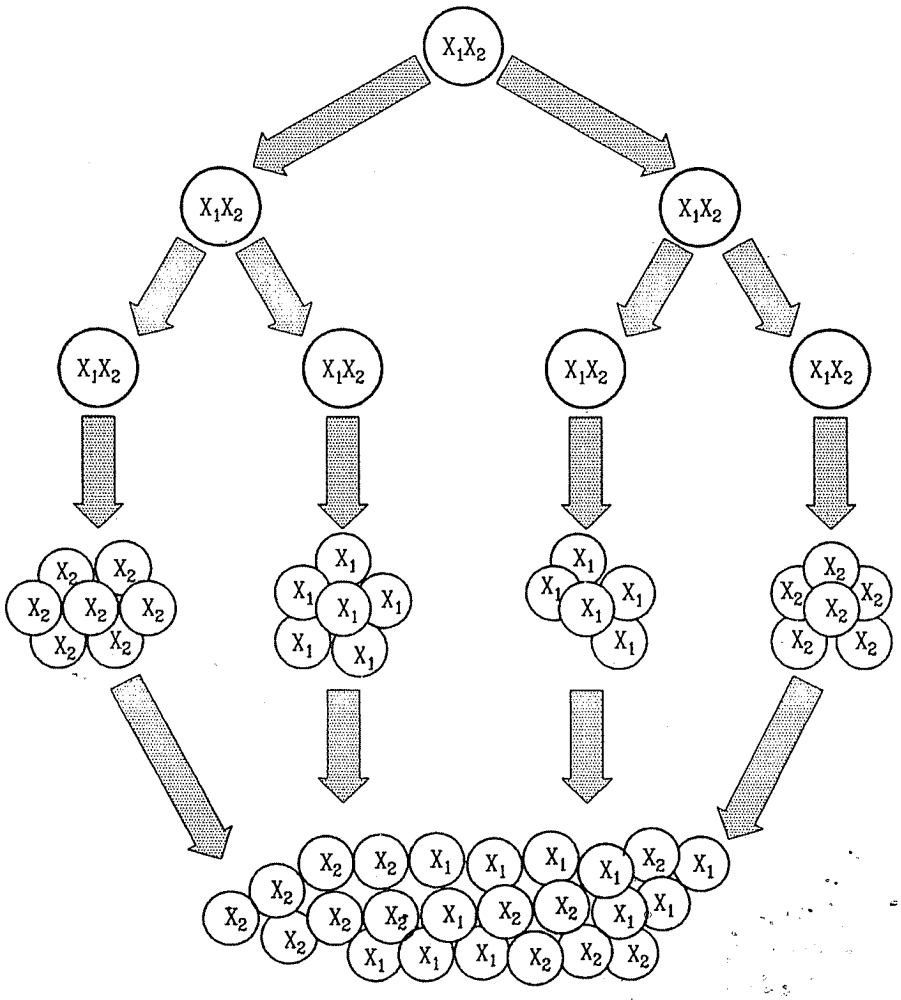
Inaktivacija jednog X-hromosoma, ili bar inaktivacija A- i D-segmenata, sprečila je štetne efekte povećane količine genetičkog materijala u ženskom polu i omogućila istu dozu gena u oba pola (doza kompenzacije). U osoba sa hromosomskom aberacijom, trisomijom ili polisomijom X-hromosoma ostaje uvek aktivan samo jedan X, a ostali se inaktivišu (sl. 5.4). Ovaj kontrolni mehanizam je osigurao prisustvo uvek samo jednog aktivnog X-hromosoma po hromosomskom komplementu.

Od otkrivanja ovog fenomena do danas proces inaktivacije X-hromosoma se intenzivno proučava. U toku gametogeneze, u oocitima su aktivna oba X hromosoma, a u spermatocitima oba polna hromosoma X i Y su inaktivni. Posle oplođenja, rano u toku embriogeneze, na stadijumu blastocista, kada se ženski embrion čoveka sastoji od 1000-2000 blastomera, jedan X hromosom se diferencira tako da ne odgovara više na signale koji regulišu transkripciju gena i nastupa fakultativna heterohromatizacija.

Inaktivacija X hromosoma je jedan od fundamentalnih razvojnih procesa koji



Slika 5.4 – Barova tela u normalne žene i osoba sa numeričkim aberacijama X hromosoma



Slika 5.5 – Inaktivacija jednog X hromosoma u toku embriogeneze

uključuje i genomski otisak (genomic imprinting), a to je pojava da hromosom „pamti" roditeljsko poreklo. Naime, kada započne inaktivacija u ekstraembrionalnim ćelijama preferencijalno se inaktiviše X hromosom poreklom iz spermatozoida, dok je kasnije u svim ostalim tkivima embriona inaktivacija slučajna. Znači, koji će X postati inaktivan, poreklom od oca ili majke stvar je slučaja, ali kada se jednom inaktiviše u jednoj ćeliji, sve ćelije koje nastaju iz ove ćelijske linije imaće inaktivan isti X hromosom (sl. 5.5). Ovo je takođe vrsta genomskog otiska koji markira jednom inaktivisani X hromosom, da se kao takav prenosi iz ćelije u ćeliju u toku ćelijskih deoba.

Ako se u ćelijama embriona nalazi strukturna aberacija X-hromosoma, inaktivacija je u početku slučajna, a kasnije selekcija određuje koji će obrazac inaktivacije dominirati. Naime, selekcija favorizuje ćelije sa inaktivisanim aberantnim X-hromosomom. Po drugoj hipotezi, obrazac inaktivacije aberantnog X-hromosoma je pod genetičkom kontrolom.

U slučaju recipročnih translokacija između X-hromosoma i autosoma, normalan X-hromosom se inaktiviše, jer se na taj način sprečava inaktivacija autosoma, sa kojim je X-hromosom u translokaciji. Kada je u pitanju nasleđena, nebalansirana translokacija između X-hromosoma i autosoma, tada se inaktiviše aberantni X-hromosom.

Ovi obrasci inaktivacije X-hromosoma ne moraju uvek biti zastupljeni u svim tkivima jedne individue, što će uticati na definitivnu kliničku sliku pacijentkinje.

Još uvek su nedovoljno poznati mehanizmi koji započinju i održavaju inaktivno stanje X-hromosoma. Na osnovu najnovijih saznanja ceo proces inaktivacije X hromosoma se može podeliti u tri stupnja: inicijaciju, širenje i održavanje inaktivnog stanja.

Na dugom kraku ispod centromere u regionu Xq13, nalzi se *centar inaktivacije* X hromosoma, unutar koga je genski lokus koji ima ulogu u inicijaciji inaktivacije X hromosoma. Ovaj gen se prepisuje isključivo sa inaktivnog X hromosoma, a prepis gena je jedna ekstremno velika RNK, koja se zadržava u jedru i pretpostavlja se da učestvuje u formiranju Barrovog tela. Da je ekspresija ovog gena povezana sa inaktivacijom X hromosoma, dokaz je postojanje ove RNK u germinativnim ćelijama testisa, a to su jedine ćelije u muškom polu u kojima se X hromosom inaktiviše.

Noviji podaci ukazuju da je metilacija DNK kontrolni mehanizam aktivnosti gena u X hromosomu, pa se zaključuje, da metilacija ima dominantnu ulogu u širenju i održavanju inaktivacije, transmisiji inaktivnog stanja u toku ćelijskih deoba, kao i „pamćenju" da uvek isti X hromosom ostaje inaktivan.

Samo onaj X hromosom koji ima centar inaktivacije može da se inaktiviše. Aberantan X hromosom bez ovog segmenta ostaje uvek aktivan, što ima uglavnom letalne efekte, jer se tada inaktiviše normalan X hromosom.

Heterohromatični – inaktivni X-hromosom se kasno replicira u S-potfazi interfaze, ali inaktivacija nije potpuna. Primenom odgovarajućih tehnika je otkriveno da na oba kraka inaktivnog X-hromosoma postoje segmenti koji ne podležu inaktivaciji. Na kratkom kraku se nalaze dva distalna segmenta Xp22,13 i Xp22,3 koji se rano repliciraju i u kojima se nalaze geni za krvnu grupu Xg, steroidnu sulfatazu i gen koji verovatno kontroliše sintezu H-Y-antigena.

Najnovija istraživanja na molekularnom nivou su pokazala, da postoji još niz gena na oba kraka inaktivnog X hromosoma, sa obe strane centromere, koji ne podležu inaktivaciji. Ovi aktivni geni su raspoređeni naizmenično sa inaktivnim genima i imaju funkcionalno homologe gene, kao i pseudogene na Y hromosomu.

Prisustvo aktivnih segmenata na inaktivnom X-hromosomu uslovljava pojavu određene kliničke slike u individua sa nedostatkom ili viškom X-hromosoma. Kada bi inaktivacija X-hromosoma bila potpuna, osobe sa aberantnim X-hromosomom bile bi fenotipski normalne.

Iako neki segmenti i geni koji se u njima nalaze ostaju uvek aktivni u inaktivnom X-hromosomu, detaljnija ispitivanja su pokazala da aktivni geni u inaktivnom X-hromosomu produkuju manju količinu genskog produkta nego što bismo očekivali kada bi oba gena bila podjednako aktivna. Na ovu pojavu su ukazala ispitivanja koncentracije steroidne sulfataze (SF) u normalnih žena i muškaraca, kao i mozaika X0/XXX, gde bi odnos koncentracije SF u monosomičnim i trisomičnim ćelijama trebalo da bude 1:3, a iznosio je 1:1,8. Ove činjenice ukazuju na postojanje sekundarnog mehanizma parcijalne doze kompenzacije,

koji je verovatno izazvan modifikovanom metilacijom DNK, i koji dovodi do diferencijalne ekspresije ovih genskih lokusa na inaktivnom X-hromosomu.

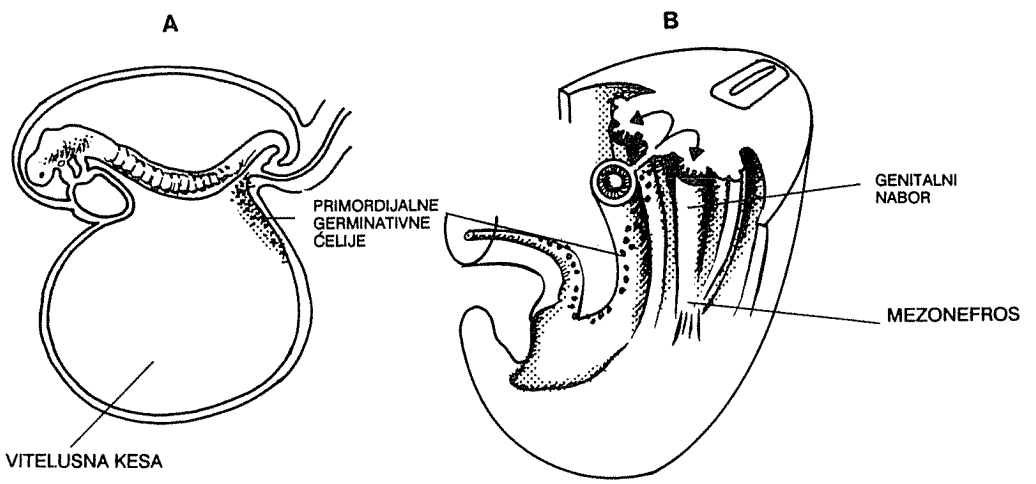
Ponašanje X- i Y-hromosoma u mejozi

U procesu oogeneze, verovatno pred početak mejoze, jedan od ranije inaktivisanih X-hromosoma se reaktivira, jer oba X-hromosoma moraju biti aktivni u transkripciji mejocita. Nasuprot tome, u mejozi spermatogeneze oba polna hromosoma, X i Y, nalaze se u obliku polne vezikule u kondenzovanom stanju od zigotena do diplotena i ne prepisuju se u toku mejoze.

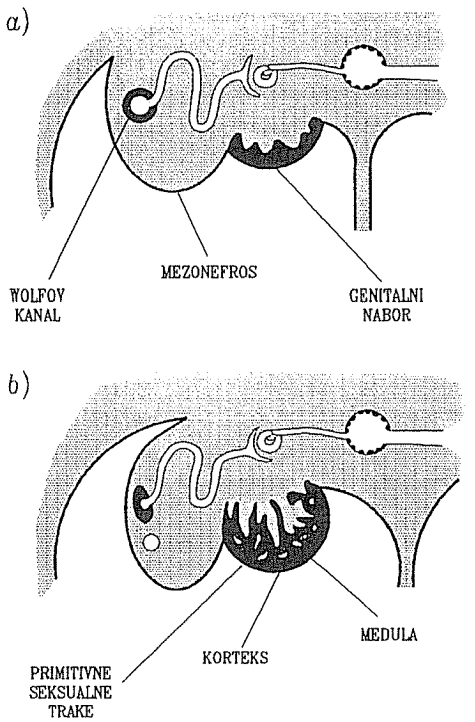
Diferencijacija gonada

U početnim fazama razvića embriona diferencijacija gonada oba pola vrši se na isti način. U ovom stadijumu embrionalne gonade su indiferentne, bipotencijalne i mogu se dalje diferencirati kao muške ili ženske gonade zavisno od genetskog pola.

Gonade se formiraju iz mezoderma u vidu nabora sa obe strane dorzalne mezentere u blizini začetka mezonefrosa. Genitalni nabor nastaje proliferacijom celomskog epitela i grupisanjem mezenhimskih ćelija koje se nalaze ispod epitela (sl. 5.6.B). U nabor migracijom dospevaju krupne primordijalne germinativne ćelije, koje se javljaju rano u embriogenezi u zidu vitelusne kese (sl. 5.6A). U tom stadijumu njihov membranozni sistem je slabo diferenciran. Pred početak migracije ove ćelije se znatno menjaju, ER se razgranava, na njemu se javlja veliki broj ribosoma; razvija se Goldžijev sistem; povećava se broj mitohondrija; raste nivo alkalne fosfataze; nakupljaju se granule glikogena. Na ćelijama se pojavljuju pseudopodije, pomoću kojih se aktivno kreću do genitalnog nabora (sl. 5.6B), gde sa ćelijama celomskog epitela formiraju *germinativni epitel* ili *korteks*. U genitalne nabore proliferišu i ćelije mezonefrosnog blastema i formiraju *medulu ili srž gonada*. Daljom diferencijacijom korteksa formiraće se ovarijumi, a diferencijacijom medule testisi (sl. 5.7.a,b).



Slika 5.6 – A. Primordijalne germinativne ćelije u zidu vitelusne kese; B. Formiranje genitalnih nabora i mezonefrosa, migracija primordijalnih germinativnih ćelija



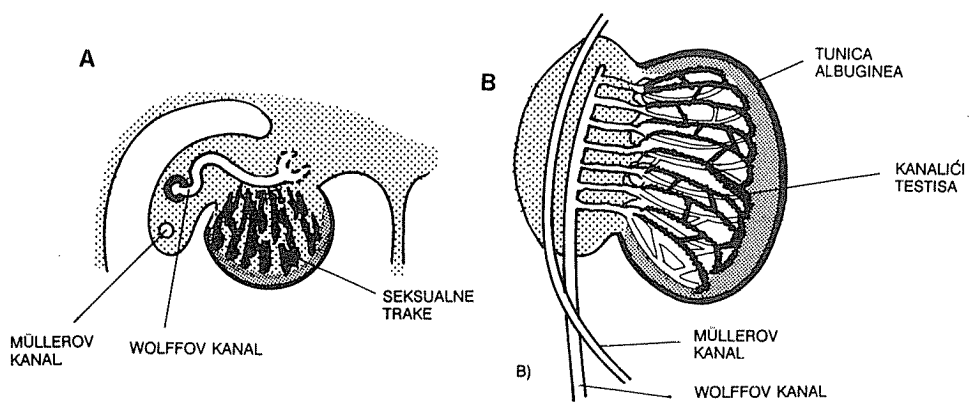
Slika 5.7 – a. Shematski prikaz začetka gonada; b. Stadijum indiferentnih gonada

Kako genitalni nabor prihvata primordijalne germinativne ćelije, još uvek nije poznato. Postoje dokazi, na osnovu eksperimenata in vivo i in vitro, da genitalni nabor privlači primordijalne germinativne ćelije. Kada je vršena transplantacija genitalnog nabora na drugo mesto u embrionu, germinativne ćelije su uvek migrirale u genitalni nabor bez obzira gde se on nalazi. Postoje pretpostavke da ćelije genitalnog nabora sintetišu supstancije steroidne prirode, koje imaju ulogu u privlačenju primordijalnih germinativnih ćelija, a i same ćelije, naročito njihov glikokaliks, imaju uticaja na ovo privlačenje.

Kada primordijalne germinativne ćelije nasele genitalne nabore, gube pseudopodije, ćelije celomskog epitela se umnožavaju, prodiru u mezenhim ispod nabora i formiraju niz traka nepravilnog oblika, koje obuhvataju primordijalne germinativne ćelije smeštene u mezenhimu – *primitivne seksualne trake.* U oba pola ove trake su u vezi sa epitelom na površini i to je stadijum *indiferentnih gonada* (sl. 5.7b).

Diferencijacija testisa

U genetski predodređenog mužjaka primitivne seksualne trake nastavljaju da proliferišu u vidu multiplih invaginacija, koje prodiru u medulu indiferentnih gonada. Ovo su ***primarne*** (testikularne) ***seksualne trake*** koje na preseku imaju izgled ispunjenih cevčica (sl. 5.8.A). Primarne



Slika 5.8 – Uzdužni presek testisa 8 nedelja (A) i 4 meseca (B) starih embriona

seksualne trake, obložene bazalnom membranom, sadrže dva tipa ćelija: primordijalne germinativne ćelije, od kojih će se formirati spermatogonije, i potporne ćelije nastale od ćelija celomskog epitela, koje se diferenciraju u Sertolijeve ćelije.

Posle izdvajanja primarnih seksualnih traka od epitela na površini od ovih nastaju semeni kanalići, koji se izdužuju, izuvijaju i odvajaju od epitela tankim slojem mezenhimskih ćelija, koje grade omotač testisa-tunica albuginea (sl. 5.8B). Male grupice mezenhimskih ćelija oko semenih kanalića diferenciraju se u intersticijalne Leydigove ćelije, u kojima se sintetišu androgeni, muški polni hormoni. Posle rođenja, u prepubertalnom periodu, semeni kanalići se vakuoliziraju i pojavljuje se centralni lumen.

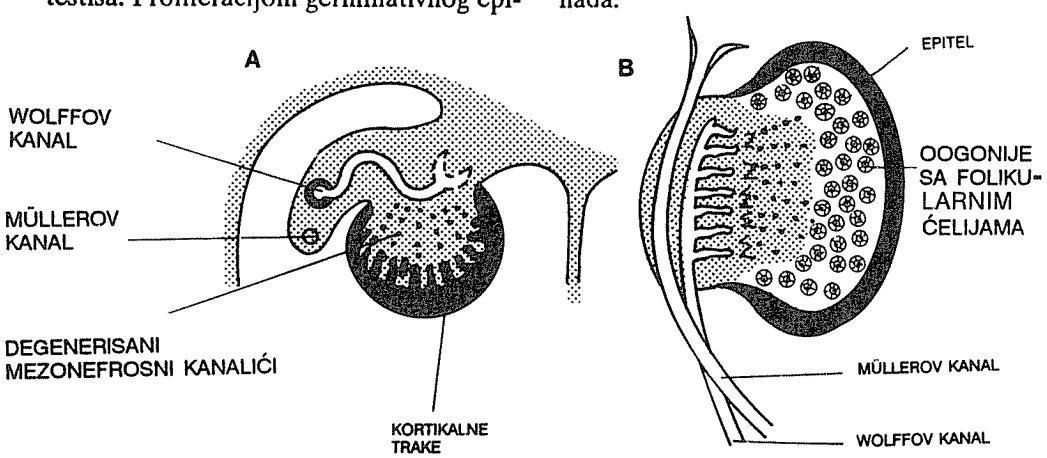
Semeni kanalići su preko finih kanalića rete testis u neposrednoj vezi sa kanalićima bubrega, mezonefrosa vasa efferentia, koji predstavljaju put za prolaz spermatozoida do muškog polnog odvoda ili Wolfovog kanala. U toku razvića medule u testis korteks indiferentne gonade potpuno atrofira (sl. 5.8B).

Diferencijacija ovarijuma

U početku teče kao i diferencijacija testisa. Proliferacijom germinativnog epitela korteksa formiraju se primarne germinativne trake koje zalaze u medulu, ove zatim atrofiraju i bivaju zamenjene novim *sekundarnim kortikalnim trakama* koje nastaju naknadno proliferacijom germinativnog epitela (sl. 5.9A). Sekundarne seksualne trake se nazivaju Pfligerove trake, a iz njih se formiraju folikuli ovarijuma. Od primarnih germinativnih ćelija nastaće oogonije, a od epitelnih ćelija folikularne ćelije. Oogonije se intenzivno dele mitotičkom deobom. Posle fragmentacije Pfligerovih traka oogonije prestaju da se dele, diferenciraju se u primarne oocite, koji su okruženi slojem folikularnih ćelija (sl. 5.9B). Razvićem korteksa u ovarijum medula se redukuje i atrofira. Redukcijom medule i primarnih seksualnih traka ovarijum gubi vezu sa mezonefrosom, pa se oociti oslobađaju rupturom zida ovarijuma.

Faktori diferencijacije pola

Od 1959. god. se zna da kod čoveka i drugih sisara Y-hromosom određuje pol. Embrion čoveka u čijim se ćelijama nalazi XY-gonosomna konstitucija razvija se kao muški pol, dok se embrion sa dva X-hromosoma razvija kao ženski pol. Tako je izveden zaključak da se na Y-hromosomu mora nalaziti gen ili geni koji kontrolišu diferencijaciju muških gonada.

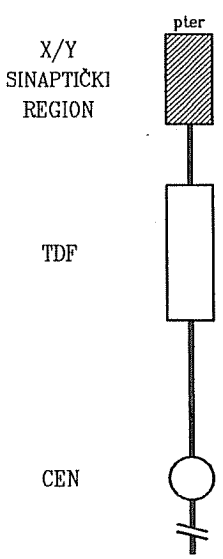


Slika 5.9 – Presek ovarijuma 7. nedelje razvića A i 5. meseca razvića B

Najnovija istraživanja na molekularnom nivou su potvrdila da se na kratkom kraku Y-hromosoma nalazi gen označen kao TDF (faktor diferencijacije testisa), jer njegovo prisustvo odnosno odsustvo određuje da li će se iz indiferentnih gonada formirati testisi ili ovarijumi. Proces diferenciranja gonada je krucijalni stupanj u diferencijaciji pola.

Primenom tehnika za molekularno mapiranje Y-hromosoma nedavno, je utvrđena lokacija TDF u distalnom delu kratkog kraka Y-hromosoma. (sl. 5.10). Da je ovaj segment DNK neophodan za formiranje testisa, potvrdila su ispitivanja hromosoma osoba sa reverzijom pola, a to su XX-muškarci, koji imaju formirane testise, i XY-žene, koje nemaju formirane testise, već nediferencirane gonade – stanje klinički označeno kao ***čista gonadalna disgeneza.***

Korišćenjem DNK-proba specifičnih za Y-hromosom utvrđeno je, da XX-muškarci imaju u jednom od X-hromosoma deo Y-hromosoma različite dužine, ali je uvek prisutan onaj segment koji sadrži TDF. Nasuprot tome, u nekih XY-žena nedostaje segment Y-hromosoma u kome se nalazi TDF. Pokazalo se da ovaj segment DNK u distalnom delu kratkog kraka Y-hromosoma nije duži od 140Kb (140 hiljada nukleotida).



Slika 5.10 – Parcijalna genska mapa kratkog kraka Y hromosoma

Godine 1990. pozicionim kloniranjem definisan je na kratkom kraku Y hromosoma SRY gen koji ustvari predstavlja TDF lokus. SRY se nalazi na udaljenosti 5 Kb od granice pseudoautosomnog regiona. Genski produkt SRY gena je protein od 204 aminokiseline, koji sadrži jedan domen od oko 80 aminokiselina, kojim se vezuje za sekvence DNK. Pošto se ovaj protein može specifično vezati za određene sekvence DNK, njegova funkcija se ogleda u regulaciji transkripcije drugih gena.

Na osnovu mnogih podataka koji svedoče o korelaciji između gonosomne konstitucije i fenotipa zaključeno je da ovaj TDF-lokus na Y-hromosomu ne može biti dovoljan za kontrolu složenog procesa diferencijacije pola. Tako je prihvaćeno gledište da se u ovaj proces moraju uključiti i geni X-hromosoma, kao i geni nekih autosoma.

Sada je opšte prihvaćeno i mišljenje da jedan antigen (molekul proteina) specifičan za pol ima primarnu ulogu u diferencijaciji testisa. Prvi antigen specifičan za pol je utvrđen još 1955. god., kao minorni antigen histokompatibilnosti. Ovaj antigen je uslovljavao odbacivanje transplantata kože mužjaka miša, koji je presađen visokosrodnoj (inbred) ženki, dok mužjaci nisu odbacivali transplantiranu kožu ženke. Kako se hromosomski set mužjaka i ženke razlikuje samo po Y-hromosomu, pretpostavljeno je da je gen koji kodira ovaj antigen smešten na Y-hromosomu i zato je označen kao ***H-Y-antigen*** (H=antigen histokompatibilnosti). Antigen specifičan za pol je kasnije potvrđen i in vitro, pomoću toksičnih T-limfocita. Ranih sedamdesetih godina otkrivena su i antitela za

antigen specifičan za muški pol. Ovo je omogućilo da se uporede antigeni specifični za pol u različitih vrsta. Vrlo brzo je postalo jasno da se ovaj serološki određen antigen očuvao tokom evolucije i da je prisutan u svih klasa kičmenjaka. Zapaženo je, da je njegovo prisustvo u pozitivnoj korelaciji sa heterogametnom gonadom. U čoveka i ostalih sisara muški pol, je heterogametski, a u ptica i nekih amfiba ženski pol, kod kojih je ovarijum heterogametna gonada.

Prisustvo ovog antigena u svih individua sisara i čoveka koje imaju testise, bez obzira na hromosomsku konstituciju, ukazuje da je ovaj antigen povezan sa formiranjem testisa, tj. da ima ulogu u prepoznavanju ćelija indiferentne gonade i njihovom organizovanju u seminiferne tubule. Ovaj antigen deluje samo kada je povezan sa jednim receptorom. Već jednu deceniju se zna za postojanje takvog receptora, a kasnije je i potvrđeno da je ovaj receptor specifičan za gonadu.

Ranije je pretpostavljeno da je strukturni gen za ovaj antigen smešten na Y-hromosomu. Još uvek nije utvrđeno na molekularnom nivou, da li je antigen otkriven transplatacijom (H-Yt), pomoću citotoksičnih T-limfocita (H-Yc) i (H-Ys), utvrđen serološkim esejom (preko antitela u serumu) isti antigen ili postoji više antigena specifičnih za pol. Na osnovu do sada predloženih hipoteza moglo bi se pretpostaviti da H-Y-antigeni predstavljaju familiju proteina specifičnih za pol, od kojih svaki ima određenu funkciju. Ako je ovo tačno, tada je samo antigen koji se određuje serološki (H-Ys) i koji se odnedavno označava kao Sxs (za pol specifičan) povezan sa diferenciranjem pola.

Nedavno je Page, koji je otkrio i lokaciju gena (TDF), dao dokaz da ovaj gen koji se nalazi na Y-hromosomu (sl. 5.10) ne kodira Sxs-antigen.

Na mogućnost da sintezu Sxs-antigena kodira gen na nekom od autosoma, i da je njegova aktivnost pod kontrolom gena na Y-hromosomu, prvi je ukazao Wolf 1981. god.

Sada se zna, na osnovu genske mape hromosoma čoveka, da je strukturni gen za Sxs-antigen lociran na hromosomu 6 individua oba pola. Hibridizacijom in situ je pokazano da se nalazi u blizini složenog HLA-lokusa. Ovaj gen ima 1000 puta veću ekspresivnost u muškom nego u ženskom polu. Njegova aktivnost je verovatno regulisana genom (TDF) na Y-hromosomu.

Postavlja se pitanje, međutim, zašto je ovaj antigen prisutan na površini svih ćelija embriona pa i odrasle individue i zašto se javlja već na stadijumu od 8 blastomera.

Nameće se zaključak da diferencijacija gonada nije jedina funkcija ovog antigena, pa je usledila pretpostavka da ovaj antigen ima ulogu regulatora rasta embrionalnih tkiva. Antigeni na površini ćelije verovatno služe za prenos informacija između ćelije i okolne sredine tkiva majke, što dovodi do mnogo bržeg rasta embriona muškog pola, pa i bržeg rasta muških gonada. Poznato je da su indiferentne gonade u XY-embrionu znatno veće od indiferentnih gonada u XX-embrionu. Analoga situacija je zapažena u ptica, gde je ženski pol heterogametski i Sxs-pozitivan, pa je ovarijum veći od testisa u toku faze rasta gonada.

X-hromosom bez sumnje ima značajnu ulogu u složenom procesu diferencijacije muških gonada, ali ova uloga još uvek nije u potpunosti razjašnjena.

Na dugom kraku Y-hromosoma, u euhromatičnom regionu (sl. 5.1), nalaze se geni koji kontrolišu spermatogenezu, kao i strukturni gen za H-yc, a sada već ima podataka koji ukazuju da su H-yc i H-yt sinonimi i da ovaj H-Y-antigen verovatno ima ulogu u procesu spermatogeneze.

Podaci dobijeni analizom DNK dugog kraka Y hromosoma infertilnih paci-

jenata sa azoospermijom potvrdili su postojanje genskih lokusa u regionu Yq11.23, koji kontrolišu spermatogenezu i fertilitet čoveka.

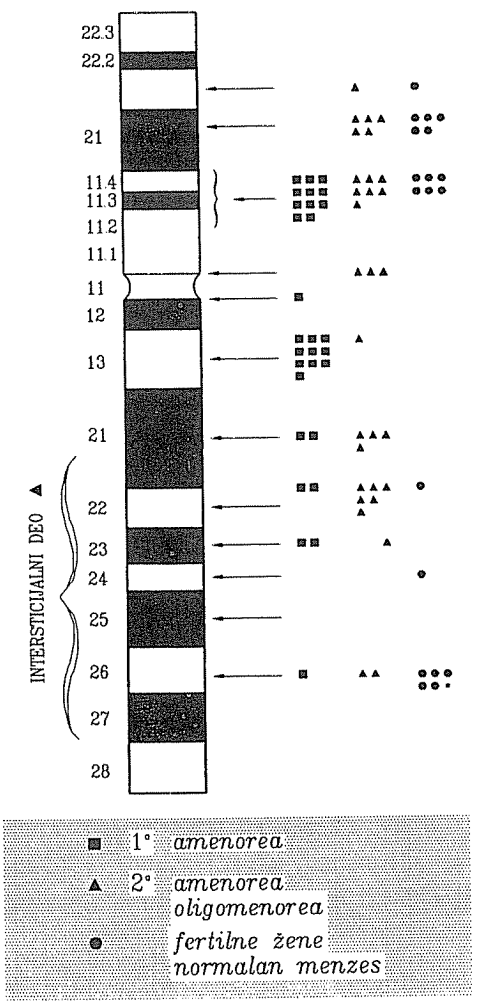
U ovom regionu se nalaze i geni za rast i veličinu zuba. Pretpostavlja se i postajanje gena koji izaziva gonadoblastom, tumor koji se skoro isključivo javlja u abnormalnim, disgeneznim gonadama i uz prisustvo intaktnog ili strukturno izmenjenog Y-hromosoma. Ovaj gen, kada mutira u sadejstvu sa drugim činiocima, može izazvati relativno benigni tumor gonadoblastom, u okviru koga se kasnije može razviti maligni oblik tumora.

O mehanizmu diferencijacije ovarijuma postoje dva gledišta: po jednom, indiferentna gonada se razvija u ovarijum u odsustvu H-Y-antigena. Po drugom shvatanju, koje preovlađuje, u XX-individua postoji par alela koji kontroliše sintezu jednog antigena specifičnog za oocite. Ovaj antigen omogućuje prepoznavanje i interakciju između gonocita i somatskih ćelija indiferentnih gonada, što obezbeđuje formiranje folikula oko oocita. Poznato je da je folikul osnovna jedinica građe ovarijuma.

Za sâm proces primarne diferencijacije ovarijuma nisu neophodna dva X-hromosoma, što potvrđuje prisustvo germinativnih ćelija u XO- i XY-individua sa gonadalnim disgenezama. Međutim, za održavanje folikula i sprečavanje njihove nekontrolisane atrezije i funkciju ovarijuma potrebna su oba X-hromosoma. Dobro je poznato da se u mejocitima vrši reaktivacija ranije inaktivisanog X-hromosoma. Koliko gena u X-hromosomu učestvuje u kontroli diferencijacije i funkcije ovarijuma, za sada se ne može sa sigurnošću tvrditi, kao što se ne zna ni tačan raspored ovih gena u X-hromosomu.

Prva saznanja su dobijena ispitivanjem korelacije između gonosomne konstitucije i fenotipa u osoba sa numeričkim i, naročito, strukturnim aberacijama X-hromosoma. Analiza ovih korelacija je doprinela mápiranju X-hromosoma, ali će tek primenom molekularnih metoda genska mapa X-hromosoma biti precizno urađena.

Dosadašnjim delecionim mapiranjem X-hromosoma se pokazalo, da su određeni regioni na oba kraka X-hromosoma odgovorni za kontrolu procesa atrezije folikula u toku prenatalnog i postnatalnog perioda jedinke (sl. 5.11).



Slika 5.11 – Deleciona mapa X hromosoma.

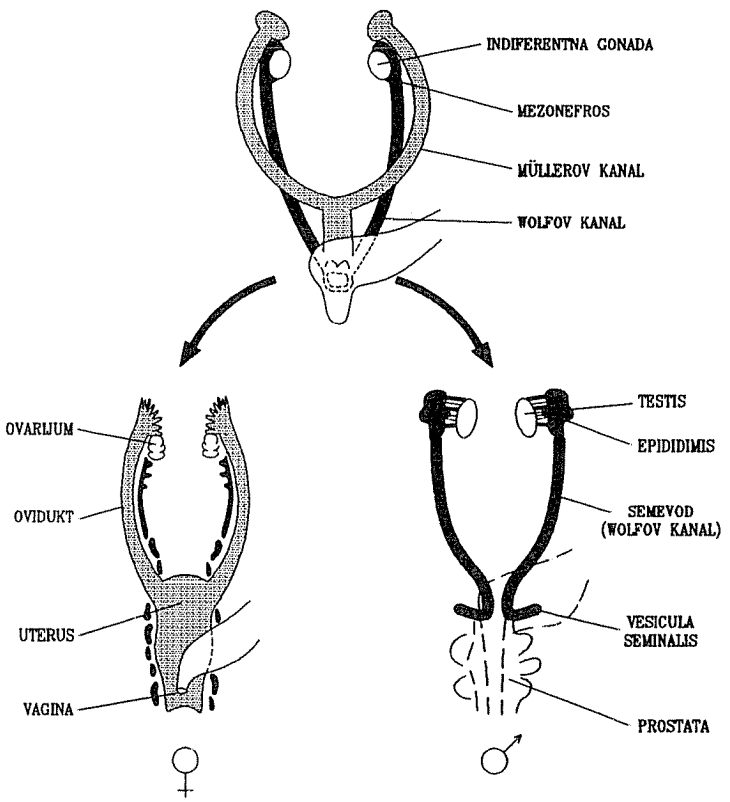
Nisu svi regioni u X-hromosomu podjednako značajni za održavanje ovarijuma. Izgleda da su distalni Xq13 i proksimalni Xq21 regioni najznačajniji (sl. 5.11, 5.19).

Na osnovu dokazanih i pretpostavljenih naslednih činilaca koji kontrolišu normalnu diferencijaciju i funkciju oba pola čoveka, može se reći, da normalno razviće pola zavisi od velikog broja različitih gena. Glavni činioci su bez sumnje smešteni na polnim hromosomima i deluju u interakciji sa autosomnim genima.

Danas je jasno da autosomni geni imaju mnogo veću ulogu u razvoju gonada oba pola nego što se ranije mislilo, o čemu svedoče neki oblici gonadalnih disgeneza sa normalnim kariotipom. Ova činjenica ukazuje na hipotezu da su geni smešteni na X- i Y-hromosomima regulatorni, a da su geni koji određuju razviće gonada na autosomima strukturni.

Diferencijacija polnih odvoda

U toku embrionalnog života kičmenjaka javljaju se žačeci polnih odvoda oba pola (sl. 5.12). Wolfovi kanali, ili kanali mezonefrosa u muškom polu nižih kičmenjaka imaju dvojaku ulogu, izvode tečne ekskrete i polne produkte i ulivaju se u kloaku. U viših kičmenjaka mezonefros atrofira, a Wolfov kanal gubi svoju primarnu funkciju i održava se kao semevod (vas deferens). Od mezonefrosa ostaje samo prednji deo sa bubrežnim kanalićima koji sprovode isključivo spermatozoide. Ovaj deo kod sisara leži uz



Slika 5.12 – Razviće gonada i polnih odvoda oba pola

sam testis i sa proksimalnim delom Wolfovog kanala sačinjava epididimis (sl. 5.13).

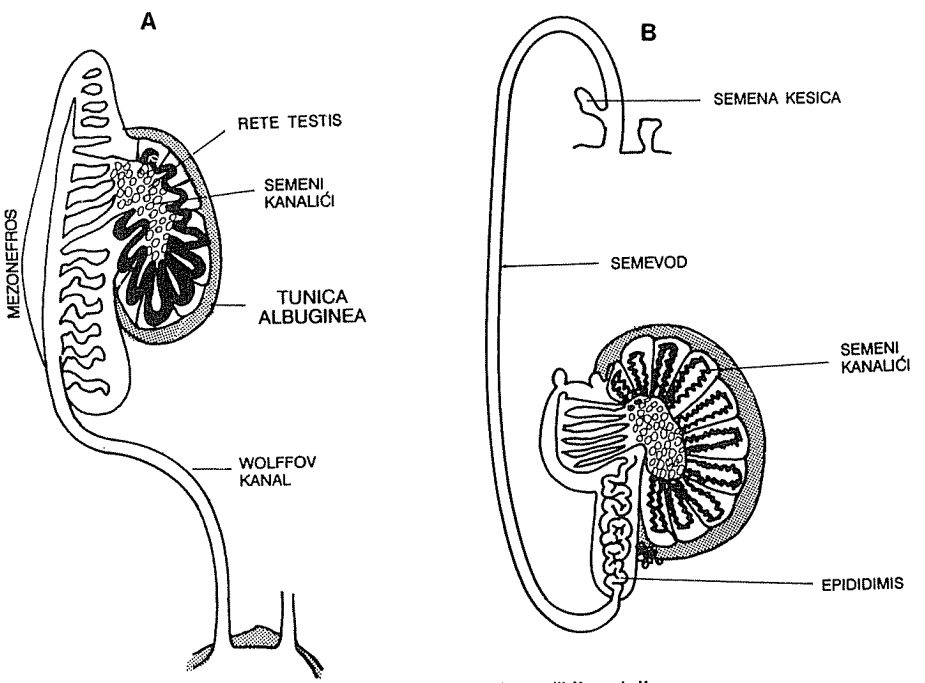
U ženskom polu odnosi su drugačiji. Wolfov kanal nikada ne postaje polni odvod tu ulogu preuzima Milerov kanal, koji postaje na račun Wolfovog kanala i nefrostoma kanalića pronefrosa. Kod sisara i čoveka Milerov kanal se diferencira u ovidukt, uterus i deo vagine (sl. 5.14). O postanku vagine postoji više teorija. Za vreme fetalnog života u genetski determinisanog mužjaka ili muškarca kod čoveka razvijaju se Wolfovi kanali, a Milerovi se redukuju (sl. 5.13). Nasuprot, u genetski determinisanih embriona ženskog pola razvijaju se Milerovi kanali, a Wolfovi kanali atrofiraju (sl. 5.14).

Diferencijacija spoljašnjih polnih organa

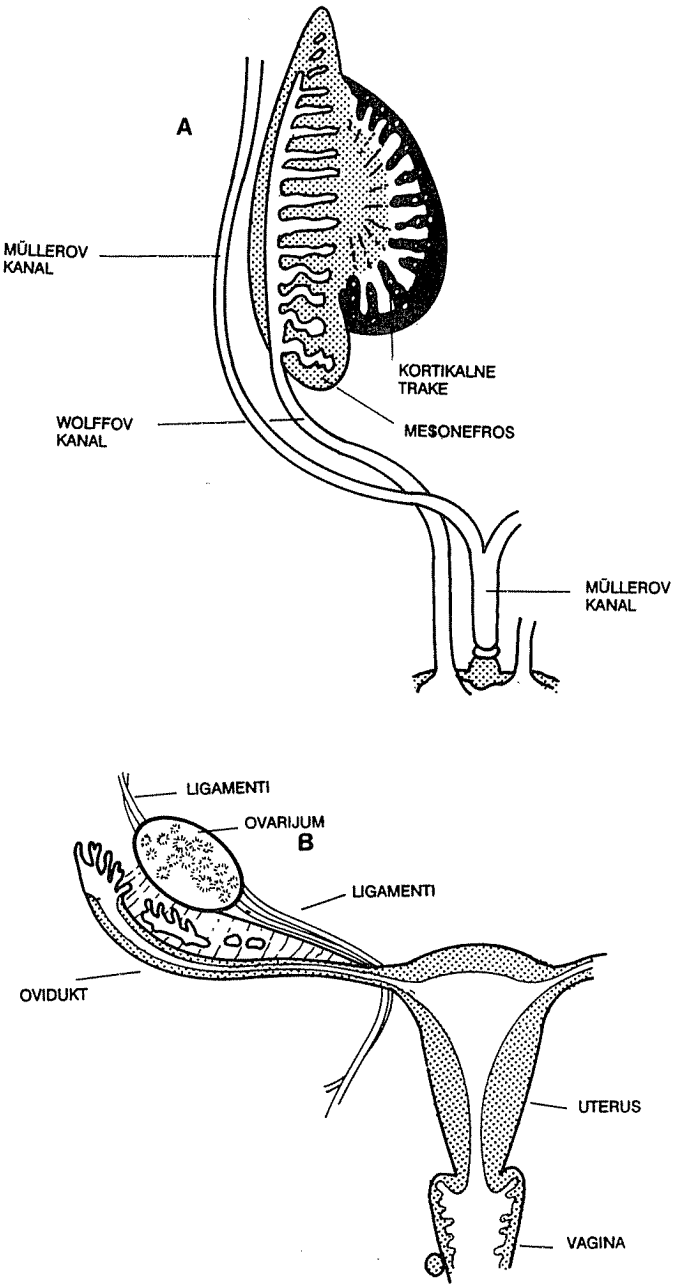
Među kičmenjacima sisari i čovek imaju najsloženije građene spoljašnje polne organe. U embrionalnom indiferentnom stadijumu spoljašnji polni organi oba pola su isti i mogu se diferencirati u pravcu muškog ili ženskog pola. U nivou začetka kloake javlja se kloakalna kvržica, a njen prednji deo daje *genitalnu kvržicu,* koja se sastoji iz šupljikavog tela i glansa. Iz genitalne kvržice formiraće se penis u muškog pola, a klitoris u ženskog pola. Na osnovi genitalne kvržice javlja se *labiskrotalno zadebljanje,* a pri osnovi primarni urogenitalni otvor.

U muškog pola se genitalna kvržica izdužuje i formira penis, duž nje se formira brazda koja se zatvara i daje urogenitalni kanal penisa. Bočna labioskrotalna zadebljanja se spajaju po središnjoj liniji i formiraju skrotum, u koji se spuštaju testisi (sl. 5.15).

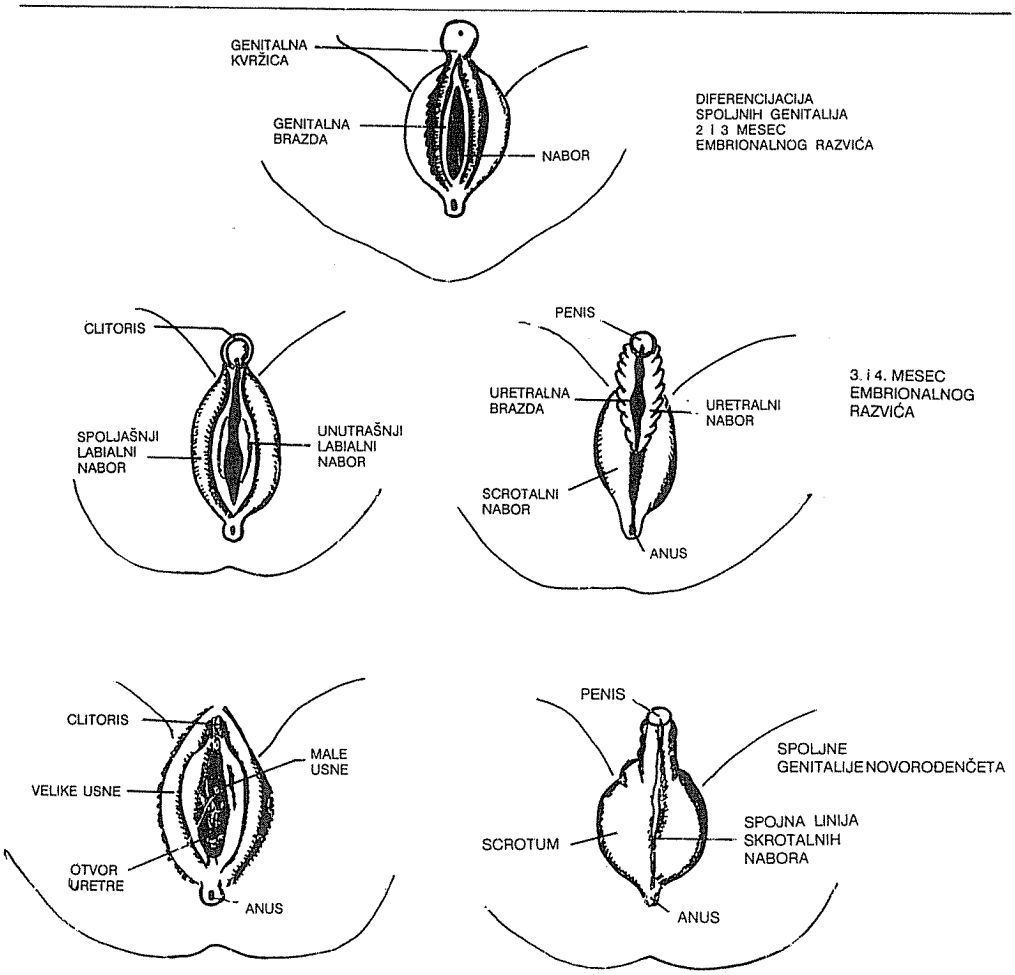
U ženskog pola od genitalne kvržice nastaje klitoris, koji odgovara penisu mužjaka. Razlika između penisa i klitorisa



Slika 5.13 – A. Shematski prikaz razvića muških polnih organa; B. Shematski prikaz formiranih muških polnih organa



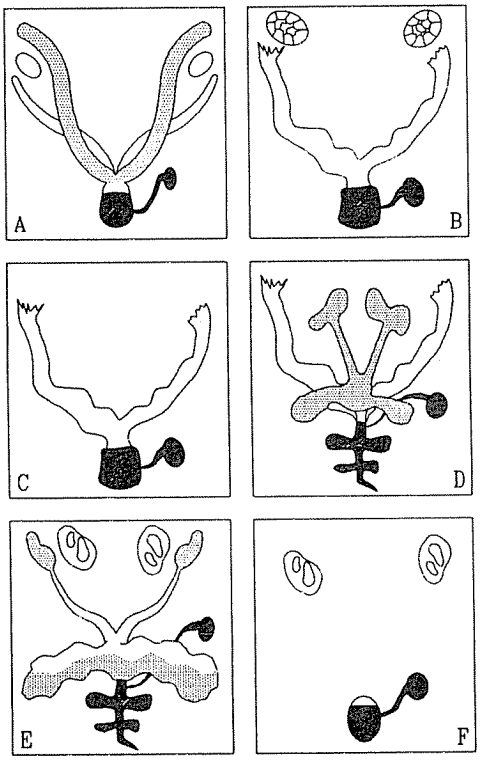
Slika 5.14 – A. Shematski prikaz razvića ženskih polnih organa.
B. Shematski prikaz formiranih ženskih polnih organa



Slika 5.15 – Diferencijacija spoljnih genitalija

je u veličini – klitoris je po pravilu znatno kraći. Bočni nabori urogenitalnog otvora formiraju male usne (labia minora) a labioskrotalni nabori daju velike usne (labia majora). Urogenitalni otvor se nastavlja u urogenitalni sinus u koji se otvara vagina (sl. 5.15).

Uloga fetalnih testisa u diferencijaciji muških polnih odvoda i spoljašnjih polnih organa je dobro poznata. Eksperimenti Josta su pokazali da fenotipski pol direktno zavisi od prisustva ili odsustva muškog polnog hormona testosterona. Ako se izvrši rana kastracija muškog (XY) ili ženskog (XX) embriona, razvijaju se Milerovi kanali i ženski fenotip (sl. 5.16C). Dodavanjem egzogenog testosterona kastriranim embrionima formiraju se i Wolfovi kanali, pa jedinka ima i muške i ženske polne odvode (sl. 5,16D). Efekat ovih hormona se manifestuje lokalno. Kada se odstrani testis samo sa jedne strane, razviće se na toj strani Milerov kanal. Ovo se može objasniti činjenicom da se u ranom fetalnom razvoju, kada se vrši diferencijacija Wolfovih kanala, androgeni hormoni prenose difuzijom u target-ćelije i zato deluju na ograničenom prostoru.



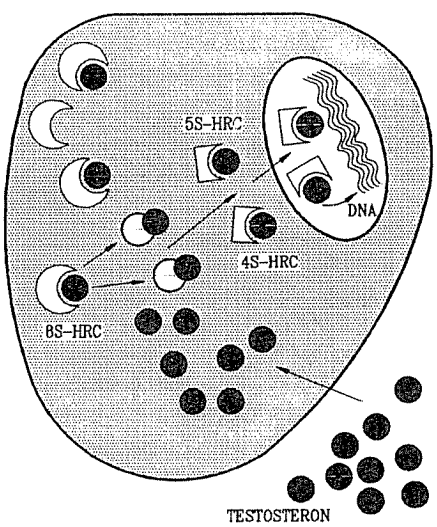
Slika 5.16 – A. Stadijum indiferentnih gonada, B. Normalna ženka, C. Kastrirani embrioni XX ili XY, D. Kastrirani embrioni XX ili XY + testosteron, E. Normalan mužjak, F. Testikularna feminizacija

Ženski pol u sisara je "neutralan" pol i, ako u kritičnim stadijumima fetalnog razvića nema lučenja muških polnih hormona, formiraće se ženski fenotip. Primer kod čoveka je čista gonadalna disgeneza, kada gonade nisu diferencirane, pa nema ni hormonskog dejstva. Gonosomna konstitucija ovih osoba može biti XX ili XY, ali fenotip je uvek ženski.

Inicijalni proces diferencijacije muškog fenotipa karakteriše regresija Milerovih kanala. Ovaj proces je pod kontrolom jednog glikoproteinskog hormona koji luče Sertolijeve ćelije fetalnih testisa. Ovaj hormon kodira gen lociran na hromosomu 19 čoveka. Leydigove ćelije, smeštene oko semenih kanalića, luče testosteron. Ovaj hormon ima dve esencijalne funkcije: utiče na maturaciju semenih kanalića i deluje na transformaciju Wolfovih kanala u muške polne odvode semevode.

Da bi testosteron mogao da vrši svoju biološku funkciju u ciljnom tkivu, potrebno je, pošto difuzijom uđe u ćeliju, da se veže sa receptorom, jednim proteinskim molekulom, koji se nalazi u citoplazmi ciljnih ćelija. Postoje tri tipa receptora: 8S, 4S i 5S.

Posle ulaska u ćeliju molekuli testosterona se vezuju za 8S receptore i formira se prvi kompleks hormon-receptor. Ovaj kompleks potom disocira i daje drugi kompleks hormon-4S receptor, koji se transformiše u treći kompleks hormon-5S receptor. Ovaj poslednji se aktivira promenom konformacije i prelazi u jedro, gde se vezuje za određena mesta u hromatinu (sl. 5.17). Verovatno se kompleks hormon-receptor vezuje za nehistonske proteine hromatina, mada se ne može isključiti ni vezivanje za određene sekvence DNK. Na ovaj način se aktiviraju određeni geni, koji daju informaciju za sintezu različitih enzima koji utiču na fenotipsku ekspresiju muškog



Slika 5.17 – Formiranje testosteron – receptor kompleksa u ciljnoj ćeliji

pola, odnosno formiranje muških polnih odvoda i spoljašnjih polnih organa.

Gen koji sadrži informaciju za receptor nalazi se na dugom kraku X-hromosoma čoveka.

Aberacije polnih hromosoma

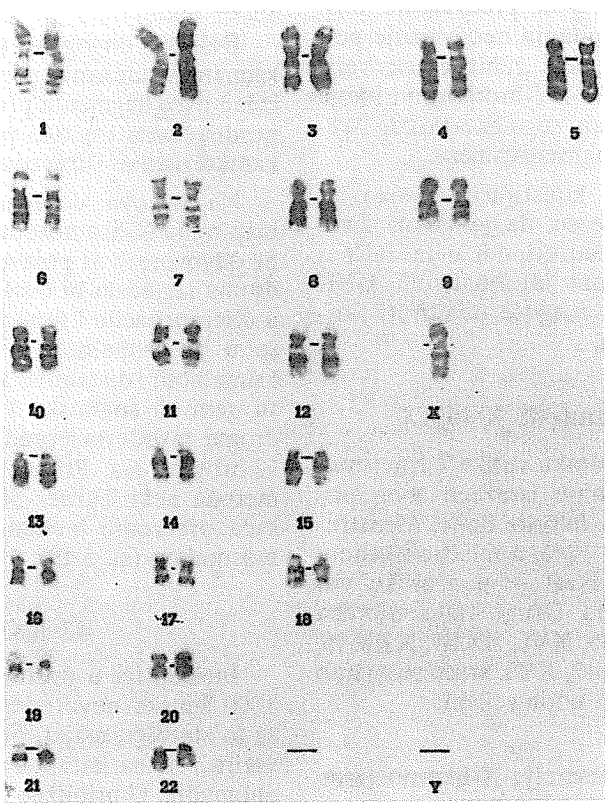
Aberacije polnih hromosoma imaju manje štetan efekat na fenotip nego anomalije autosoma, što se može objasniti inaktivacijom svih prekobrojnih X-hromosoma.

45,X – Turnerov sindrom

Incidencija ovog sindroma je 1:2500 ženske novorođenčadi i nezavisna je od starosti majke. Ranije je naglašeno da je ova monosomija visoko letalna i da oko 99% X0-fetusa bude abortirano u prvom tromesečju trudnoće (sl. 5.18).

Turnerov fenotip X0 individua nastaje zbog nedostatka Turner supresornih gena koji su aktivni na inaktivnom X hromosomu i koji imaju homologe lokuse u Y hromosomu.

Ovaj fenotip se karakteriše gonadalnom disgenezom, usled vrlo brze atrezije folikula, kada od ovarijuma nastaju vezivne trake, što prouzrokuje primarnu amenoreju i sterilitet. Ipak, oko 3% ovih osoba ima menstruaciju i fertilne su. U ovim slučajevima se pretpostavlja skriveni mozaicizam 45,X/46,XX ili se mali



Slika 5.18 – 45,X Turnerov sindrom

broj funkcionalnih oocita ipak održi do reproduktivnog perioda. U skladu sa nerazvijenim ovarijumima, sekundarne polne odlike su takođe nerazvijene.

Ovaj sindrom se odlikuje i nizom somatskih poremećaja kao što su mali rast (125-150 cm), kratak i naboran vrat, nizak rast kose na vratu, štitaste grudi sa široko razmaknutim bradavicama, a često se javljaju i kratke metakarpalne kosti, hipoplazija noktiju, pigmenti nevusi, anomalije srca i dr.

Dužina života i intelektualni razvoj su normalni, ali obolele osobe mogu imati specifične kongenitivne poremećaje.

U 75% slučajeva monosomije X ovaj hromosom je poreklom od majke, što ukazuje na neodvajanje hromosoma u spermatogenezi. Ipak preovlađuje mišljenje da nije u pitanju neodvajanje polnih hromosoma, već gubitak seks-vezikule, koju čine X- i Y-hromosomi i koja može ostati izvan segmentacionog vretena u mejozi spermatogeneze.

Pošto je X0 konstitucija visoko letalna, procenjuje se, da je većina živorođenih sa X0 kariotipom u mozaičnoj formi. Upotrebom informativnih DNK markera sada je moguće utvrđivati skriveni mozaicizam.

Mozaicizam 45,X/46,XX

Fenotipske karakteristike Turnerovog sindroma su manje izražene zbog prisustva normalne ćelijske linije. Menstruacija se nalazi u 12%, a mlečne žlezde u 18% slučajeva. Rast je u proseku viši nego u X0-osoba. Druge vrste mozaika 45,X/47, XXX, 45, X/46, XX/47, XXX,45, X/46, XY, 45, X/47, XYY sreću se znatno ređe u humanim populacijama.

Strukturne aberacije X-hromosoma

Najčešća strukturna aberacija povezana sa Turnerovim sindromom je izohromosom dugog kraka hromosoma X (sl. 4.17a). Ova hromosomska anomalija se često javlja u mozaičnoj formi 45, X/46,Xi(Xq). Klinička slika može varirati, a spektar anomalija koje se javljaju u ovih osoba se ne razlikuje od spektra anomalija koji karakteriše 45,X0 žene.

Delecije X-hromosoma

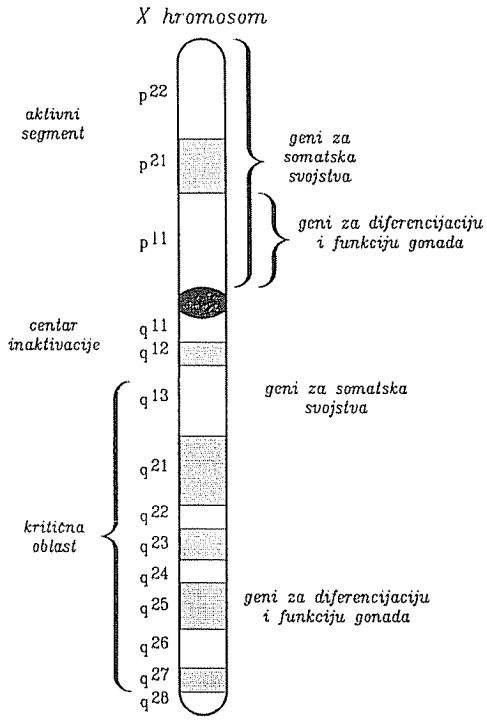
Kompletan Turnerov sindrom je češće povezan sa delecijama kratkog kraka X-hromosoma. Pacijentkinje sa terminalnim delecijama kratkog kraka imaju somatska svojstva Turnerovog sindroma, dok su proksimalne delecije u blizini centromere (Xp 11-cen) u većini slučajeva povezane sa kompletnom kliničkom slikom Turnerovog sindroma uključujući gonadalnu dizgenezu.

Delecije dugog kraka (Xq-) sa proksimalnim tačkama prekida u Xq 21 ili iznad ovog segmenta prouzrokuju gonadnu disgenezu i u oko polovine slučajeva karakteristike Turnerovog sindroma.

Na osnovu dosadašnjeg delecionog mapiranja X-hromosoma, lokalizacija gena odgovornih za pojavu Turnerovog sindroma izgledala bi ovako: geni uključeni u diferencijaciju i funkciju gonada nalaze se u proksimalnom delu Xp i u proksimalnom i distalnom segmentu Xq, dok su geni za somatske karakteristike sindroma takođe raspoređeni na oba kraka X hromosoma. Primenom molekularnih metoda neki Turner supresorni geni su sada preciznije locirani na X i Y hromosomima (sl. 5.19).

47 XXX

Incidencija u opštoj populaciji je 1 : 1000 ženske novorođenčadi, a povećava se sa starošću majki. Fenotip ovih osoba varira i nema karakterističnih somatskih anomalija. U približno 1/3 slučajeva utvrđeni su blaža mentalna retardacija i poremećaj ponašanja. U nekih osoba sa 47



Slika 5.19 – Genska mapa X hromosoma

,XXX kariotipom zapažaju se poremećaj menstruacije i disfunkcija ovarijuma, pa se može pretpostaviti da trisomija X može poremetiti mejozu.

Ranije je naglašeno da je, bez obzira na visok teoretski rizik (50%), od rađanja dece sa hromosomskim anomalijama, potomstvo ovih žena uglavnom normalno.

Trisomija X može nastati usled neodvajanja X-hromosoma u I ili II deobi mejoze majke ili u drugoj deobi mejoze oca.

Polisomije X-hromosoma u ženskom polu

Sve do sada opisane žene sa kariotipom 48,XXXX su sa mentalnim poremećajem, u nekim slučajevima je zapažena disfunkcija ovarijuma, a mogu biti i fertilne. Kod drugih se sreću neke somatske anomalije koje su karakteristične za Downov sindrom. U jednoj porodici 48, XXXX komplement je nađen u tri sukcesivne generacije.

49,XXXXX osobe karakterišu se većom umnom zaostalošću, a i učestalost somatskih anomalija je veća nego u prethodno opisanih trisomičnih i tetrasomičnih osoba.

Polisomije nastaju zbog dvostruke greške – neodvajanja hromosoma u I i II deobi mejoze jednog roditelja.

Postavlja se pitanje kako različite anomalije X-hromosoma utiču na fenotip kada znamo da je u svakoj diploidnoj ćeliji aktivan samo jedan X-hromosom. E. Therman (1981, 1983) je predložila nekoliko hipoteza, od kojih su najrealnije sledeće:

a. Abnormalna konstitucija X-hromosoma ima štetan efekat na razviće ovarijuma posle reaktivacije inaktivnog X-hromosoma u oocitama.

b. Promena broja hromosoma i aktivnih regiona na inaktivnom X-hromosomu može uticati na fenotip. Najubedljiviji dokaz fenotipskih efekata aktivnih regiona na neaktivnom X-hromosomu su kvantitativna svojstva koja se linearno menjaju sa brojem X-hromosoma, kao što su: dermatoglifi, IQ, težina, visina, veličina zuba i dr.

c. Intaktan kritični region Xq13–q27 u oba X-hromosoma je neophodan za normalno razviće i funkciju ovarijuma (sl. 5.19).

d. Aberacija X-hromosoma može izraziti svoj efekat u toku selekcionog perioda, kada u određenim ćelijama ostaje aktivan aberantni X-hromosom.

e. Nepravilna ili asinhrona inaktivacija X-hromosoma, naročito u slučajevima polisomija X, može uticati na fenotip. Povećan broj aktivnih regiona na inaktivnim X-hromosomima i asinhrona replikacija mogu paralelno delovati na fenotip.

XXY – Klinefelterov sindrom

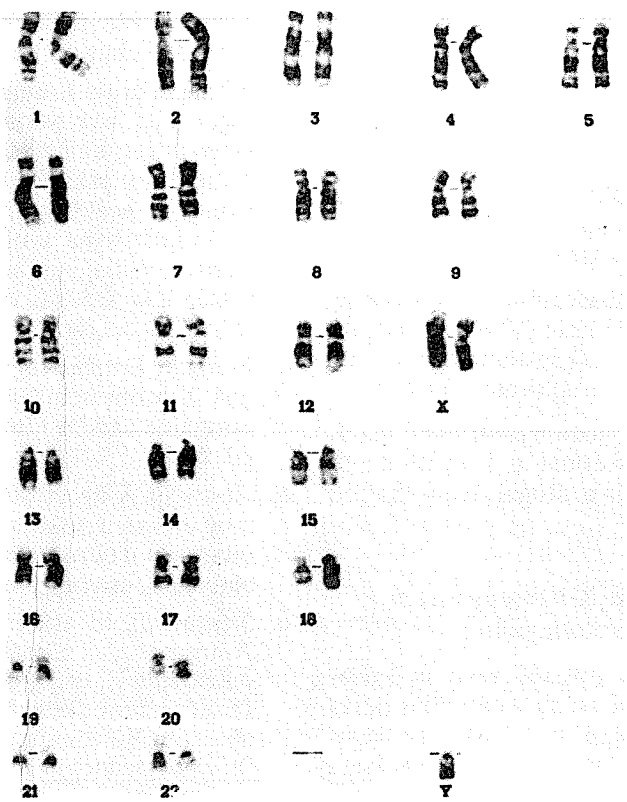
Incidencija ovog sindroma u opštoj populaciji je 1:1000 muške novorođenčadi, a povećava se u populaciji dece sa mentalnim poremećajima na 20 : 1000, a čak 100/1000 u infertilnih muškaraca. U detinjstvu se već zapažaju izduženi ekstremiteti, viši su od normalnih muškaraca i imaju krupnije zube i evnuhoidni habitus, inteligencija je nešto niža u poređenju sa normalnom braćom i sestrama, a oko 20% su sa blagom mentalnom retardacijom (sl. 5.20).

U odraslih XXY-osoba testisi su mali, sa smanjenom sintezom androgena, pa su i sekundarne seksualne karakteristike slabo razvijene; zapažaju se oskudna kosmatost lica, ženski tip pubične kosmatosti, a u 40% se pojavljuje ginekomastija.

U testisima se uočava odsustvo spermatogeneze. Postoje dva mišljenja koja objašnjavaju poremećaj procesa mejoze. Po jednom mišljenju, u pitanju je greška u formiranju sinaptonemalnog kompleksa između polnih hromosoma koja prekida mejozu rano u I profazi. Po drugom, prekobrojni X-hromosom u generativnim ćelijama je aktivan (X- i Y- hromosomi se inaktiviraju u mejozi), što dovodi do smrti ovih ćelija na stadijumu spermatogonija.

Ova gonosomna aberacija može nastati neodvajanjem X-hromosoma u I ili II deobi mejoze majke (60% slučajeva), a rizik se povećava sa starošću majke ili u I deobi mejoze oca.

Na osnovu retkih strukturnih aberacija X-hromosoma nađenih u osoba sa Klinefelterovim sindromom, pretpostav-



Slika 5.20 – 47,XXY Klinefelterov sindrom

lja se da region Xq11-q22 sadrži gene značajne za fenotipsku ekspresiju ovog sindroma.

U osoba sa Klinefelterovim sindromom se nalazi i čitav spektar mozaičnih gonosomnih konstitucija, a fenotipske karakteristike zavise od zastupljenosti i rasporeda pojedinih ćelijskih linija u organizmu, tako da muškarci sa gonosomnim mozaikom mogu biti i fertilni.

Polisomije X-hromosoma u muškom polu

Do sada su opisane različite polisomije polnih hromosoma: 48,XXXY, 49,XXXYY, 48,XXYY.

Ove osobe predstavljaju fenotipske varijante Klinefelterovog sindroma u kojih su somatske anomalije više izražene nego u osoba sa XXY-konstitucijom. Kao i u ženskom polu, najmarkantnija fenotipska karakteristika polisomija je mentalna retardacija, koja se povećava sa brojem polnih hromosoma.

Polisomije su posledica grešaka u I i II deobi mejoze ili grešaka u više mitoza u postzigotnom stadijumu.

47,XYY

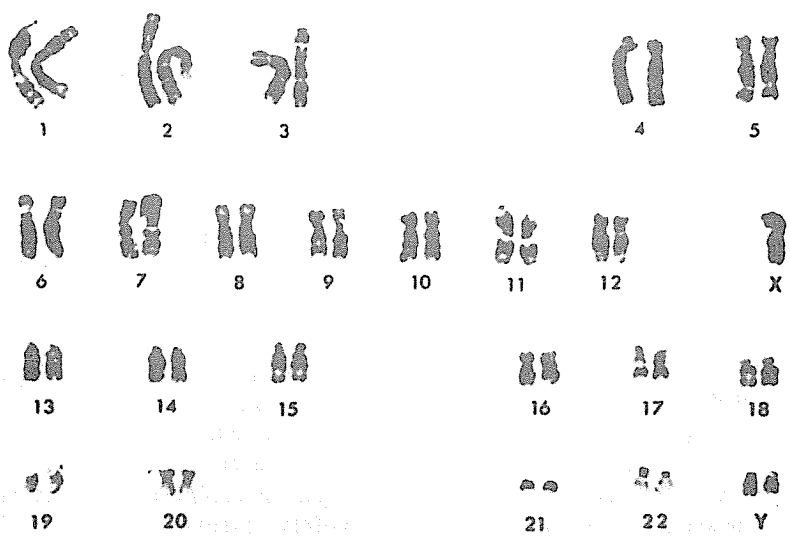
Na ovu gonosomnu konstituciju (sl. 5.21) je usmerena pažnja 1965. god., kada je objavljeno da je učestalost ovih muškaraca znatno veća među zatvorenicima nego u opštoj populaciji. Od tada se vodi polemika između genetičara o tome da li se sklonost ka antisocijalnom ponašanju može povezati sa viškom Y-hromosoma.

U opštoj populaciji incidencija ove trisomije je 1 : 1000 muške novorođenčadi iako približno 1% spermatozoida normalnih muškaraca sadrži dva Y-hromosoma. Ova činjenica ukazuje da deluje oštra selekcija protiv spermatozoida ili zigota sa dva Y-hromosoma.

Učestalost je povećana u osoba sa mentalnim poremećajima (20 : 1000).

Ova gonosomna trisomija nije povezana sa jasno definisanim sindromom. XYY-muškarci su u proseku viši i imaju krupnije zube nego muškarci sa normalnim kariotipom. Njihova reproduktivna funkcija nije mnogo poremećena. Kao i XXX-žene, imaju uglavnom normalno potomstvo.

XYY-konstitucija je posledica greške u drugoj deobi mejoze oca.



Slika 5.21 – 47,XYY

48,XYYY i 49,XYYYY

Ovi pacijenti se retko sreću u himanim populacijama. Visoki su i smatra se da su agresivniji od XYY-muškaraca, inteligencija im je znatno smanjena u poređenju sa prethodnim.

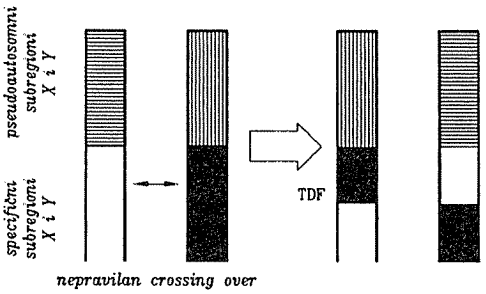
REVERZIJA POLA

U osoba sa reverzijom pola postoji nesklad između genosomne konstitucije i fenotipa.

46,XX muškarci

Ove osobe se odlikuju muškim fenotipom koji je sličan Klinefelterovom sindromu, sa testisima bez spermatogeneze, a spoljne genitalije su muške. Prvi put su opisani 1964. god. Incidencija u populaciji je 1:20.000 muške novorođenčadi. Niži su od normalnih muškaraca, što ukazuje da se na Y-hromosomu nalaze geni za rast. Većina slučajeva se javlja sporadično. Donedavno su postojale različite hipoteze i spekulacije o etiologiji razvića testisa bez prisustva Y-hromosoma. Još 1964. god. je pretpostavljeno da bi translokacija između X- i Y-hromosoma mogla biti uzrok pojave XX-muškaraca. Danas, zahvaljujući primeni genskih proba specifičnih za DNK Y-hromosoma, pokazalo se da je u kratkom kraku jednog X-hromosoma, koji je nasleđen od oca, prisutna jedna sekvenca DNK Y-hromosoma. Ova sekvenca može biti različite dužine, ali uvek sadrži TDF-lokus, kako je ranije naglašeno. Oko 80% do sada ispitanih XX-muškaraca ima ovu sekvencu u jednom X-hromosomu, što je najčešće posledica nepravilnog crossing overa između kratkih krakova X- i Y-hromosoma u mejozi oca (sl. 5.22).

Danas se zna, da se izvan pseudoautosomnog regiona u delovima specifičnim za X i Y hromosome, nalaze homologe sekvence između kojih može doći do ektopične rekombinacije (crossing overa). Unutar X i Y homologih sekvenci postoje „vruća" (hot spots) mesta za ovu ektopičnu rekombinaciju, koja su u X hromosomu oko 1.2 Mb, a u Y hromosomu oko 10 Mb udaljena od pseudoautosomnog regiona.



Slika 5.22 – Nepravilan crossing over između kratkih krakova X i Y hromosoma

U 15-20% muškaraca sa XX-gonosomnom konstitucijom zapažaju se nepravilno formirani spoljašnji polni organi. U ovih muškaraca sa ambivalentnim genitalijama ni jednom genskom probom nije utvrđena sekvenca ĐNK sa Y-hromosoma.

Kada bi se detaljno ispitala histologija njihovih gonada, možda bi se utvrdilo da su ove osobe hermafroditi. Poznato je da se u nekim porodicama javljaju XX-muškarci i pravi XX-hermafroditi, što govori da je uzrok ovoj pojavi genska mutacija, verovatno na nekom od autosoma.

45,XO-muškarci

Do sada je opisano samo desetak osoba muškog fenotipa sa ovom gonosomnom konstitucijom. Ovaj fenotip bi mogao biti prouzrokovan suptilnim mozaicizmom, prisustvom ćelijske linije XY, što je u jednom slučaju i dokazano. U svim ostalim slučajevima je genskim probama specifičnim za Y-hromosom, potvrđeno prisustvo sekvenci DNK ovog hromosoma u nekom od autosoma, a ne

u X-hromosomu, kao kod XX-muškaraca. Prisustvo DNK Y-hromosoma u autosomu je rezultat recipročne translokacije. Fenotip ovih osoba zavisi od veličine segmenata Y-hromosoma i od autosoma na koji je translociran deo Y-hromosoma. Najčešća je translokacija između Y-hromosoma i kratkih krakova akrocentričnih hromosoma. Kada se recipročnom translokacijom izgubi deo kratkog kraka akrocentrika, to ne izaziva fenotipske efekte, jer se tu nalaze samo geni za rRNK. Fertilitet ovih muškaraca zavisiće od veličine translociranog dela Y-hromosoma. Ako je na akcrocentrik preneta samo sekvenca sa TDF-lokusom, takav muškarac biće infertilan sa azoosperijom, a ako je prisutna duža sekvenca, koja sadrži i gen za spermatogenezu, takav će muškarac biti fenotipski normalan i fertilan.

Kada je deo Y-hromosoma translociran na neki od neakrocentričnih hromosoma, fenotip će zavisiti od autosoma, koji recipročnom translokacijom gubi jedan deo. Tako su opisana dva XO-dečaka, u jednog je deo Y-hromosoma translociran na kratak krak hromosoma 5, a u drugog na kratak krak hromosoma 18. U prvom slučaju je izražen sindrom mačjeg plača, a u drugom sindrom parcijalne monosomije kratkog kraka hromosoma 18.

46,XY-žene

XY gonadalna disgeneza je poremećaj diferencijacije testisa u genetičkih muškaraca. U ovih osoba su izraženi ženski fenotip i polni infantilizam. Spoljašnji polni organi su ženski i održavaju se Milerovi kanali. Somatske anomalije obično nisu prisutne, pa je poremećaj označen kao *čista gonadalna disgeneza.*

XY gonadalna disgeneza je genetički heterogena. Korišćenjem genskih proba je dokazano da neke od ovih pacijentkinja imaju u genomu submikroskopsku deleciju kratkog kraka Y-hromosoma, koja obuhvata i TDF-lokus.

XY gonadalna disgeneza može biti prouzrokovana i genskim mutacijama na X-hromosomu ili na nekom od autosoma.

Daljim istraživanjima na molekularnom nivou identifikovano je više od 20 mutacija u nivou SRY (TDF) gena, i to u onom funkcionalnom domenu kojim se SRY protein vezuje za DNK. Procenjuje se, da oko 15% XY žena sa kompletnom gonadalnom disgenezom ima mutiran SRY lokus.

Postoje genetički dokazi koji ukazuju da su i drugi geni na različitim hromosomima uključeni u diferencijaciju i reverziju pola. Neke strukturne aberacije autosoma kao što su monosomije 9p i 10q, kao i dup (Xp21) povezane su sa XY reverzijom pola i govore ne samo o postojanju ovih gena već i njihovoj lokaciji u hromosomima.

U nedostatku funkcionalnog Y-hromosoma indiferentna gonada se razvija u ovarijum, ali pošto nema dva X-hromosoma u genomu, usled brze atrezije folikula ovarijumi prelaze u vezivne trake.

XY-žene mogu biti H-Y-pozitivne i H-Y-negativne. H-Y-pozitivne žene su pod velikim rizikom za pojavu neoplazije (gonadoblastoma i disgerminoma). Gonadoblastomi se javljaju skoro isključivo u abnormalnim, disgeneznim gonadama uz prisustvo Y-hromosoma u genomu, a disgerminomi, kao maligniji karcinomi, mogu se razviti iz gonadoblastoma. XY-žene, koje su H-Y-negativne, izgleda nisu podložne neoplazijskim transformacijama. Ranije je naglašeno da se predpostavlja da jedan gen na dugom kraku Y-hromosoma, kada mutira u interakciji sa drugim činiocima, može prouzrokovati pojavu neoplazija.

PRAVI HERMAFRODITIZAM

Ovaj poremećaj se karakteriše prisustvom testikularnog i ovarijalnog tkiva u jedne individue. Raspored tkiva može biti različit kod različitih individua: na jednoj strani tela ovarijum a na drugoj testis ili, češće, na jednoj strani ili obostrano ovotestis (pomešano testikularno i ovarijalno tkivo). Gonade su smeštene u ovarijalnom, ingvinalnom ili labioskrotalnom regionu, a spoljašnji polni organi su neodređeni (ambivalentni). Pravi hermafroditi se u oko 75% slučajeva odgajaju kao muškarci. Spermatozoidi su retko prisutni u gonadama, dok oociti nisu retki čak i u ovotestisu. Obično postoji i uterus pa većina hermafrodita sa uterusom ima menstruaciju.

Etiologija pravog hermafroditizma je heterogena. Najveći broj ima žensku, XX gonosomnu konstituciju (Tab. 5.1). Za razliku od XX-muškaraca, u genomu XX pravih hermafrodita nije otkrivena sekvenca DNK specifična za Y-hromosom, mada imaju Sxs-antigen. Kako se većina XX-hermafrodita javlja u porodicama, može se pretpostaviti da je etiološki činilac u ovom slučaju genska mutacija, koja remeti regulaciju gena za Sxs u određenim ćelijama XX-individua, pa se pored ovarijalnog javlja i testikularno tkivo.

Druga po učestalosti je mozaična hromosomska konstitucija 46,XX/46,XY, koja bi se i očekivala u pravih hermafrodita. Ovaj kariotip je uglavnom rezultat himerizma (Tabela 5.1).

Polni himerizam verovatno najčešće nastaje spajanjem dva zigota ili embriona sa različitom genetičkom konstitucijom, koji po pravilu treba da se razvijaju odvojeno (dizigotni blizanci).

Polni himerizam se podrazumeva kada se dve različite hromosomske konstitucije nalaze u nehematogenim tkivima ili krvnom tkivu u toku dužeg vremena.

Osobe sa polnim himerizmom su heteroseksualne; mnogi pravi hermafroditi su himere, ali mogu biti i izoseksualne, fenotipski normalne osobe, pa je zato teško izvršiti tačnu procenu učestalosti himerizma u humanim populacijama.

Diferencijacija himernih gonada u pravcu formiranja testisa moguća je u slučaju kada su ćelije sa XX- i XY-hromosomima međusobno izmešane, tj. kada u začetku gonade nema velikih teritorija koje se sastoje od ćelija određenog genotipa. Ako se u indiferentnoj gonadi himernih embriona nađu veće teritorije sa XX-ćelijama, tada histogeneza u tim delovima ide u pravcu formiranja ovarijuma. Na ovaj način postaju gonade koje se sastoje od tkiva ovarijuma i testisa – ***ovotestis.***

Tabela 5.1

RASPORED GONADA I KAROTIP U PRAVIH HERMAFRODITA

RASPORED	46,XX	46,XX/ 46,XY	46,XY	46,XY/ 47,XXY	45,X/ 46,XY	DRUGE	UKUPNO
OVARIJUM–TESTIS	23	10	13	5	4	5	60
OVARIJUM–OVOTESTIS	43	7	3	3	1	2	59
OVOTESTIS–OVOTESTIS	33	6	2	2	0	2	45
OVOTESTIS–TESTIS	12	2	5	0	1	2	22
OVOTESTIS–NEPOZNATO	8	0	1	1	1	1	9
UKUPNO	116 (59,5%)	25 (12,8%)	24 (12,3%)	7 (5,6%)	7 (3,5%)	12 (6,2%)	195

Etiologija 46.XY pravih hermafrodita nije u potpunosti jasna. Možda je u pitanju skriveni himerizam ili mozaicizam.

Izvestan broj pravih hermafrodita ima mozaičan kariotip. Mozaik nastaje gubitkom Y-hromosoma (X0/XY) u embriogenezi ili nerazdvajanjem hromosoma u embriogenezi (X0/XY/XYY) (tab. 5.1).

Ako u indiferentnoj gonadi postoji veća teritorija sa X0 ćelijskom linijom, tada se taj deo formira u pravcu ovarijuma (jer se ovarijum može formirati u prisustvu X0-konstitucije) pa je situacija slična kao u genetičkih himera. Znači, diferenciranje gonada zavisi će od odnosa i rasporeda ćelijskih klonova u indiferentnoj gonadi.

PSEUDOHERMAFRODITIZAM

Postoje dve kategorije pseudohermafroditizma: muški i ženski pseudohermafroditizam.

Muški pseudohermafroditizam

Prisutan je u osoba koje imaju Y-hromosom u genotipu i kod kojih je diferenciranje spoljašnjih polnih organa poremećeno. Ovaj poremećaj može biti prouzrokovan aberacijom polnih hromosoma ili genskom mutacijom.

Za pseudohermafroditizam je karakteristična mozaična gonosomna konstitucija 45,X/46,XY. Fenotip ovih individua izrazito varira – od neznatnih poremećaja kao što je kriptorhizam (nespušteni testisi) ili hipospadija (otvor uretre na pogrešnom mestu) do Turnerovog sindroma. Ovaj gonosomni mozaik često je praćen asimetričnom (miksnom) gonadalnom disgenezom. U ovih individua na jednoj strani tela je nediferencirana vezivna gonada, a na drugoj testikularno tkivo. Spoljašnje genitalije su neodređene (ambivalentne).

Genske mutacije takođe mogu prouzrokovati različite oblike muškog pseudohermafroditizma: izolovanu hipospadiju, perzistenciju (održavanje) Milerovih kanala, zbog nedostatka lučenja glikoproteinskog hormona koji vrši regresiju Milerovih kanala ili zbog neosetljivosti tkiva Milerovih kanala na dejstvo ovog hormona. Tako ovi pseudohermafroditi imaju i muške i ženske polne odvode.

Različite mutacije mogu poremetiti sintezu različitih enzima koji se uključuju u proces biosinteze androgenih hormona. Efekat na diferencijaciju spoljašnjih genitalija zavisi od mutiranog gena.

Poseban oblik pseudohermafroditizma prouzrokovan genskom mutacijom je sindrom *testikularne feminizacije.*

Za ovaj sindrom je karakteristično da fenotipski pol nije usklađen sa genetičkim i gonadalnim polom. Ove osobe imaju 46,XY gonosomnu konstituciju, gonade su formirani testisi smešteni u abdomenu u ingvinalnom ili skrotalnom kanalu. Unutrašnji polni odvodi ne postoje, a spoljašnji polni organi su ženski i fenotip je izrazito ženski (sl. 5.16).

Zašto ne postoje polni odvodi? U toku embriogeneze u prisustvu Y-hromosoma diferenciraju se testisi. Formiranje polnih odvoda i spoljašnjih genitalija, kako je ranije objašnjeno, zavisi od hormonske stimulacije fetalnih testisa. Pošto su fetalni testisi u ovom sindromu funkcionalni, luče hormon koji izvrši regresiju Milerovih kanala, Leydigove ćelije sintetišu i luče testosteron, koji je neophodan za transformaciju Wolfovih kanala u semevode i formiranje muških spoljašnjih genitalija.Kako je biološka aktivnost testosterona moguća samo posle vezivanja za receptorni protein (sl. 5.17), zbog mutacije gena na X-hromosomu, koji kontroliše sintezu receptora, testesteron ne može da se veže za receptor i ostaje biološki neaktivan, pa izostaje transformacija Wolfovih kanala u semevode, kao i spoljašnjih genitalnih začetaka u muške polne organe.

Ove pacijentkinje imaju samo kratku slepo zadnivenu vaginu, nastalu od dela embriona koji ne pripada Milerovim kanalima.

Ženski pseudohermafroditizam 46,XX

Karakteriše se anomalijama u razviću spoljašnjih polnih organa (ambivalentne genitalije) a gonade su ovarijumi. Poremećaj može biti prouzrokovan genskim mutacijama ili teratogenim činiocima. Genske forme ženskog pseudohermafroditizma mogu biti posledica poremećaja biosinteze hormona kore nadbubrežnih žlezda ili nastaju bez ovih poremećaja.

Karakterističan sindrom koji nastaje usled deficita različitih enzima koji učestvuju u biosintezi steroidnih hormona označen je kao *adrenogenitalni sindrom.* Zajednička odlika svih oblika ovog sindroma je poremećaj sinteze kortizola, koji putem povratne sprege utiče na sintezu i pojačano lučenje ACTH, hormona hipofize, što dovodi do povećane sinteze prekursora steroida iz kojih se sintetišu androgeni. Povećano lučenje androgenih hormona dovodi do poremećaja razvića spoljašnjih polnih organa.

Čest oblik adrenogenitalnog sindroma je posledica mutacije jednog gena na hromosomu 6 čoveka, koji je smešten u blizini HLA-lokusa. Smatra se da mutacija ovog gena remeti sintezu enzima 21-hidroksilaze (21-OH), koji je značajan u steroidogenezi. Najnovija ispitivanja na molekularnom nivou su pokazala da deficijencija 21-OH ne mora biti rezultat mutacije gena za 21-OH. Da bi ovaj enzim mogao da deluje, neophodno je i prisustvo specifičnog P450 citohrom-enzima, pa je putem genskih proba dokazano da deficijencija 21-OH može biti i posledica različite transkripcione aktivnosti alela za P45O citohrom enzim.

Familija gena koja kontroliše sintezu P-450 citohroma nalazi se na hromosomu 7 čoveka.

INCIDENCIJA HROMOSOMSKIH ABERACIJA

Incidencija hromosomskih aberacija u novorođenčadi je poznata za niz populacija u različitim zemljama sveta i iznosi 6,05 : 1000. Prema poslednjim podacima Nielsena i sar. iz 1982. god., učestalost hromosomskih aberacija je 20,23 : 1000 novorođenčadi, uključujući i čestu inverziju hromosoma 9, koju mnogi istraživači smatraju samo hromosomskom varijantom.

Ispitivanje patogeneze hromosomskih poremećaja čoveka u znatnoj meri je ograničeno nemogućnošću ispitivanja embriogeneze. Markantni znaci debalansa hromosoma, naročito autosoma, jesu fizičke major i minor abnormalnosti, poremećaj rastenja i poremećaji mentalnog razvoja. Zapaža se da su mnogi klinički simptomi zajednički za većinu hromosomskih aberacija, što ukazuje da je hromosomska aberacija prouzrokovala poremećaj balansa u regulaciji gena u toku embriogeneze. Regulacija genske aktivnosti podrazumeva određenu ravnotežu u kvantitetu genskih produkata sa različitih hromosoma. Odstupanja u količini genetičkog materijala dovode do poremećaja u interakciji gena, što ima za posledicu poremećaj embrionalnog razvića. Indikacije za analizu hromosoma su:

- mentalna retardacija nepoznatog uzroka,
- multisistemske anomalije,
- neonatalna smrtnost,
- neodređene spoljne genitalije,
- hipogonadizam,
- primarna amenoreja,
- infertilitet,
- multipli spontani abortusi i
- mrtvorođenost.

6

Mutacije gena

MUTACIJE

Mutacije su jedan od fundamentalnih procesa žive materije a podrazumevaju nasledne promene u genetičkom materijalu, pri čemu nastaju strukturne promene u genima. Najčešće, međutim, reč "mutacija" ukazuje na fenotipske promene koje nastaju kao rezultat izmenjenog gena. Svi živi organizmi podležu mutacijama. Mutacije su izvori novih gena i predstavljaju izvore genetičkog varijabiliteta, a ujedno su i jedan od osnovnih faktora evolucije. Međutim, geni su relativno stabilni pa mutacije nisu česte. Kako su mutacije najčešće štetne promene, jedno vreme vladala je nedoumica kako objasniti evoluciju i prilagođavanje organizama uslovima sredine na osnovu štetnih mutacija. Većina vrsta živih organizama uglavnom je u visokom stepenu prilagođena na uslove u kojima žive, pa svaka nova promena može ujedno značiti narušavanje te prilagođenosti. Na drugoj strani, postoje i pozitivne mutacije – odnosno, mali broj retkih novih mutacija je značajan; takve korisne mutacije su neophodne za kontinuitet evolucije vrste.

Somatske mutacije i germinativne mutacije

Somatske mutacije obuhvataju promene gena u somatskim ćelijama a germinativne mutacije su one koje se dese u germinativnim ćelijama ovarijuma i testisa. Somatska mutacija može se ispoljiti u fenotipu individue u kojoj se mutacija desila, ali se ne prenosi na buduće generacije pošto promena genetičkog materijala nije obuhvatila gamete. Individue u kojima se somatička mutacija desila biće genetički mozaici; imaće dva genetički različita tipa ćelija; tkivo koje potiče od nemutiranih ćelija biće normalno, dok će ono koje vodi poreklo od mutantnih ćelija biti mutant. Ilustrativni primer somatskih mutacija je boja očiju u čoveka. Jedna osoba može imati u dužici i plavo i smeđe polje, ili čak jedno plavo, a drugo smeđe oko. U nekim primerima mozaične individue mogu imati mozaične ovarijume ili testise, naročito kada se mutacija desi vrlo rano u embrionalnom razviću; u ovom slučaju mutacija može biti preneta na buduće generacije.

Mutacije koje se dese u germinativnim ćelijama su najznačajnije za genetiku i evoluciju pošto se one prenose na potomstvo.

Mutacije se mogu desiti u bilo kom genu genoma jedne individue i stoga mogu delovati na bilo koji deo tela i u bilo koje vreme u životu jedne individue, od embrionalnog razvoja do poznih godina. Mutacije imaju specifičan efekat.

Mutacija lokusa za testikularnu feminizaciju, npr., prouzrokuje mnoge odvojene simptome testikularne feminizacije, ali takva mutacija neće nikada dati srpastu anemiju; mutacija lokusa koji prouzrokuje Tay-Sachsovu bolest (poremećaj u metabolizmu lipida) neće izazvati cističku fibrozu.

TIPOVI MUTACIJA

Promena divljeg ili normalnog gena (gen koji je široko rasprostranjen u prirodi) u oblik koji dovodi do novog fenotipa označena je kao direktna mutacija $a^+ \rightarrow a$ ili $D^+ \rightarrow D$. Mutacije su često povratne (reverzibilne), odnosno izmenjeni gen može da se vrati u prvobitni oblik (divlji gen) $a \rightarrow a^+$ i $D \rightarrow D^+$. Međutim, frekvencija povratnih mutacija je znatno manja od frekvencije direktnih mutacija.

Ponekad se klasifikacija mutacija vrši prema njihovom efektu; jedna takva klasifikacija je bazirana na starostnom dobu individua u kome se pojavljuje mutaciona promena. Tako, npr., genske mutacije koje remete normalnu embriogenezu ispoljavaju se u vidu poremećaja sa kojima se dete rađa. Na primer, cistička *fiboza* i Tay-Sachsova bolest postoje već na rođenju deteta; ovde je greška morala da nastane u embriogenezi. Neke mutacije ispoljiće se kasnije u životu, npr., mutacija koja vodi preranoj ćelavosti. Dobro poznato oboljenje prouzrokovano genskom mutacijom koja se ispoljava relativno kasno u životu je Huntingtonova bolest. Ova retka dominantna mutacija prouzrokuje neizlečivu degeneraciju nervnog sistema, koja obično počinje u srednjem dobu života i brzo se razvija, tako da kroz nekoliko godina bolesnik postaje bespomoćan i nepokretan, teško mentalno poremećen.

Mutacije mogu biti klasifikovane i prema jačini njihovog fenotipskog efekta. Najteže mutacije su, naravno, ***letalne,*** što znači da su inkompatibilne sa životom, kao, npr., Tay-Sachsova bolest.

Mutacije mogu biti ***uslovne*** i one će se fenotipski izraziti samo u određenim uslovima sredine.

Na primer, osobe koje imaju malu količinu glikozo-6 fosfat-dehidrogenaze (G6FD – enzim koji je uključen u metabolizam ugljenih hidrata i značajan za održavanje stabilnosti eritrocita) sklone su ozbiljnoj anemiji u prisustvu nekih agenasa kao što su određene vrste polena, neki lekovi i sl. U odsustvu ovih supstancija ove osobe su potpuno normalne a oporavljaju se od anemija kada se pomenuti agensi eliminišu.

U nekim slučajevima mutacije koje prouzrokuju sterilnost ne deluju na fenotip, pogođene individue mogu biti potpuno normalnog fenotipa, jedino nisu sposobne da produkuju funkcionalne gamete.

Neke mutacije se prepoznaju pomoću njihovog efekta na ekspresiju drugih mutacija; ove mutacije mogu da povećavaju fenotipski efekat ili da vrše supresiju odnosno da umanjuju fenotipski efekat nekih drugih mutacija – drugim rečima, ove mutacije modifikuju fenotipsku ekspresiju drugih mutacija (modifikatori).

Mutacije mogu biti ***dominantne*** ili ***recesivne.*** Setimo se, da se dominantne mutacije ispoljavaju u heterozigotu (jednoj dozi) a recesivne mutacije se ispoljavaju samo u homozigotu (duploj dozi). Primeri dominantne mutacije su: ahondroplazija, izvesni oblici polidaktilije, Huntingtonova horeja. Bolesti metabolizma koje nastaju kao posledica mutacije gena za određene enzime najčešće su recesivne. Kako enzimi deluju u malim količinama, očigledno je da u heterozigota jedan divlji gen obezbeđuje dovoljno enzima za normalnu funkciju ćelije pa su heterozigoti fenotipski zdravi (albinizam, fenilketonurija, hemofilija).

Promena genetičkog materijala može obuhvatiti hemijske i fizičke izmene u granicama jednog ili više parova baza do velikih promena u strukturi hromosoma; otuda klasifikacja mutacija na genske (mikrolezije) i hromosomske (makrolezije).

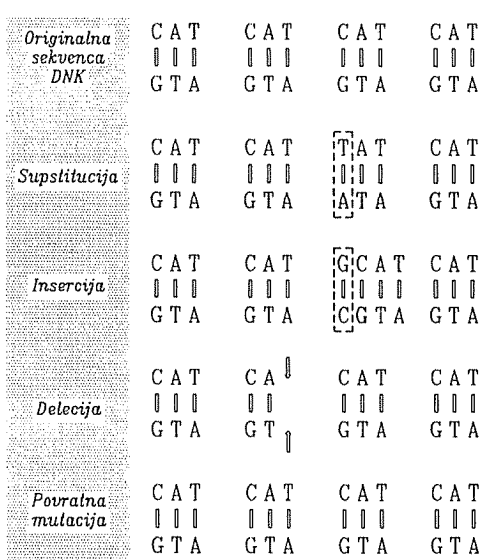
Genetička baza mutacija

Kao što znamo, informacije za primarnu strukturu proteina nalaze se u linearnom redosledu nukleotida jednog segmenta DNK molekula-gena. Mutacije gena dovode ili do formiranja izmenjenog proteina ili do stvaranja neaktivnog proteina, ili prekidaju sintezu proteina. Efekat mutacija zavisi od mesta na kome je došlo do promene u genu.

Greške u molekulima DNK (genima) mogu biti različite:

1) supstitucije, 2) insercije i 3) delecije. (sl. 6.1)

Pod supstitucijom se podrazumeva zamena jednog para baza drugim parom baza u određenom segmentu DNK. Na primer, umesto C-G u toj poziciji zame-



Slika 6.1 – Tipovi mutacija

nom može da bude T-A. Ako se supstitucija baza desi u regionu koji kodira polipeptidni lanac, tada će iRNK koja je prepisana na ovom genu nositi pogrešnu informaciju u delu gena u kome se odigrala supstitucija. Kada ova iRNK dospe do ribosoma, pri translaciji, formiraće se polipeptidni lanac sa neodgovarajućom aminokiselinom u položaju gde se desila supstitucija baza. Otuda zamena jednog para baza drugim u molekulu DNK može da dovede do supstitucije jedne aminokiseline u odgovarajućem polipeptidu.

Ova vrsta mutacija je označena kao *misens* (pogrešna)-mutacija (sl. 6.2). Hemoglobin S je nastao kao posledica misens-mutacije. Na genskom lokusu za beta-lanac hemoglobina u položaju 6 nalazi se genetska šifra CTC za glutaminsku kiselinu. Supstitucijom baza /T → A/ menja se ovaj triplet u CAC, koji predstavlja genetski kod za valin. Prema tome, hemoglobin S se razlikuje od normalnog beta-lanca samo u jednoj aminokiselini: umesto glutaminske kiseline javlja se valin.

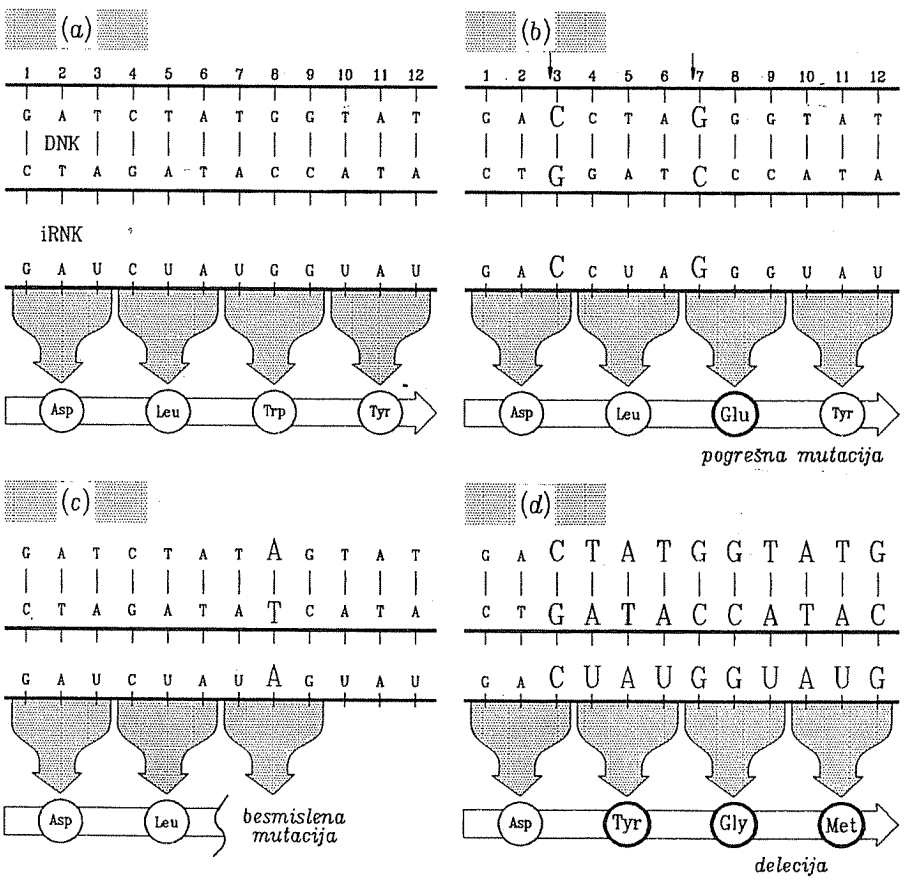
Osobe homozigoti za mutirani gen hemoglobina S imaju tešku hemolitičku anemiju, koja je označena kao srpasta anemija.

Kakav efekat može da ima supstitucija aminokiselina na funkcionisanje polipeptida, zavisi od toga, gde se u lancu desila, i koja je aminokiselina zamenjena drugom aminokiselinom. Ponekad se supstitucija može desiti u delu molekula koji toleriše promene jer ne dovodi do izrazitih promena u trodimenzionalnoj strukturi proteina; funkcionisanje molekula biće tada sasvim normalno. Ili, ako se jedna aminokiselina, npr., leucin, zameni drugom, koja je hemijski vrlo slična (kao što je izoleucin), efekat na polipeptid može biti vrlo mali ili nikakav. U ovim slučajevima, pošto nema fenotipskog efekta, mutacije se mogu otkriti samo specijalnom procedurom, poznatom kao elektroforeza proteina.

Nonsens (besmislena) mutacija nastaje kada se supstitucijom baza u molekulu DNK kodon za određenu aminokiselinu na iRNK preobrazi u jedan od tri besmislena kodona UAG, UGA, UAA; ova mutacija dovešće do prevremenog prekida translacije a dužina sintetisanog polipetidnog lanca zavisiće od toga u kom je delu molekula DNK došlo do supstitucije (sl. 6.2).

Supstitucije su najčešći vid mutacija; dešavaju se u toku replikacije DNK kada dođe do pogrešnog sparivanja baza čija je hemijska struktura izmenjena pod dejstvom mutagena. Rezultat pogrešnog sparivanja su dve vrste supstitucija: ***tranzicija*** i ***transverzija***.

U tranziciji je purin zamenjen drugim purinom ili se jedan pirimidin zamenjuje drugim primidinom ili obrnuto A ⇆ G T ⇆ C prema tome postoje četiri moguće kombinacije u tranziciji. Na primer, adenin (A) na jednostrukoj niti DNK dupleksa može se transformisati u modifikovani molekul A^+ (sl. 6.3). Pri replikaciji će se spariti ovaj izmenjeni A^+ pogrešno sa citozinom pa će komplementarna nit nositi citozin u ovom položaju. U drugoj replikaciji citozin će se spariti sa guaninom, pa se razlikuje u poređenju sa ishodnim lancem DNK jer umesto A-T ima G-C nukleotidni par, što znači da je došlo do mutacije tipa tranzicije, gde je umesto adenina guanin

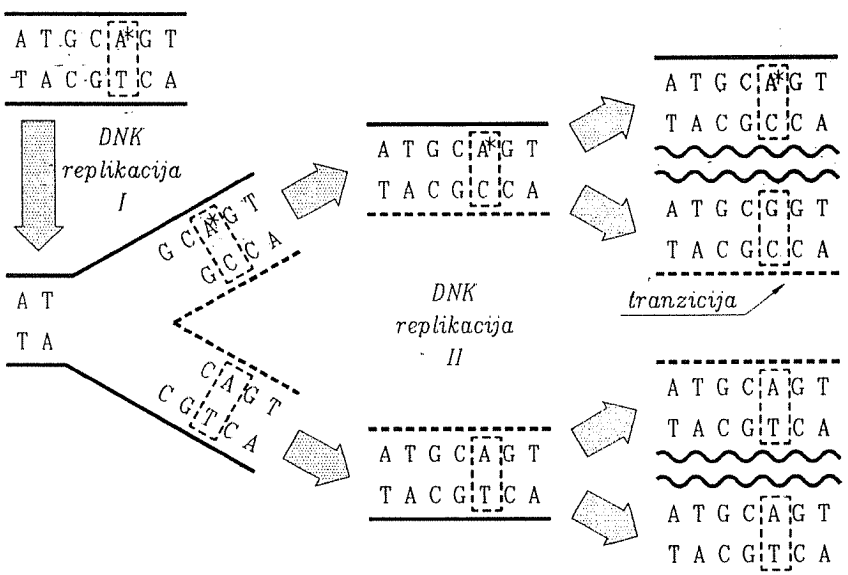


Slika 6.2 – Normalan segment DNK (a); različiti tipovi mutacija (b,c,d).

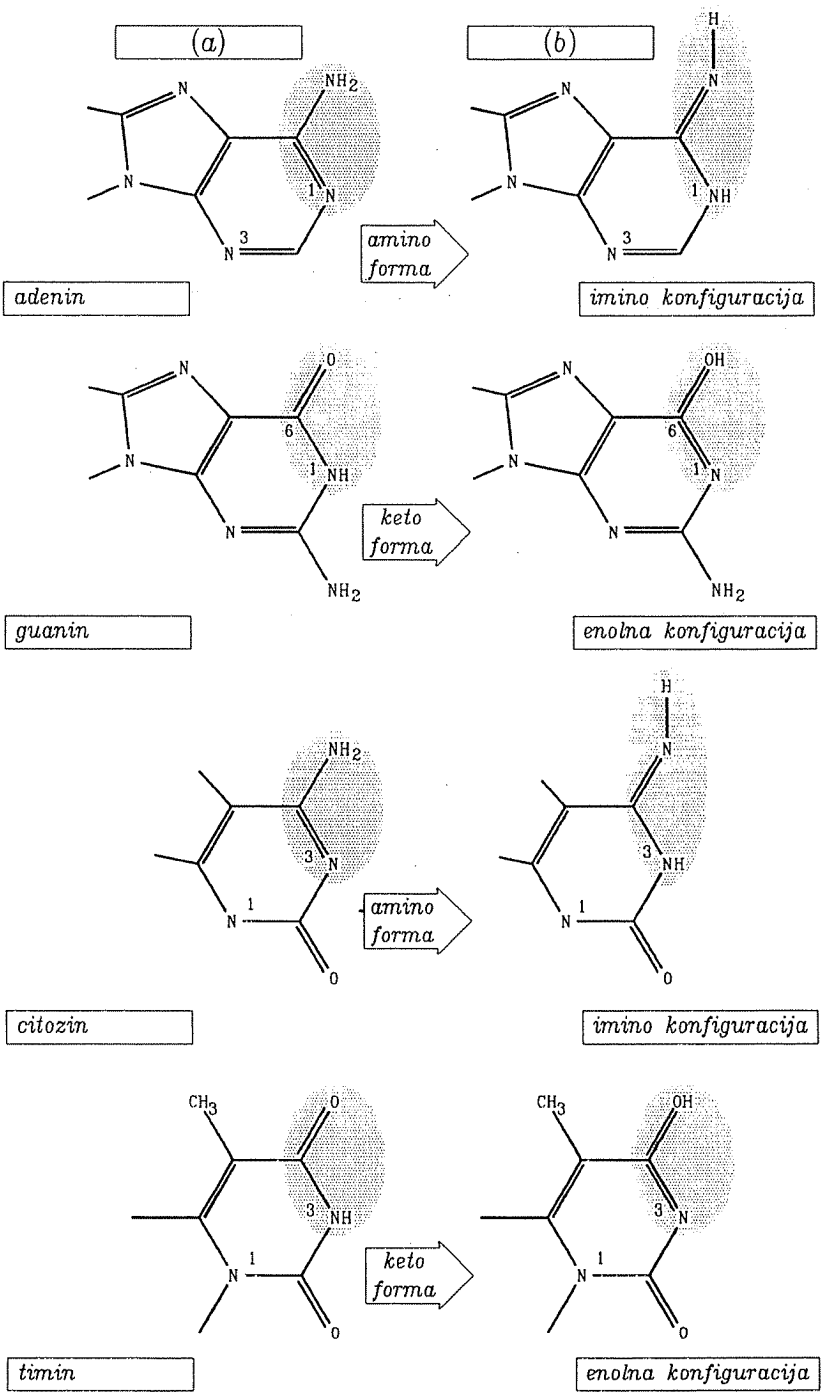
(A→G) a umesto timina citozin (T→C). Ovaj vid mutacija ne menja osovinu molekula DNK; novi gen, koji se razlikuje od originalnog gena, dosledno će se replicirati u ovako izmenjenoj formi.

Druga vrsta mutacija-transverzija može nastati kao rezultat pogrešnog sparivanja pri kome je purin zamenjen pirimidinom ili obratno, npr. umesto adenina citozin, umesto guanina citozin itd. A ⇆ C A ⇆ T G ⇆ C G ⇆ T znači osam mogućih kombinacija se javlja u transverziji. Većina transverzija se teško može uočiti jer ne izazivaju promene u duplom heliksu DNK. Međutim, u slučaju pogrešnog sparivanja purina sa purinom, npr., skelet lanca DNK šećer-fosfat podleže znatnoj distorziji da bi se prilagodio velikim bazama, što znači da se u ovom slučaju menja osovina DNK. Veruje se da malobrojni mutageni indukuju transverzije direktno, mada način njihovog delovanja ostaje i dalje nejasan. Gubitak *(delecija)* ili povećanje broja *(insercija)* nukleotida u genu narušavaju redosled baza, što dovodi do izmene genetske šifre od mesta događaja do kraja genskog lokusa. Informaciona RNK transkribovana na izmenjenom genu imaće drugojačije kodone od mesta delecije ili insercije nukleotida u odnosu na intaktni gen, što će se odraziti i pri translaciji, odnosno taj deo polipeptidnog lanca sadržaće sasvim različite aminokiseline. Ovaj polipeptidni lanac je bez funkcije, tj. nema biološku aktivnost (sl. 6.2).

Watson i Crick su pokazali da purinske i pirimidinske baze mogu postojati u alternativnim tautomernim oblicima; adenin i citozin normalno imaju NH_2-grupu, odnosno nalaze se u amino-formi, dok guanin i timin imaju keto-grupu CO – keto-forma. Amino- i keto-forme baza su široko rasprostranjene u prirodi. Međutim, iz nepoznatih uzroka, retko, atom vodonika može da promeni svoj položaj, da se ispolji nestabilnost ovog atoma, da amino-forma baza pređe u imino-oblik NH_2 → NH; slično tome, keto-oblici mogu se izmeniti u retku enolnu-COH-formu. (sl. 6.4) Ukoliko se javi imino-ili enolni oblik baza, pri replikaciji DNK



Slika 6.3 – Tranzicija (A→G) nastala pogrešnim sparivanjem modifikovanog adenina (A*) sa citozinom.



Slika 6.4 – Purinske i pirimidinske baze (a) i njihovi retki nestabilni tautomerni oblici (b).

doći će do pogrešnog sparivanja, kao i u slučaju kada su baze izmenjene pod dejstvom hemijskih mutagena, odnosno adeninu u imino-formi je komplementaran citozin a timinu u enolnoj formi odgovara guanin (sl. 6.5). Prema tome, promena baza iz jednog oblika u drugi dovodi takođe do mutacija tipa supstitucije, što je označeno kao spontane mutacije jer nije utvrđeno koji faktori prouzrokuju ove promene. Srećom, ova pojava je retka u prirodi; za normalnu biološku funkciju DNK neophodna je relativno stabilna lokacija atoma, posebno vodonika, u molekulima baza. Kada atomi vodonika ne bi imali fiksiranu lokaciju, adenin bi se često sparivao sa citozinom a guanin sa timinom pa bi i mutacije bile znatno češće.

Pitanje o faktorima prirodnog mutiranja je centralni i najsloženiji problem ne samo genetike već i savremene biologije uopšte.

Već je naglašeno da su svi geni podložni promenama – mogu da mutiraju. Međutim, svaki gen ima sopstvenu karakteristiku mutacionog ponašanja, odnosno neki geni su više podložni promenama, dok su drugi stabilniji; stoga se kaže da geni imaju različitu stopu mutacije.

Na primer, ustanovljeno je da stopa mutacije pojedinih gena čoveka iznosi u proseku između 10^{-5} i 10^{-6}, tj. jedna mutacija se javlja na 100.000 ili na 1.000.000 gameta po generaciji.

Mada se mnoge mutacije dešavaju spontano, one mogu biti indukovane različitim agensima sredine. Faktori koji mogu prouzrokovati mutacije označeni su kao ***mutageni.***

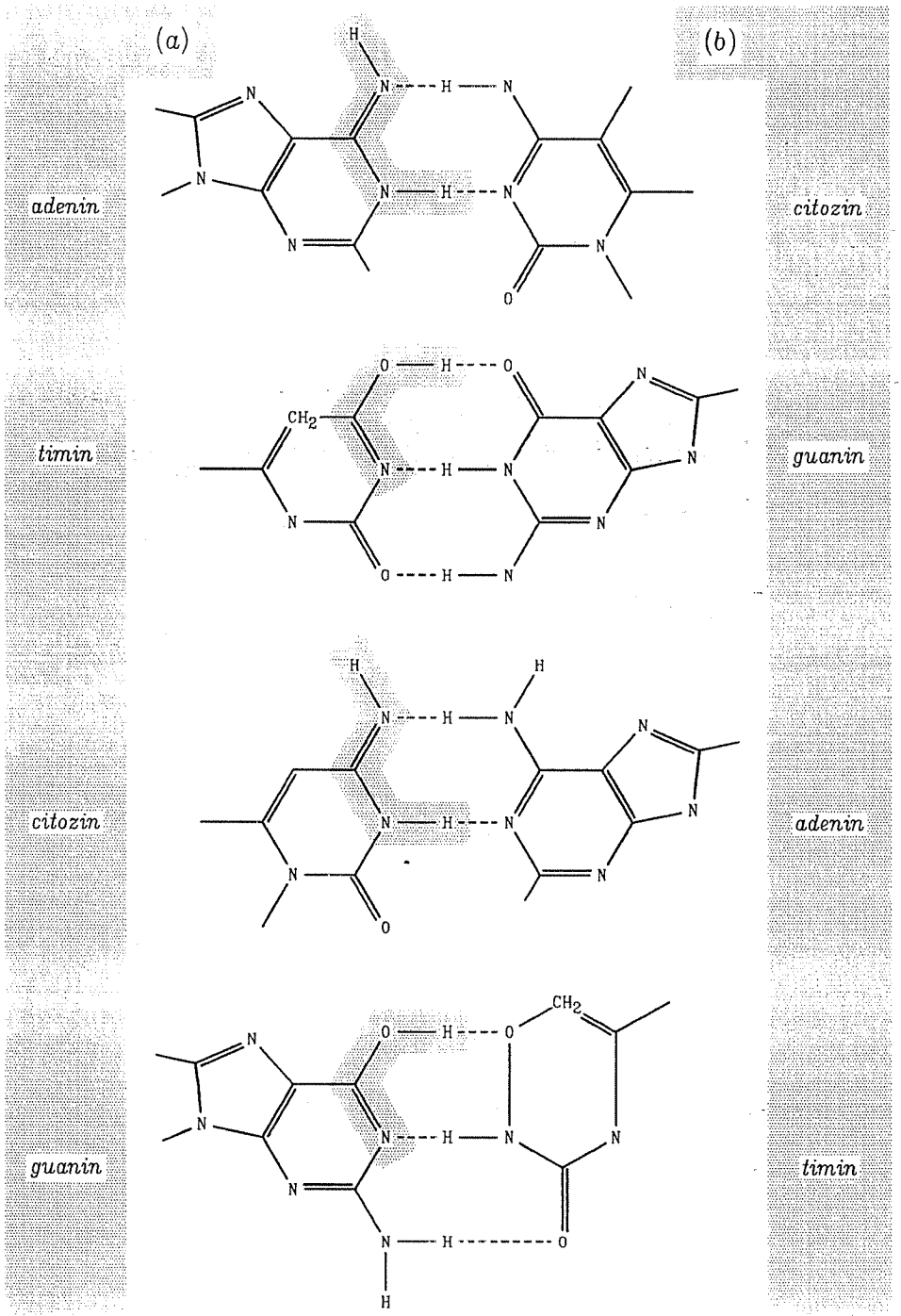
Za izučavanje mutacija veliki značaj ima mogućnost veštačkog indukovanja mutacija pomoću različitih mutagenih sredstava. Agensi koji izazivaju mutacije svrstavaju se u hemijske i fizičke mutagene.

Hemijski mutageni

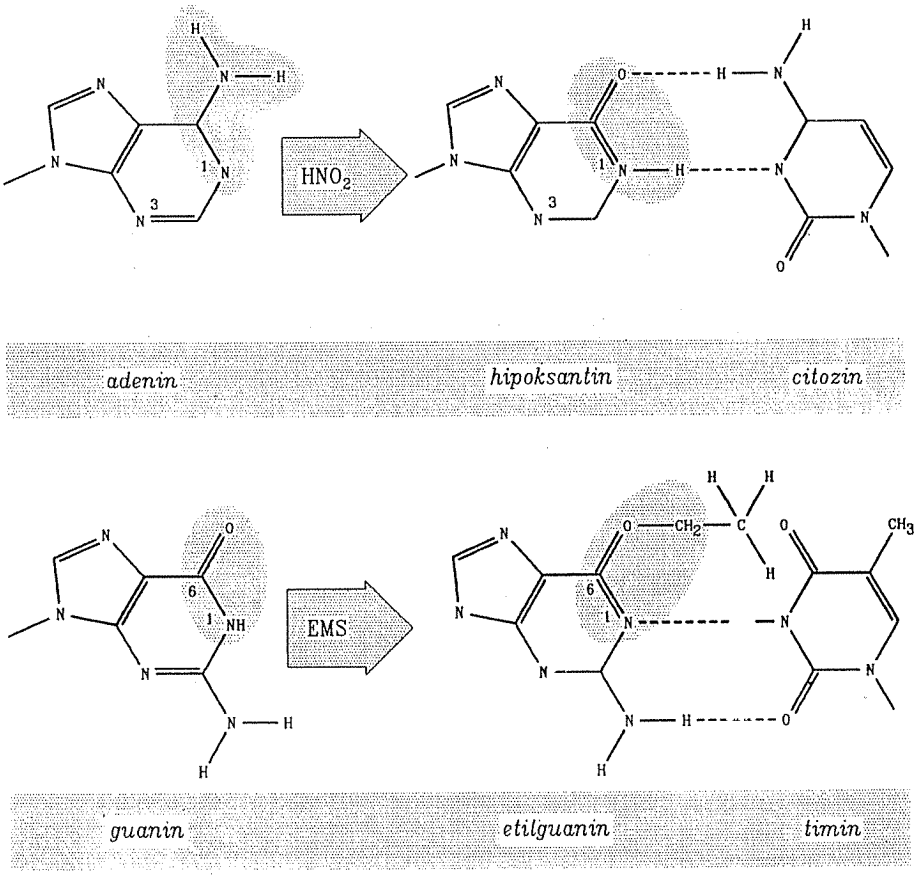
Hemijski mutageni deluju na tri načina: 1) reaguju sa DNK i transformišu baze, 2) deluju samo pri replikaciji, analoge baze, npr. 5-(brom-uracil), koji se uključuje u molekul DNK umesto uobičajenih baza, 3) treći tip hemijskih mutagena su, npr., akridinske boje. Mogu da se umetnu u molekul DNK i da izazovu inserciju ili deleciju.

Od hemijskih mutagena značajna je azotasta kiseline (NHO_2), koja je vrlo snažan mutagen, deluje direktno na DNK, odnosno transformiše baze iz amino-forme u keto-oblik; npr., pod dejstvom azotaste kiseline adenin se menja u hipoksantin. U lancu DNK koji sadrži hipoksantin pri replikaciji ugradiće se nukleotid sa citozinom koji je komplementaran hipoksantinu. U drugoj replikaciji u jednostruki lanac koji sadrži citozin ugradiće se komplementaran nukleotid koji nosi guanin pa će u tom položaju umesto A-T biti G-C, odnosno izvršiće se supstitucija tipa tranzicije. Slično će se dogoditi pod dejstvom etil-metan-sulfonata koji je takođe mutagen i menja guanin u etil-guanin; etil-guaninu je komplementaran timin pa će se i u ovom slučaju desiti tranzicija, odnosno umesto G-C nalaziće se A-T (sl. 6.6)

Druga vrsta mutagena obuhvata analoge baze; ove supstancije su hemijski slične bazama i mogu se inkorporirati u DNK umesto jedne od normalnih baza. Analoge baze se češće pogrešno sparuju nego normalne baze i tako povećavaju stopu mutacija. Na primer, analoga baza 5-brom-uracil ugrađuje se u DNK umesto timina a ima keto i enolnu konfiguraciju kao i timin (sl. 6.7). Međutim, 5-brom-uracil se mnogo češće preobraća u enolnu formu nego timin; u enolnoj formi analoga baza se sparuje sa guaninom. Na taj način 5-brom-uracil prouzrokuje tranziciju, odnosno umesto A-T javlja se G-C. U analoge baze ubraja se i 2-aminopurin- analog adeninu (sl. 6.8)



Slika 6.5 – Način sparivanja tautomernih oblika baza (a) sa bazama normalne konfiguracije (b):



Slika 6.6 – Dva tipa mutagena koji menjaju hemijsku strukturu baza

Već je naglašeno da akridinske boje mogu delovati kao mutageni; najznačajniji su proflavin i akridin-oranž, čije su dimenzije slične purin-piramidinskom paru baza. Akridinske boje kao aromatični molekuli deluju direktno na molekul DNK umeću se između dve susedne baze duplog heliksa i pri genetičkim rekombinacijama izazivaju nepravilan crossing-over koji dovodi do duplikacije odnosno delecije nukleocida. (sl. 6.9)

Fizički mutageni

Među fizičkim mutagenima značajno mesto zauzima jonizujuće zračenje. Pod jonizujućim zračenjem podrazumeva se svako zračenje koje u toku interakcije sa materijom kroz koju prolazi može da vrši jonizaciju atoma i molekula. Elektromagnetni talasi (X-zraci i gama-zraci) i korpuskularno zračenje (elektroni, protoni, pozitroni, alfa-zraci i neutroni) spadaju u jonizujuće zračenje.

Jonizujući zraci elektromagnetne prirode su vrlo prodorni, različite energije, što zavisi od talasne dužine; što je talasna dužina manja imaju veću energiju.

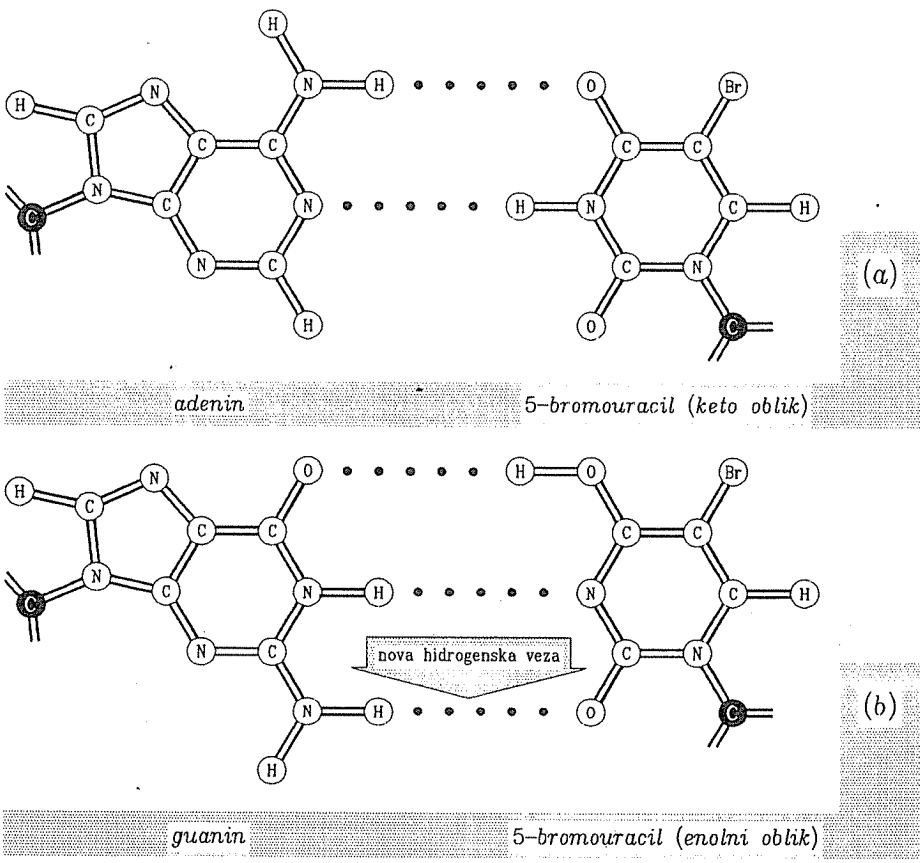
Kada se živi sistemi izlažu jonizujućem zračenju, apsorbovana energija može izazvati promene u makromolekulima ćelije, što može da dovede do tzv. radija-

cione ozlede. Ove promene mogu biti veoma štetne pa i smrtonosne.

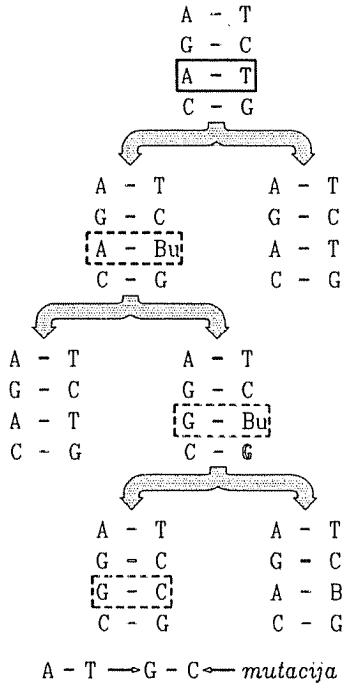
X-zraci i druge vrste jonizujućeg zračenja pri ulasku u ćeliju i duž njihovog puta izbacuju elektrone iz atoma i molekula i izazivaju njihovu ekscitaciju i jonizaciju. Izbačeni elektroni se sudaraju sa drugim molekulima stvarajući brojne jonizovane molekule. Nastali jonizovani molekuli se razlažu u ekstremno reaktivne jone i radikale koji prouzrokuju oštećenja: mogu se kombinovati sa bazama DNK i prouzrokovati greške u sparivanju baza pri replikaciji, što dovodi do supstitucije baza. Oni takođe mogu da raskinu veze između šećera i fosfata u skeletu DNK, što prouzrokuje prekide na DNK molekulu odnosno genu a time se sprečava ekspresija gena.

Broj štetnih mutacija zavisi od vrste jonizujućih zraka, primenjene doze, kao i vremenskog perioda u kome je organizam bio izlagan zračenju. Na primer, određena doza X-zračenja primenjena odjednom (akutna doza) izazvaće tri do četiri puta više mutacija nego ista data u seriji manjih doza (hronična doza). Pretpostavlja se da u ovom drugom slučaju između pojedinačnih zračenja enzimi opravke ispravljaju oštećenja molekula DNK.

Ultraljubičasto zračenje (UV) (nejonizujuće zračenje) takođe ima mutageno



Slika 6.7 – 5–Bromuracil u keto obliku sparuje se sa adeninom; u enolnoj formi sparuje se Sa guaninom.



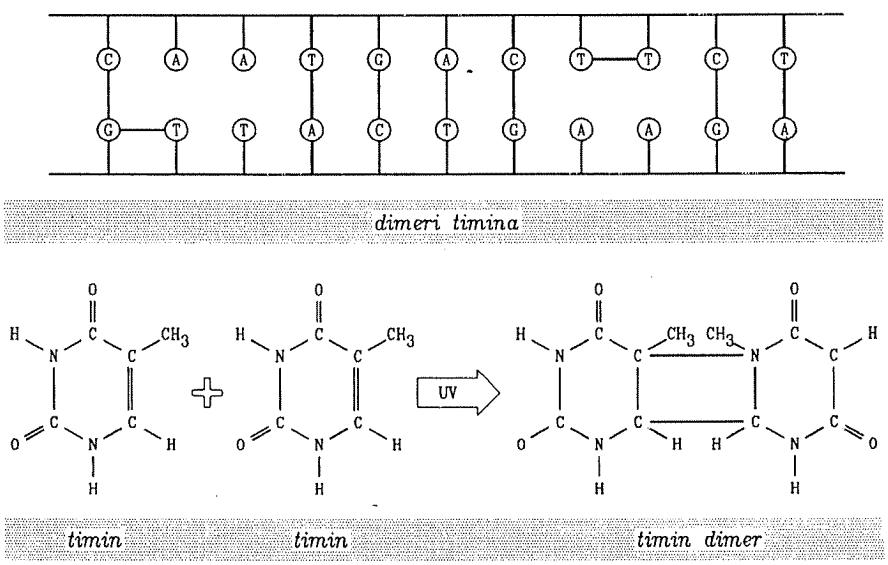
Slika 6.8 – Tranzicija nastala kao posledica ugrađivanja 5–bromuracila pri replikaciji DNK

dejstvo. Ovi zraci imaju malu prodornu moć (oko nekoliko milimetara pa mogu

Slika 6.9 – Ugrađivanje akridina u DNK

izazvati mutacije samo u površinskim ćelijama epidermisa; ove promene nemaju značaja za buduće generacije jer ne obuhvataju germinativne ćelije.

Pod dejstvom UV zračenja nastaju promene u bazama molekula DNK; npr., UV zraci talasne dužine oko 280-310 nanometara izazivaju u timinu slabljenje dvostruke veze između 4. i 5. ugljenikovog (C) atoma, što omogućava da se dva susedna timina međusobno povežu dajući dimere (sl. 6.10). Ovi dimeri timina mogu sprečiti separaciju i replikaciju DNK ili dovode do pogrešnog sparivanja baza. U drugom slučaju nakon slabljenja veza između 4. i 5. C atoma u citozinu omogućava se (da se na ovom mestu



Slika 6.10 – Stvaranje dimera timina u molekulu DNK pod uticajem UV zračenja.

vezuje molekul vode; nastali fotoprodukt je nesposoban da formira vodonikove veze sa guaninom, što dovodi do razdvajanja lanca DNK.

Oštećenja na molekulu DNK nastala pod dejstvom UV zračenja mogu da se poprave uz učešće enzima tzv. ripersistema.

Poznato je retko kožno oboljenje Xeroderma pigmentosum koje se nasleđuje kao autosomno recesivno svojstvo. Pacijenti su ekstremno osetljivi na UV zračenje i kod većine ovo oboljenje alterira u kancer kože. Xeroderma pigmentosum se javlja u više oblika. Kod nekih pacijenata sa Xerodermom pigmentosum ustanovljen je poremećaj u reparacionom sistemu tako da oni nisu sposobni da isprave oštećenja izazvana UV zračenjem.

7

Rekombinacije

Dobro je poznato da nasledna osnova, iako je stabilna, ipak, pod delovanjem različitih činilaca sredine ili spontano, trpi brojne promene: menja se broj hromosoma, pod delovanjem klastogena se menja struktura hromosoma a mutageni menjaju hemijsku građu nasledne osnove.

Mada su mutacije najčešće štetne, čitav niz korisnih mutacija omogućio je raznolikost živih oblika, evoluciju i život uopšte.

Mutacije, bilo pozitivne ili negativne, dešavaju se relativno retko. Zato se smatra da su glavni izvor fenotipske i genotipske varijabilnosti ***rekombinacije.***

Procesi rekombinacije otkriveni su kod svih živih organizama od virusa do čoveka. Osnovna razlika između mutacija i rekombinacija je u tome što mutacije izazivaju promenu informacija u DNK, znači dovode do stvaranja kvalitativno novih oblika gena, a rekombinacije su samo nove kombinacije već postojećih gena roditelja (divljih i mutiranih, različitih divljih ili različitih mutiranih). Svako mešanje postojećih genoma pretpostavlja rekombinaciju. Pri tome, mogu da se rekombinuju ***slobodni geni*** (geni na različitim hromosomima), ali pod ***rekombinacijom u užem smislu reči*** podrazumeva se mešanje (razmena) ***vezanih*** gena.

Rekombinacije mogu da budu ***opšte,*** kada se odigravaju u bilo kom delu hromosoma a razmenjuju se homologi segmenti, i ***specijalizovane,*** kada se odigravaju samo na određenom delu hromosoma, a razmenjuju se nehomologi delovi genoma. Bez genetičkih rekombinacija sadržaj svakog individualnog hromosoma bio bi fiksiran a svi njegovi geni uvek vezani.

U eukariota se rekombinacije odigravaju:

a. u profazi mejoze I procesom crossing overa,
b. nove kombinacije hromosoma nastaju slučajnim razdvajanjem homologih hromosoma u I anafazi mejoze,
c. kompletni genomi gameta mešaju se u amfimiksiji, pri oplođenju.

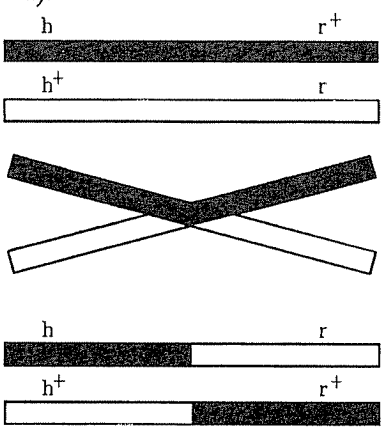
U prokariota se pri rekombinaciji meša samo deo genoma.

Crossing over

Danas je sasvim jasno da broj svojstava svake jedinke daleko premašuje broj hromosoma koji je karakterističan za datu vrstu. To znači da svaki hromosom mora da nosi veći broj gena. Zahvaljujući različitim metodama ispitivanja, danas znamo da je, npr., samo na hromosomu X čoveka locirano više od stotinu gena. Geni koji se nalaze na različitim parovima homologih hromo-

soma slobodno se kombinuju u potomstvu. Geni, linearno smešteni u jednom hromosomu, zbog specifičnog ponašanja hromosoma u mitozi i mejozi, prenose se kao "grupa vezanih gena". U ćelijama čoveka postoje 22 grupe vezanih autosomnih gena i jedna grupa X-vezanih gena (u ženskom polu) ili dve grupe, X-, odnosno Y-vezanih gena u muškom polu.

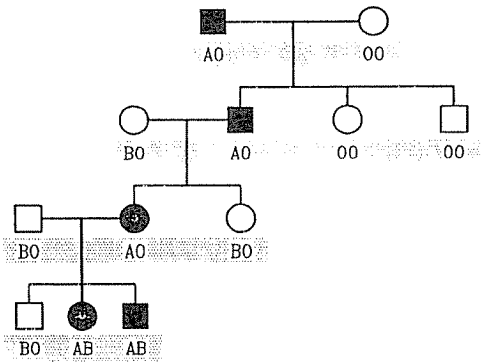
Eksperimentalni radovi su takođe pokazali da i vezani geni, koji se u fenotipu izražavaju kroz vezana (korelativna) svojstva, mogu povremeno da se razdvoje. Koliko će se često vezani geni razdvajati, zavisi od mnogih činilaca, ali je jedan posebno značajan: udaljenost vezanih gena. Razdvajanje vezanih gena omogućuje proces crossing overa, pri čemu homologi hromosomi razmene homologe segmente (sl. 7.1).



Slika 7.1 – Nesestrinske hromatide homologih hromosoma razmenjuju homologe segmente. Kao rezultata crossing overa nastaju dva rekombinantna hromosoma (hromatide)

Ukoliko su geni na hromosomu blizu jedan drugome, razdvajaju se relativno retko. Što su više udaljeni, mogućnosti za njihovo razdvajanje su veće.

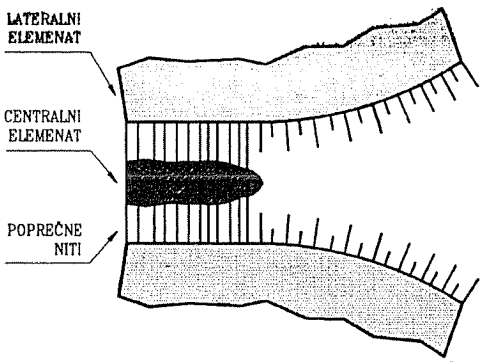
Jedan procenat razdvajanja označen je kao Morgan (0,01 Morgana = centi Morgan) ili kao *jedinica genske mape.* Izračunavanjem procenta rekombinanti može se vrlo precizno odrediti linearni raspored gena na hromosomu. Čak su i lokacije vezanih gena čoveka određene ovom metodom (npr. genski lokus ABO i lokus za nokti-čašica sindrom na hromosomu br. 9, gen za daltonizam i hemofiliju na X-hromosomu). Za prvi par gena izračunato je da je udaljenost 10 cM a za drugi 12 cM (sl. 7.2).



Slika 7.2 – Rodoslovno stablo porodice u kojoj svi članovi koji nose gen za krvnu grupu A (AO i AB) imaju i NP, sindrom (nokti-čašica). Gen je dominantan i vezan je za genski lokus ABO na hromosomu br. 9.

Na učestalost pojave rekombinantnih jedinki utiču i pol, susedni geni i dr. Tako, npr. heterohromatin smanjuje učestalost rekombinacija.

Razdvajanje vezanih gena odigrava se u profazi I mejotičke deobe. Između nesestrinskih hromatida homologih hromosoma razmeniće se homologi delovi, odnosno delovi koji nose iste genske lokuse. Pre početka razmene treba da se homologi hromosomi prepoznaju i da konjugiraju. Postoje mnoge hipoteze o mehanizmu crossing overa ali je najprihvatljivija hipoteza R. Hollidaya. Homologi segmentni moraju da se postave jedni naspram drugih i da budu dovoljno dugo tako postavljeni. Zato se formira jedna struktura koja se naziva sinaptonemalni kompleks, a ima izgled trake sa tri komponente: dva lateralna, zbijena elementa i tanki centralni element. Proteinskog je sastava. Lateralni i centralni elementi spojeni su poprečnim elementima (sl. 7.3). Homologi hromosomi os-



Slika 7.3 – Sinaptonemalni kompleks. U leptotenu počinje formiranje lateralnih elemenata. U zigotenu se obrazuje i nešto svetliji centralni element, poprečnim nitima spojen za lateralne elemente. Struktura je proteinske prirode; u diplotenu se kompleks razgrađuje

taju spojeni sinapsama tokom pahitena. U nivou sinapsi se odigrava "crossing over". Pod delovanjem jedne endonukleaze preseca se jedna nit dvočlane DNK u obe nesestrinske hromatide spojenih homologih hromosoma.

Presečene niti moraju da budu istog smera (obe su ili 3'–5' ili 5'–3'). Presečena nit se zatim komplementarno umeće u nesestrinsku hromatidu (sl. 7.4). Umetnuti i presečeni deo veže DNK-ligaza. Na taj način se formira jedna specifična struktura sastavljena iz nesestrinskih hromatida, oblika slova X. Ona se okreće i obrazuje krst (sl. 7.5), čiji su kraci dvolančane DNK, a srednji deo jednolančani mostovi. U predelu mostova jednočlana DNK se lako kida. Ukoliko prekid nastane u pravcu sever-jug, dobijaju se dve rekombinovane hromatide. Homologi hromosomi su, znači, razmenili delove, izvršen je crossing over. Ukoliko je prekid nastao u pravcu istok-zapad, jedna nit DNK je intaktna a druga rekombinovana (sl. 7.6). Delovi hromatide u kojima je došlo do rekombinacije imaju različite, nekomplementarne segmente: predstavljaju "heterodupleks". Ti delovi trpe distorziju, pa ih sistemi opravke prepoznaju i opravljaju. Rezultat opravke može da bude divlji ili mutirani gen. Ako heterodupleks uđe u replikaciju, od njega nastaju dve različite hromatide: jedna sa divljim a jedna sa mutiranim genom.

Krstasta struktura koja se obrazuje pri crossingoveru uočena je elektronskim mikroskopom pri rekombinaciji plazmida i u bivalentima nekih insekata.

Kada u diplotenu počne odvajanje hromatida, tamo gde su bile sinapse vide se hijazme, mesta na kojima je izvršen crossingover.

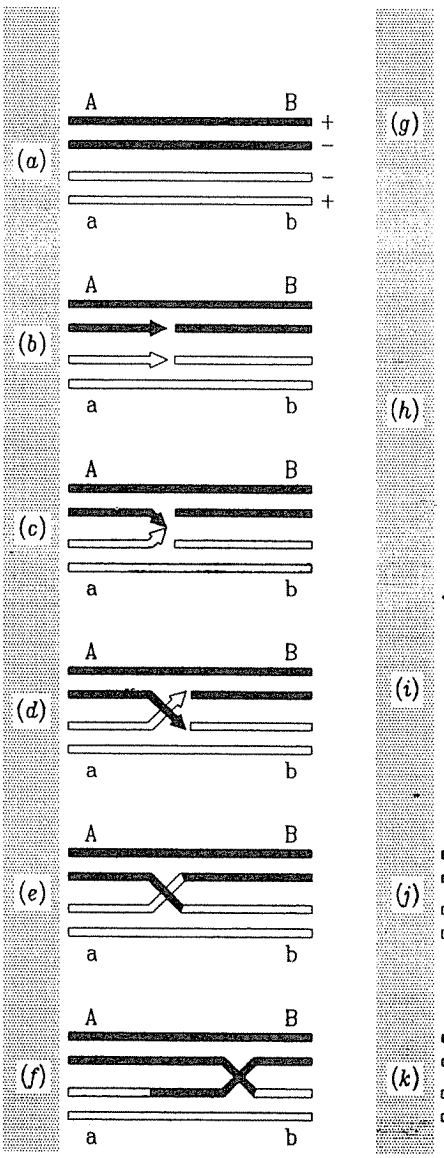
Broj hijazmi je za određenu vrstu konstantan ali može da se menja zavisno od različitih činilaca. Više hijazmi se uočava na većim hromosomima. U čoveka ima oko 50-54 hijazmi po jednoj metafazi. I. Ukoliko se ne obrazuju hijazme, remeti se gametogeneza (sl. 7.7).

Već je rečeno da je crossing over enzimski proces. Endonukleaza seče niti DNK, ligaza povezuje presečene delove a DNK-polimeraza popunjava delove u kojima nedostaju komplementarni nukleotidi.

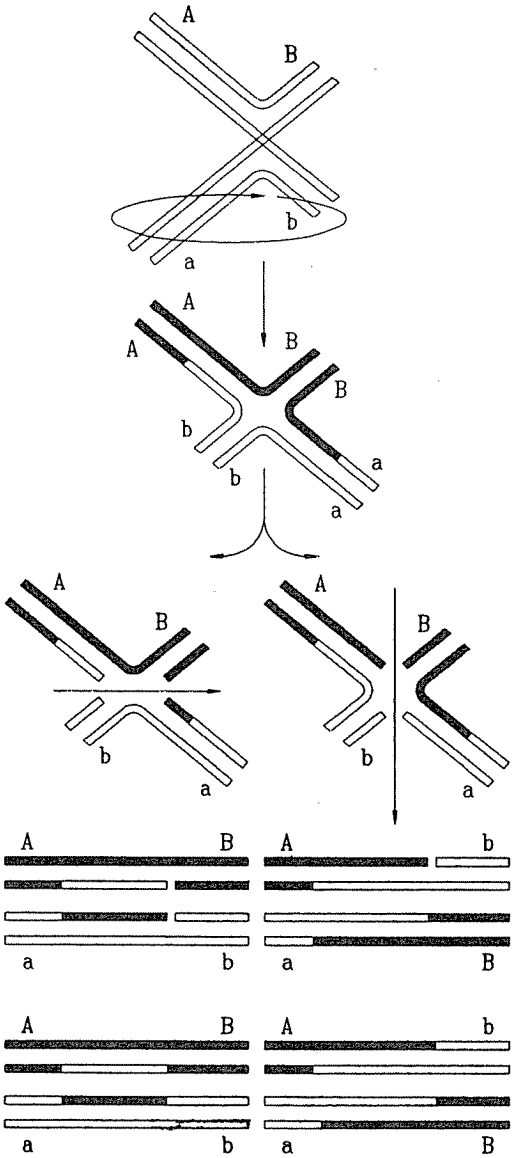
Crossing over je veoma značajan mehanizam koji obezbeđuje rekombinacije a time i polimorfizam. Ne tako davno je uočeno da crossing over može da se odigra i u mitozi (mitotski crossing over). U mitozi može da se razmenjuju i delovi sestrinskih hromatida (RSH) (sl. 7.8). Ovakva razmena je uočena u svim ispitivanim ćelijama. Smisao RSH nije jasan, ali ima podataka koji pokazuju da različiti štetni činioci kao što su ozračivanje, hemijske materije, virusne i bakterijske infekcije, maligne bolesti povećavaju učestalost RSH.

Proučavanje procesa rekombinacije u čoveka je vrlo složen problem. Humani genom je složen, regulacija osnovnih bioloških procesa nije još objašnjena pa se za proučavanje rekombinacija koriste

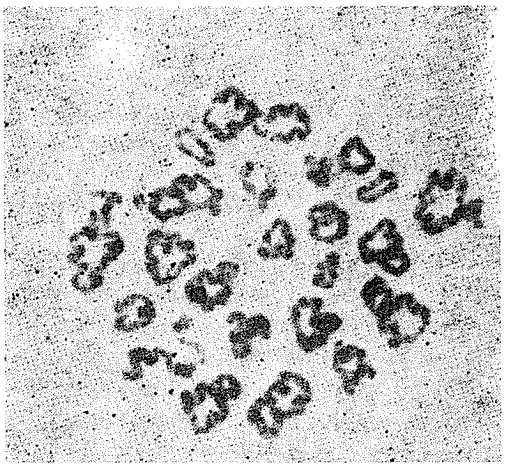
manje složeni genomi mikroorganizama. Imajući u vidu činjenicu da je nasleđna osnova svih živih organizama izgrađena od nukleinskih kiselina, da funkcioniše po manje-više istim principima, da je genetska šifra univerzalna a mehanizmi



Slika 7.4 – Hollydayev model crossing overa. Homologi hromosomi se približavaju (a); jedna endonukleaza seče lanac DNK u nesestrinskim hromatidama istog smera (3'-----5' ili 5'-----3') (b); presečene niti se komplementarno umeću u hromatide (c,d) a DNK-ligaza povezuje slobodne krajeve DNK lanca (e,f).



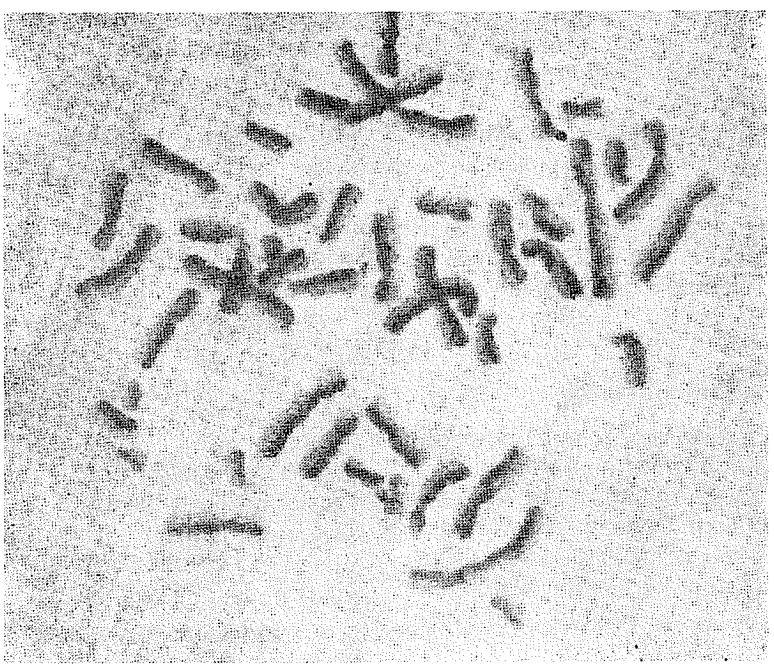
Slika 7.5 i 7.6. – Hromatide se okreću za 180° i obrazuju krstastu strukturu (g,h); prekidima u pravcu istok–zapad ili sever–jugi nastaju heterodupleksi ili rekombinovani hromozomi (j, k).



Slika 7.7 Hijazme u mejozi I čoveka

osnovnih bioloških procesa – replikacija DNK, transkripcija, biosinteza proteina – skoro identični u živom svetu, rezultati dobijeni ispitivanjem gljiva, bakterija i virusa mogu da se koriste i od neprocenjive su vrednosti za razumevanje strukture, funkcije i varijabilnosti nasledne osnove čoveka. Zahvaljujući radovima na mikroorganizmima, mnogi procesi o kojima se malo znalo mogli su da se objasne. Razvile su se nove biološke discipline i metode koje su omogućile da se dešifruje nasledna osnova, da se naprave genske mape, odnosno lociraju geni na hromosomima mnogih biljnih i životinjskih vrsta, uključujući i čoveka. Omogućeni su "premeštanje" gena i genetski inženjering. U toku su i intenzivni radovi na "genskoj terapiji".

Bakterije su vrlo pogodan materijal za genetička ispitivanja. Brzo se razmnožavaju (nekoliko desetina minuta), daju veliki broj potomaka pa se i najređe mutacije lako otkrivaju, mutanti se izoluju i kloniraju. Bakterije su haploidne – znači, nema dominantnih i recesivnih mutacija već se svaka promena u genomu odmah izrazi u fenotipu. Bakterije žive na minimalnim podlogama: malo vode, mineralnih materija, neko jednostavno organsko jedinjenje, biotin.



Slika 7.8 – Razmena sestrinskih hromatida (SCH ili RSH) u humanoj ćeliji

Bakterije "divljeg" soja od ovih materija stvaraju sve molekule koji su im potrebni za život: svojih dvadesetak aminokiselina, purine, pirimidine, DNK, RNK, enzime, proteine ćelije (za membranu, kapsulu) i dr. Takve bakterije se nazivaju prototrofima. Ukoliko bakterija ne može da živi na minimalnoj podlozi, preživela je neku mutaciju. Na primer, ako jedna bakterija ne može da razlaže laktozu, neki od gena lac operona je mutirao, ako ne može da sintetiše leucin, u pitanju je mutacija drugih gena itd. (auksotrofi). Eksperimenti ukrštanja između divljih i mutiranih sojeva ili različitih mutiranih sojeva, pokazali su da se u bakterija odigravaju procesi rekombinacije: transformacija, konjugacija i transdukcija.

U *transformaciji* deo DNK ćelije donora ulazi u ćeliju recipijenta i rekombinuje se sa hromosomom recipijenta.

Pri *konjugaciji* dve ćelije stupaju u direktan kontakt, između njih se obrazuje protoplazmatični most preko koga genetski materijal donora (muške ćelije) prelazi u recipijenta (žensku ćeliju) i izvrši rekombinaciju.

Transdukcija zahteva prenosioca (vektor). Najčešće je to bakteriofag ili plazmid. Transdukciju vrši i faktor polnosti, faktor F', pa se proces naziva seksdukcija. Prenosilac unese deo DNK donorne ćelije u recipijenta a zatim sledi rekombinacija.

Transformacija

Proces transformacije ne zahteva kontakt između dve ćelije a opisan je u bakterija, modrozelenih algi i kvaščevih gljiva. Fragment DNK, veličine oko 0,3-8x10^6* daltona, iz različitih delova DNK-hromosoma donora, ulazi u recipijenta i rekombinuje se sa homologim segmentom njegovog hromosoma. Fragment DNK ne mora da pripada istoj vrsti pa tako DNK iz ćelija timusa govečeta (sisara) može da izvrši transformaciju u bakterija. Neke bakterije, kao npr., B. subtilis ili S. pneumoniae, relativno lako bivaju transformisane. Takvi oblici se nazivaju ***kompetentnim.***

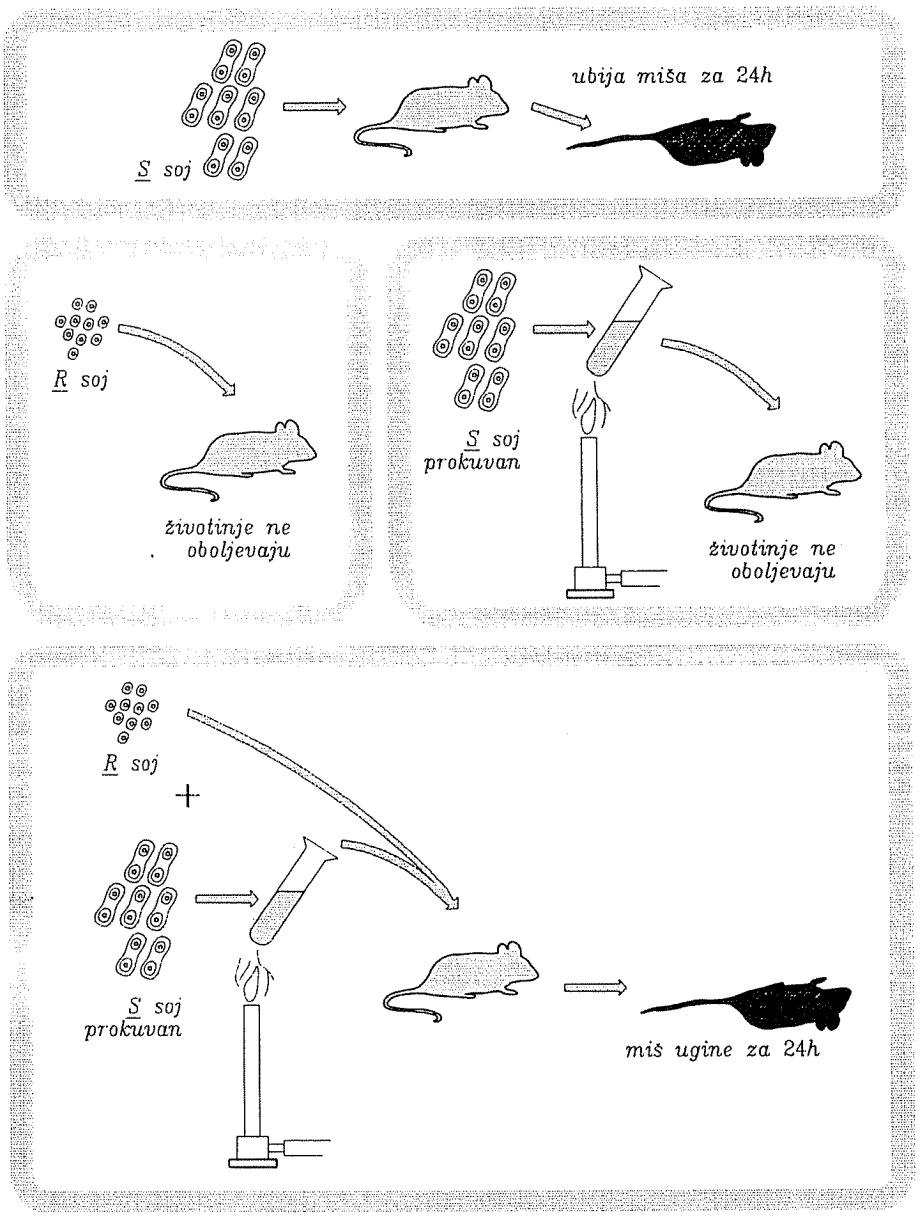
Prvi eksperimenti koji su pokazali da jedna bakterijska ćelija ili deo ćelije može da izmeni karakteristike druge ćelije datiraju još od 1928 god. U to vreme je F. Griffith ispitivao patogenost S. pneumoniae, bakterije koja izaziva zapaljenje pluća u čoveka a izuzetno je patogena za miševe (ubija životinje u roku od 24 sata).

Patogeni sojevi stvaraju glatke kolonije (smouth – gladak), pa su označeni kao S-sojevi. Mutirane bakterije stvaraju grube, hrapave kolonije (rough – hrapav), pa su označene kao R-soj. R-bakterije nisu patogene. Kada su miševima istovremeno ubrizgavane žive R-bakterije (nepatogene) i prokuvane (znači, ubijene a samim tim nepatogene) S-bakterije, miševi su oboleli i ubrzo uginuli (sl. 7.9). Iz krvi miševa su izolovane S-bakterije. Nije bilo verovatno da su bakterije doživele povratnu mutaciju. U organizmu miševa R-bakterije su se izmenile "transformisale". Transformisane bakterije su se razmnožavale i davale patogeno potomstvo.

Griffithovi eksperimenti su mnogo puta ponovljani pa je ustanovljeno da S-soj ima glatku, polisaharidnu kapsulu, otpornu na odbrambeni sistem inficirane životinje. R-soj nema kapsulu i čim se nađe u krvi miševa, biva uništen. Pri transformaciji R-bakterije ponovo stiču sposobnost da obrazuju kapsulu, postaju otporne na odbrambeni sistem životinja, odnosno postaju S-soj.

Obrazovanje kapsule je fenotipsko svojstvo koje kontroliše nasledna osnova. Pri mutaciji ovaj gen se menja, ne ob-

* Jedan dalton = masa 1 H atoma = 3.32 x 10^{-24} g



Slika 7.9 – Eksperimenti sa Staphylococcus pneumoniae. S-soj ubija miševe u roku od 24^h. Mutiran R-soj nije patogen, kao ni prokuvane bakterije S-soja. Istovremena aplikacija prokuvanih S-bakterija i živih R-bakterija ubija životinje

razuje se kapsula. Deo DNK ubijenih S-bakterija sa genom za kapsulu (S-genom) pri transformaciji je ušao u ćelije R-bakterija i rekombinovao se sa DNK domaćina. U rekombinaciji je mutirani R-gen zamenjen divljim S-genom. Avery, Mc Leod i Mc Carty 1944. god. dokazuju da transformaciju vrši čista DNK, tj. da

je DNK "aktivni princip transformacije". Tada se još smatralo da je DNK mutagen koji menja genom R-bakterija.

Prema savremenim podacima u kompetentnu ćeliju R-bakterija ulaze različiti fragmenti DNK donora. Fragmenti čija dužina mora da bude oko 10^6 daltona (dvojni lanci DNK) nose različite gene a neki od njih i divlji S-gen. U ćeliji R-bakterija enzim translokaza razlaže jednu nit (lanac) dvolančane DNK a energiju koja se pri tome oslobodi ćelija koristi za ugradnju intaktne niti DNK u homologi segment ćelije recipijenta (sl. 7.10). Ukoliko je gen za enzim mutiran, nema transformacije.

U predelu DNK gde se nalazi R-gen DNK ima jedan lanac sa rasporedom nukleotida karakterističnim za R-gen i jedan lanac karakterističan za S-gen. U samom genu nukleotidi nisu apsolutno komplementarni pa obrazuju ***heterodupleks.***

T A C C G G T A G
I I I I I I I I I
A T G G T C A T C

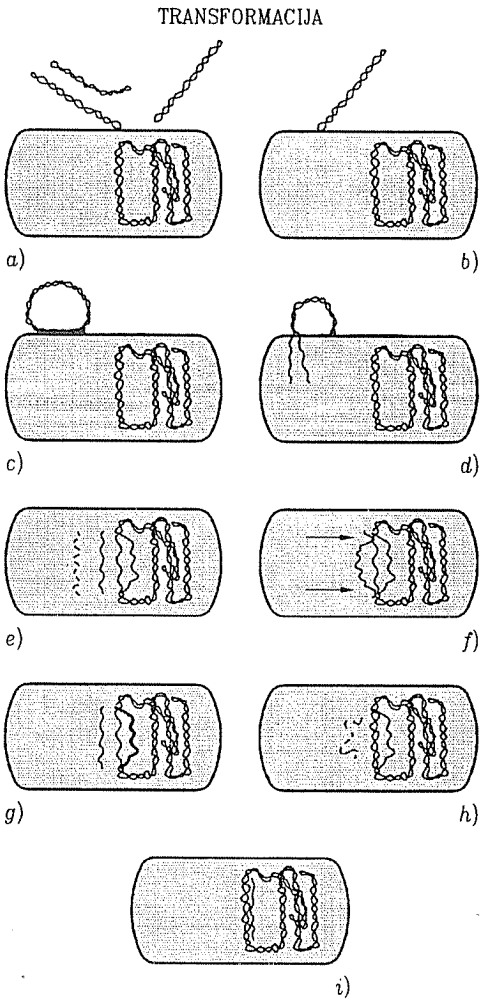
Bakterija sa heterodupleksom može da se replikuje, pri čemu daje R- i S-soj bakterija – znači, jedan mutiran i jedan rekombinovan "divlji", S-soj.

Isto tako, specifični sistemi popravke DNK mogu da koriguju heterodupleks u S- i R-smislu.

Slični eksperimenti su rađeni sa bakterijama osetljivim na različite antibiotike (npr., streptomicin) i otpornim na ovaj lek, a testirana su i mnoga druga fenotipska svojstva bakterija.

Eksperimentalni radovi su pokazali da proces transformacije može da pomogne u mapiranju hromosoma (određivanju položaja i redosleda gena).

Fragment koji vrši transformaciju ima određenu dužinu pa će se geni koji su blizu jedan drugog uvek nalaziti na jednom segmentu. Takvi geni vrše dvojnu transformaciju (istovremeno menjaju dva mutirana svojstva). Dvojna transformacija može da se izvede i sa dva fragmenta od kojih svaki nosi po jedan gen, ali transformacija se dešava vrlo retko (npr., 1 : 100 000 ćelija) pa je malo verovatno da će dva fragmenta izvršiti transformaciju u jednoj ćeliji.



Slika 7.10 – U kompetentnu bakterijsku ćeliju ulazi dvolančani fragment DNK bakterije donora Jedna nit se razgrađuje a dobijena energija se koristi za rekombinaciju druge niti sa glavnim hromosomom bakterije

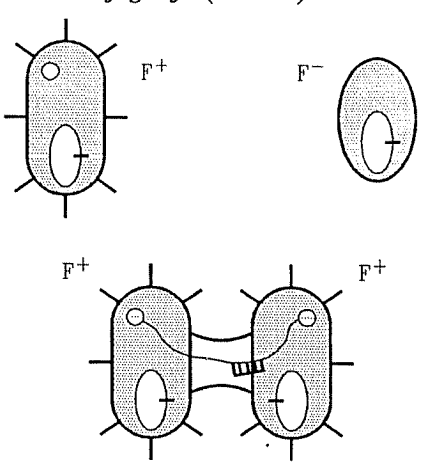
Ako se konstatuje da se dva gena uvek javljaju zajedno i da vrše dvojnu transformaciju, onda to znači da njihova udaljenost nije veća od 10^6 daltona (jer je tolika dužina fragmenta transformacije). Ako se, međutim, dva gena nikada ne nađu zajedno u dvojnoj transformaciji, to znači da su udaljeni najmanje za jednu dužinu segmenta koji vrši transformaciju.

Ako se utvrdi da se dve transformacije odigravaju relativno često (npr., A- i B-transformacija se vrši 10 puta na milion ćelija) pa se zatim pripremi ekstrakt 100 puta manje koncentracije, samo će geni na istom segmentu (blisko vezani geni) izvršiti dvojnu transformaciju.

Konjugacija

Pokušaji da se izvrši transformacija E. coli nisu uspeli jer bakterije ne moraju da budu kompetentne da prime stranu DNK (nemaju receptore za DNK, imaju restrikcione enzime koji unište stranu DNK i sl).

U eksperimentima sa E. coli otkriven je drugi tip rekombinacije u bakterija, proces ***konjugacije*** (sl. 7.11).



Slika 7.11 – Shematski prikaz prelaska faktora F iz F^+ u F^- ćeliju. F-faktor se replikuje po sigma tipu (σ), jedna nit DNK u toku prolaza kroz citoplazmatični most vezuje nukleotide i postaje dvolančana. Istovremeno se na drugoj niti vezuju nukleotidi (obrazuje se dvolančani prsten).

Lederberg i Tatum su 1946. god. razradili tehniku rekombinacije u E. coli pomoću konjugacije. Odabrali su bakterije koje su imale po tri mutacije. Geni $abcd^+$ e^+ f^+ i a^+ b^+ c^+ def pa su ih zasadili na minimalnu podlogu (podlogu u kojoj normalne, divlje bakterije mogu da rastu i da se razmnožavaju).

Pošto su i jedne i druge bile mutanti za tri gena (za tri biohemijska procesa), očekivalo se da ni jedna bakterija neće moći da se održi na minimalnoj podlozi. Međutim, neke su bakterije uginule, ali neke su preživele i stvarale kolonije.

Na osnovu ovog i sličnih eksperimenata ustanovljeno je da bakterije koje su preživele predstavljaju ***rekombinantne oblike*** a da su nastale rekombinacijom genetičkog materijala roditelja. U tim ćelijama rekombinacijom su se našli svi nemutirani geni, odnosno divlji geni. One mogu da sintetišu sve materije koje su im potrebne. Osnovni zaključci su bili da se rekombinacija ostvaruje u direktnom kontaktu dve ćelije u konjugaciji; da prenos genetičkog materijala ima uvek određen pravac (Hays, 1953), tj. da je jedna ćelija donor (davalac), a druga recipijent (primalac). Donor se naziva muškom ćelijom a recipijent ženskom ćelijom. Ako se kao donori uzmu ćelije koje su otporne na streptomicin a recipijenti su ćelije osetljive na ovaj antibiotik, onda će osetljive ćelije postati otporne posle konjugacije. Ako je recipijent otporan, a donor osetljiv na streptomicin, bakterije neće rasti na podlozi sa streptomicinom. Znači da su posle konjugacije recipijentne bakterije postale osetljive na streptomicin.

Nedavno je otkriveno da osim glavnog hromosoma bakterije imaju i ekstrahromosomski materijal u vidu plazmida, faktora polnosti ili F-faktora. Ovaj plazmid predstavlja jednu jedinicu replikacije (replikon) i stabilno se prenosi iz jedne generacije u drugu.

Kao i glavni hromosom, bakterija i F-faktor ima gene (oko 100). Geni F^- faktora kontrolišu stvaranje izraštaja (pila), protoplazmatičnog mosta kojim se spajaju bakterije u konjugaciji, gene za prenos genetičkog materijala iz donora u recipijent i dr.

Mapiranje gena na F-faktoru vršeno je tako što je bakterija inficirana sa dva F-faktora koji se razlikuju u mutaciji. Na primer, jedan plazmid je imao mutaciju u A-genu velikog operona za prenos genetičkog materijala (tra A^-) a drugi u tra B-genu (tra B^-). Bakterije sa ovakvim mutacijama ne mogu da vrše prenos genetičkog materijala.

Mada su ćelije sa dva F-faktora nepostojane, oba F-faktora su bila dovoljno dugo prisutna u ćeliji da bi se između njih izvršila rekombinacija. One rekombinante u kojih su se našla oba normalna gena tra A^+ i tra B^+ mogle su da prenose genetički materijal.

Ovim i sličnim ogledima je otkriveno da tra operon ima 16 genskih lokusa, da se sa njih prepisuje jedna policistronska iRNK i da je ceo operon pod kontrolom jednog gena operatora (tra operator).

Danas se za mapiranje gena koriste druge tehnike, kao, npr., restrikcioni enzimi kojima se F-faktor seče na male fragmente a onda se ti fragmenti analiziraju (npr., EcoRI seče F-faktor na 19 segmenata).

Ako se izmešaju bakterije F^+ i F^-, posle izvesnog vremena one se približe, između njih se stvara protoplazmatični most i jedna nit F-faktora postepeno, preko mosta, prelazi u bakteriju F^-. U toku prelaza za ovu jednolančanu nit vezuju se nukleotidi (vrši se replikacija DNK) tako da dvolančana DNK F-faktora ulazi u ćeliju F^-. Istovremeno se prstenasti molekul druge niti, koji je ostao u donoru, replikuje.* Tako ćelija donor ostaje F^+ a F^- recipijent postaje F^+. Glavni hromosom ne učestvuje u ovom procesu; rekombinacije su retke (1 : 1,000.000).

Među ćelijama F^+ bilo je onih koje su pokazivale veliku sposobnost rekombinacije. Ove ćelije se nazivaju Hfr ćelije (100% rekombinacija po jednom donoru). Ustanovljeno je da je u njih F-faktor ugrađen u glavni hromosom (episom). Pri konjugaciji počinje replikacija glavnog hromosoma donora, i to u samom F-faktoru. Jedna nit glavnog hromosoma počinje da prelazi u recipijenta. Prvi prelazi deo F-faktora a za njim slede geni glavnog hromosoma. Konjugacija obično ne traje dovoljno dugo da bi ceo hromosom prešao iz jedne bakterije u drugu, znači pređe samo jedan deo a F^- bakterija ostaje F^-. U retkim slučajevima kad konjugacija traje dovoljno dugo (u E. coli oko 90 minuta) ceo hromosom može da pređe iz jedne ćelije u drugu a ćelija F^- postaje Hfr (high frequency recombination) (sl. 7.12).

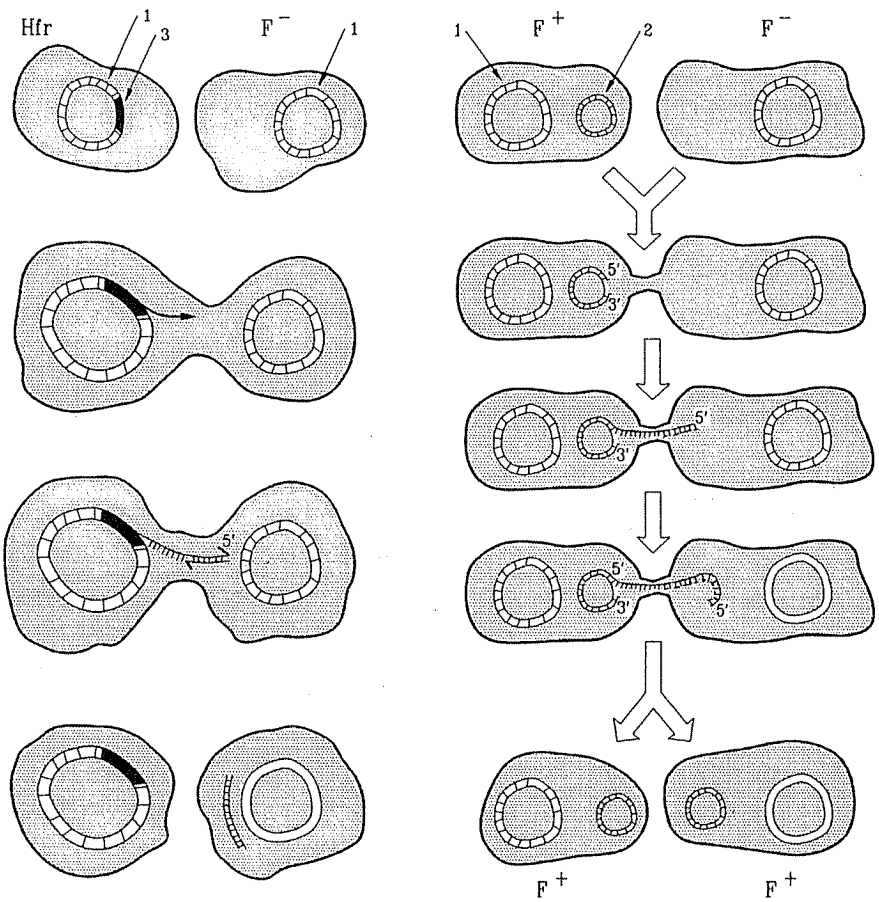
Kada je definitivno ustanovljeno da jedna nit DNK prelazi u bakteriju F-, da je taj prelaz vremenski vrlo određen, da se vrši u jednom smeru, pristupilo se ispitivanju gena na tom hromosomu.

Da bi se ustanovilo koji se geni u kom vremenskom intervalu i kojim redosledom prenose, konjuganti su blagim trešenjem razdvajani u određenim vremenskim intervalima.

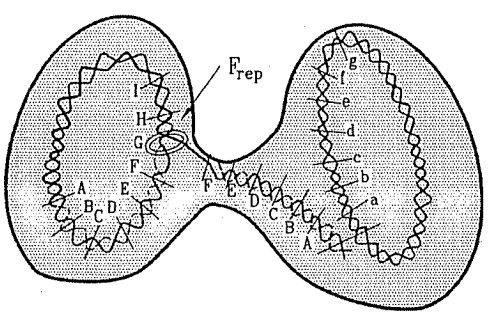
Na osnovu ovih eksperimenata ustanovljeno je da F-faktor može da se ugradi na nekoliko različitih mesta na hromosomu bakterije. Ta mesta su obično karakteristična za određenu liniju ćelija. Zavisno od mesta ugrađivanja različiti geni se prenose češće ili ređe..

Redosled prenošenja gena pokazao je da je hromosom cirkularan. Između glavnog hromosoma i F-faktora postoji izvesna homologija u redosledu nukleotida (insertovane sekvence Is). Ako je pri

* Ovaj tip replikacije se naziva sigma tip (σ), ili, „kotrljajući krug".



Slika 7.12a – Uporedni prikaz prelaska ugrađenog F faktora iz Hfr ćelije u F⁻ ćeliju i slobodnog F-faktora iz F⁺ u F⁻ ćeliju.
1. glavni hromosom, 2. slobodni F faktor, 3. ugrađeni F faktor



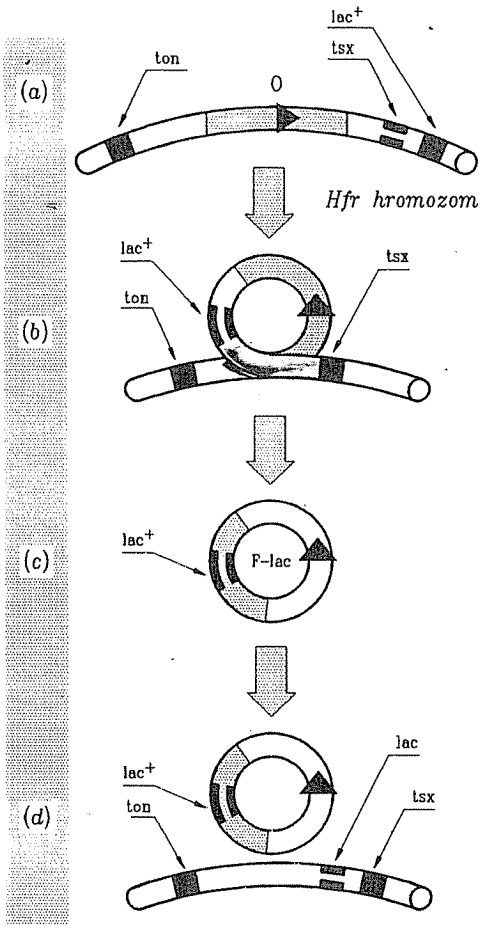
Slika 7.12b – Geni glavnog hromosoma prelaze u F⁻ ćeliju i postavljaju se naspram homologih segmenata hromosoma F⁻bakterija. Između homologih segmenata će se izvršiti rekombinacija.

jednom prenosu redosled gena A B C D, pri drugom C D A B, pri trećem B C D A ili D C B A, onda to znači da je hromosom prstenast a da se prenos vrši u oba pravca.

Gen koji se najčešće rekombinuje je najbliži O-segmentu, delu DNK koji prvi prelazi u recipijenta. Zavisno od mesta gde je ugrađen F-faktor, taj gen može da bude thr gen (gen za sintezu treonina) ili thi gen (gen za sintezu thiamina) itd.

Ako se pri prekidima konjugacije dva gena nikada ne razdvoje, znači da su locirani vrlo blizu, jedan do drugog (npr. gen za treonin i leucin).

F-faktor može povratnim crossing overom da se izdvoji iz glavnog hromosoma. Pri pravilnom izdvajanju Hfr-ćelija postaje ćelija F^+. Pri nepravilnom izdvajanju F-faktor ponese i gene glavnog hromosoma. Tada se naziva F' (F prim) (sl. 7.13). Pri sledećoj konjugaciji F'-faktor nosi gene glavnog hromosoma i za te gene će ćelija recipijent biti diploidna (imaće duplu dozu tih gena). Takvo delimično diploidno stanje (merozigot) nestabilno je i doći će do crossing overa između gena F'-faktora i glavnog hromosoma odnosno do rekombinacije.



Slika 7.13 – Pri nepravilnom izdvajanju F-faktora ovaj će poneti i gene glavnog hromosoma. Tada se naziva F' faktorom.

Na osnovu prisustva i ponašanja F-faktora, prema tome, mogu se razlikovati četiri linije E. coli:

- ćelije koje imaju slobodan F-faktor u citoplazmi, F^+ ili muške ćelije,
- ćelije koje nemaju F-faktor, F^- ili ženske ćelije,
- ćelije sa F-faktorom ugrađenim u glavni hromosom, Hfr-ćelije,
- ćelije u kojih F-faktor nosi i gene glavnog hromoosma F'-ćelije.

Prisutni F-faktor ima specifičnu fenotipsku ekspresiju i, osim navedenih karakteristika (pile, most za konjugaciju, prenos genetičkog materijala i dr), F-faktor uslovaljava i podložnost "muških" linija za muški pol specifičnim bakteriofagima: RNK, F2, MS2 i Q2, ili končastim DNK-fagima kao što su fd, fl i M13.

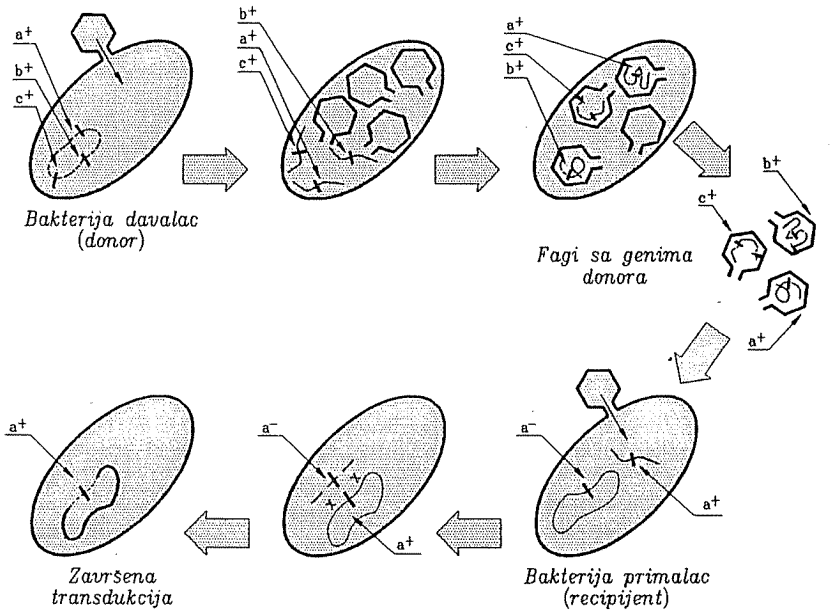
Osim F-faktora (seksdukcija), gene glavnog hromosoma mogu da prenesu i drugi vektori, najčešće bakteriofagi i da uslove proces rekombinaciju u ćeliji recipijentu.

Ovaj tip rekombinacije naziva se ***transdukcija.***

Transdukcija se obavlja na tri načina:

- opšta transdukcija (fag je u parazitskom odnosu),
- specijalizovana transdukcija (fag je u simbiotskom odnosu) i
- seksdukcija (F' faktor).

U opštoj ili ***generalizovanoj transdukciji*** bilo koji deo DNK domaćina greškom ulazi u omotač faga i pri novoj infekciji fag unosi tu DNK u novog domaćina. DNK koju je uneo virus rekombinuje se sa hromosomom domaćina. Ovaj tip rekombinacija karakterističan je za fage koji mirno borave u citoplazmi domaćina i ne ugrađuju se u hromosom domaćina (fag P1 u E. coli) ili odmah ulaze u litički ciklus i ubijaju bakterije (T4 fag, MS fag), (sl. 7.14). Pri pakovanju fragmenata DNK ćelije u omotač faga vrlo je važno da



Slika 7.14 – Generalizovana transdukcija. U kapsid faga greškom je „upakovan" fragment glavnog hromosoma. Pri sledećoj infekciji u novu ćeliju domaćina ulazi fragment bakterijske DNK. On se postavlja prema homologom segmentu glavnog hromosoma i rekombinuje se

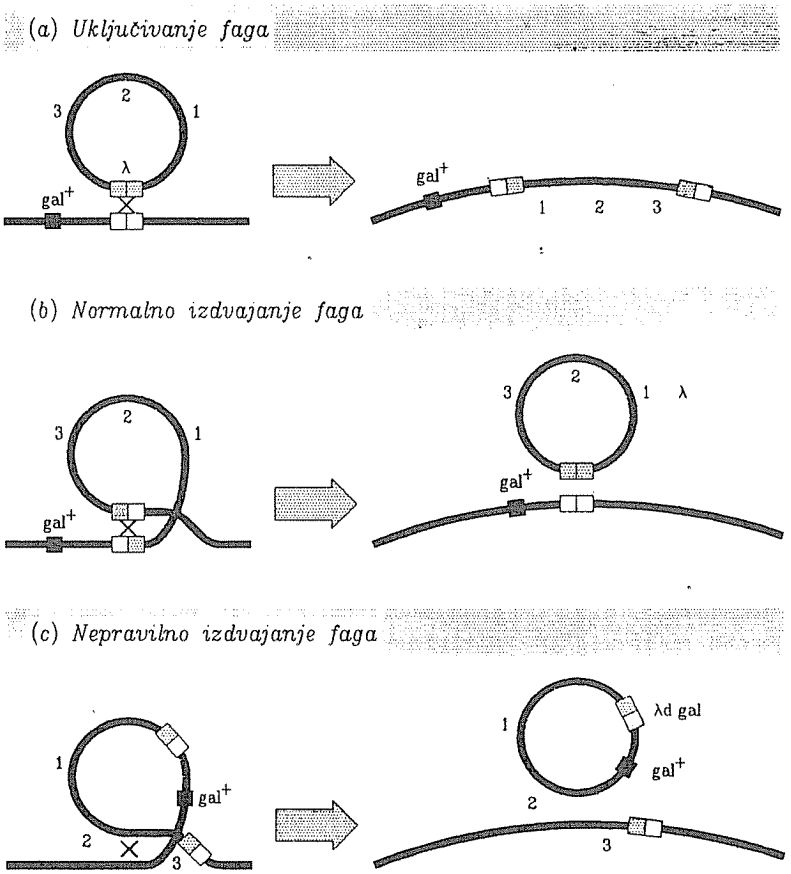
DNK ima određenu dužinu. Prema tome, ako se u trenutku pakovanja u citoplazmi nađu fragmenti DNK koji odgovaraju dužini DNK faga (6 x 10^7 ili 1 x 10^8 daltona, deset puta veći od DNK u transformaciji), oni mogu da uđu u omotač faga. Ako se pojavi molekul veće dužine, onda specifičan enzim endonukleaza skraćuje i seče DNK. Izgleda da taj isti enzim prepoznaje parove baza na DNK glavnog hromosoma. Na tim mestima seče hromosom a zatim fragmenti uđu u omotač virusa. Primećeno je da se pri transdukciji koju vrši fag P22 neki segmenti DNK glavnog hromosoma Salmonelle prenose češće nego drugi verovatno zato što se u tim segmentima nalaze parovi nukleotida koje prepoznaje endonukleaza. Ovaj enzim (endonukleaza) je pod kontrolom gena faga P22 .

Geni koji se zajedno prenose nalaze se na istom fragmentu DNK a kako je ovaj fragment veći u transdukciji nego u transformaciji, i udaljeniji geni mogu da se mapiraju. Ako se dva markera nikada ne prenesu istovremeno, znači da su udaljeni najmanje za jednu dužinu fragmenta DNK (6 x 10^7 daltona za P1).

SPECIJALIZOVANA TRANSDUKCIJA

U specijalizovanoj transdukciji učestvuje umereni fag (episom). Umereni fagi imaju obično određeno mesto na hromosomu, koje prepoznaju i u koje se uključuju. Lambda fag se ugrađuje u hromosomu E. coli između gena Gal, T i E i kompleksa gena za sintezu biotina bio A, B, F, C, D (sektor 17 minuta E. coli). Ako se ovaj fag aktivira i odvoji od glavnog hromosoma, on može, zbog nepravilnog izdvajanja, da ponese i gene glavnog hromosoma. Takav fag se naziva ***specijalizovana čestica transdukcije.*** Ova transdukcija je specijalizovana jer fag može da ponese samo susedni, znači određeni gen (sl. 7.15).

Rečeno je da fag ima naslednu osnovu određene dužine i samo toliki molekul



Slika 7.15 – Specijalizovana transdukcija. Pri nepravilnom izdvajanju faga iz hromozoma ćelije domaćina, fag može da ponese samo susedne gene između kojih je bio ugrađen. Za lambda fag to su geni Gal ili biot.operona E.coli

može da se upakuje u omotač glave. Ako fag nosi susedne gene, on je duži i endonukleaza mora da ga iseče. Obično se iseca deo genoma faga pa je fag defektan za određene gene. Ako je u kapsid ušao DNK-lanac sa genima gal, onda će se iseći virusni geni uz biotin-kompleks i obrnuto. Gen gal se transdukcijom prenosi jedanput na milion ćelija, ali ako se lizogena bakterija ozrači UV zracima, transdukcija se povećava za oko 300 puta.

Kada fag koji nosi gen gal inficira novu bakteriju, bakterija postaje diploidna za gal gene. Pri rekombinaciji, npr., u DNK mutirane bakterije gal^- ugradiće se gen gal^+.

Fragment DNK sa genom gal^+ može izvesno vreme da ostane neugrađen u citoplazmi bakterije. Takve bakterije su gal^+ jer je taj gen dominantan u odnosu na gen gal^- domaćina. Ako se fragment izgubi, bakterije ostaju gal^-.

Rekombinacije virusa uočene su pri dvojnim infekcijama bakterijskih ćelija. Ukoliko se dva virusa razlikuju po sastavu kapsida i dužini repa, njihovo potomstvo, osim oblika identičnih "roditeljima", ima i viruse sa rekombinovanim svojstvima: kapsid kao u jednog roditelja i dužinu repa kao u drugog roditelja.

8

Reparacija, mehanizmi popravke DNK, repair – mehanizmi

Pod delovanjem različitih spoljašnjih činilaca, ili spontano u relativno stabilnoj naslednoj osnovi nastaju greške. Oštećenja i promene u naslednoj osnovi mogu da nastanu pre replikacije DNK-molekula, ili u toku same replikacije. Ove promene mogu da ostanu prisutne u molekulima DNK (mutacije) ili da izazovu smrt ćelije.

Tokom evolucije u ćelijama su se diferencirali specifični sistemi opravke, sposobni da prepoznaju i isprave nastale greške. Sigurno je da su ćelije sa ovakvim sistemima, koji su obezbeđivali stabilnost nasledne osnove, imale evolutivnu prednost.

Dosadašnja ispitivanja su pokazala da u živom svetu postoje raznovrsni sistemi opravke koji koriguju greške in situ, koji koriguju samo specifične lezije ili lezije vrlo različitog porekla i tipa.

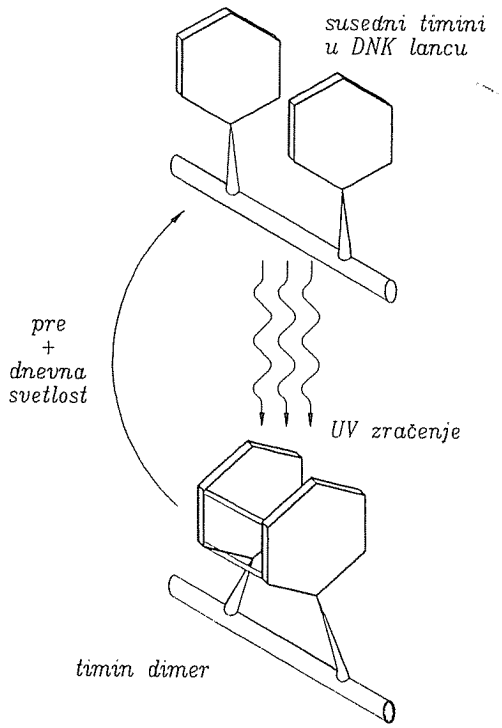
Sistemi opravke DNK i mehanizmi njihovog delovanja najčešće su proučavani na bakterijama i nižim eukariotima a prikupljeni podaci su znatno doprineli poznavanju mehanizma popravke u ćelijama čoveka.

Sistemi popravke ispravljaju greške u DNK-molekulima u periodu pre replikacije hromosoma (prereplikativni repair) ili u periodu posle DNK-replikacije (postreplikativni repair). Oni deluju vrlo precizno i najčešće se greške u genomu korektno isprave. Katkad opravka nije precizna pa pojedini segmenti DNK imaju pogrešno sparene nukleotide (mismached bases).

Opravke in situ

U eksperimentalnim radovima za ispitivanje sistema opravke najčešće se koristi UV zračenje. UV zraci talasne dužine 280 nm u ćeliji deluju na one molekule koji mogu da ih apsorbuju a to su prvenstveno purini i pirimidini (organski molekuli sa prstenom). Oštećenja izazvana UV zracima su hemijski stabilna. Tako se, npr., u DNK-lancu, gde se nalaze dva timina, obrazuje timin-dimer (sl. 8.1). Pri replikaciji DNK nasuprot timin-dimera ne mogu da se vežu komplementarni nukleotidi pa u novosintetisanom lancu ostaju prazni prostori ili gepovi (gap).

Ako bakterije u čijoj se DNK nalaze timin-dimeri kratko vreme izložimo dnevnoj svetlosti (plavi deo spektra je najefikasniji), dimeri se monomerizuju. Različiti eksperimentalni metodi su pokazali da se u bakterija kao produkt phr^+ (fotorezistentnog) gena sintetiše enzim koji prepoznaje dimere i vezuje se za njih. Ovaj enzim je neaktivan u tami. Dnevna svetlost ga aktivira i enzim mo-



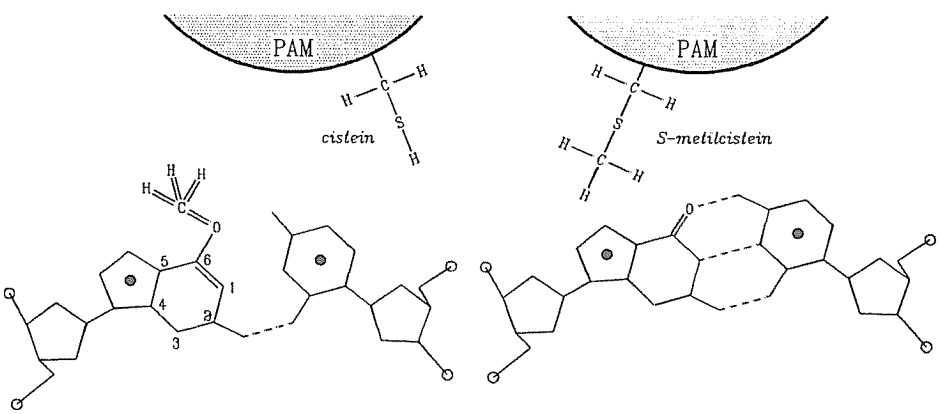
Slika 8.1. – Nastajanje timin dimera i njihova monomerizacija in situ pomoću fotosenzitivnog enzima (PRE).

nomerizuje dimere in situ. Izolovane su i bakterije koje ne mogu ovim sistemom opravke da monomerizuju dimere pa je utvrđeno da one imaju mutiran gen phr (phr⁻).

Direktno ispravljenje grešaka u DNK vrše i drugi enzimi, kao, npr., alkil-transferaze. Različiti hemijski mutageni mogu da alkiliraju DNK-nukleotide. Tako, npr., nitrozoguanin (NG), poznati alkilirajući agens, metilira guanin u DNK, vezujući CH_3-grupu za atom kiseonika u položaju 6. Metilirani guanin ne može da se veže za citozin, pa se kidaju vodonične veze u tom delu molekula. Specifična alkil-transferaza, enzim koji u svom sastavu ima aminokiselinu cistein, demetilira guanin. Metil-grupa sa guanina prelazi na cistein (sl. 8.2). Demetilirani guanin se ponovo vezuje sa citozinom.

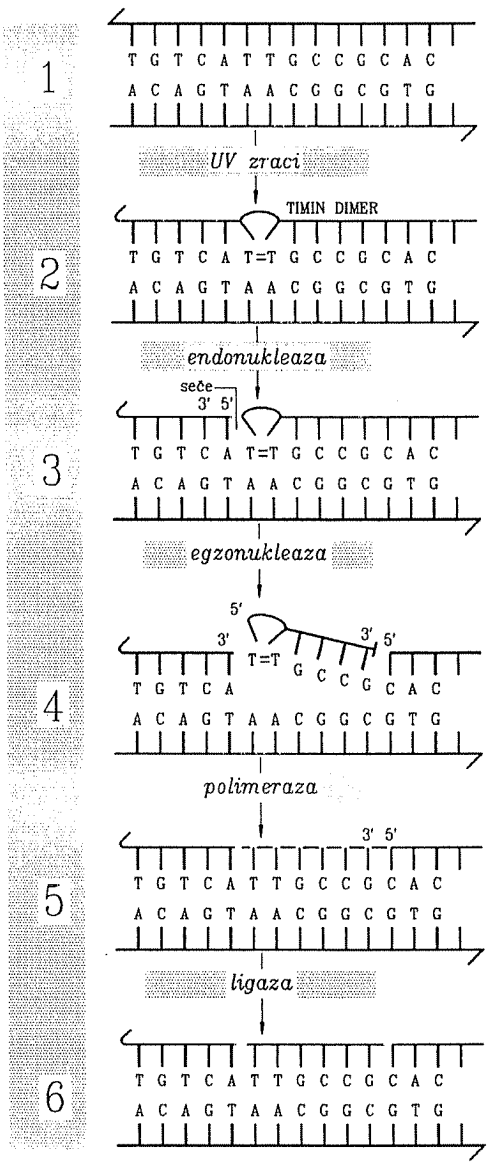
Sistem enzimskog isecanja je vrlo značajan sistem opravke koji prepoznaje i opravlja vrlo različite greške u DNK: dimere, pogrešno spojene nukleotide, oštećenja izazvana jonizujućim zračenjem i dr. Ovaj sistem popravlja greške u bilo kom delu genoma, a čine ga produkti različitih gena (enzimi): uvr A, uvr B, uvr C, pol A, lig.

Ako se npr. u jednom lancu DNK obrazuje dimer, u tom delu DNK trpi distorziju. Jedna endonukleaza produkt gena uvr, seče jednolančanu DNK u blizini dimera (sl. 8.3). Produkt pol A-gena uklanja isečene nukleotide, odnosno ima egzonukleaznu aktivnost. Nastalu praz-



Slika 8.2. – Enzim alkil transferaza u svom molekulu sadrži aminokiselinu cistein koja vezuje metil grupu sa kiseonika u položaju 6 u molekulu guanina i tako izvrši demetilaciju.

ninu popunjava polimeraza I, koja je produkt istog gena (pol A), a deluje kao



Slika 8.3 – Mehanizam opravke isecanjem prepoznaje različite greške u genomu. Tako npr. u blizini timin-dimera specifična endonukleaza seče vezu između fosfata i šećera. Egzonukleaze uklanjaju nekoliko nukleotida. DNK-polimeraza u 5' – 3' pravcu komplementarno vezuje nukleotide za neoštećeni lanac. Ligaza povezuje novosintetisani deo DNK sa presečenim delovima starog lanca.

polimeraza u 5'–3' pravcu. Ova polimeraza vezuje nukleotide komplementarne neoštećenom lancu. Najzad, ligaza povezuje novosintetisan lanac sa presečenim lancem DNK.

Mutacija bilo kog gena čiji produkt učestvuje u opravci isecanjem onemogućava reparaciju. Bakterije u kojih se izvrši reparacija, ne samo da preživljavaju, već imaju i malo mutacija, što znači da se opravka korektno vrši.

Autosomno recesivna bolest čoveka, xeroderma pigmentosum, nastaje usled defekta u sistemu opravke. U tih bolesnika koža je preosetljiva na sunčevo svetlo. Ispitivanja ćelija in vitro su pokazala da su ćelije bolesnika oko četiri puta osetljivije na UV zrake nego ćelije zdravih osoba. Vremenom se u ćelijama bolesnika nakupljaju oštećenja na hromosomima tako da ćelije maligno alteriraju i na koži se javljaju multipli karcinomi, od kojih bolesnici umiru. Postoje podaci da bolesnici sa xerodermom pigmentosum mogu da imaju mutacije različitih enzima opravke (genokopije).

I u drugim patološkim stanjima (Bloomov sindrom, ataxia telangiectasia, Fanconijeva anemija) u kojima su sistemi opravke defektni, *češće* se javljaju maligne bolesti nego u opštoj populaciji.

Postoje i specifični sistemi isecanja koji popravljaju specifične greške u DNK. Tako npr. u pojedinim delovima genoma mogu da se izgube purinske i pirimidinske baze. Ta mesta se nazivaju AP-mesta. ***AP-endonukleaze*** ih prepoznaju i seku kovalentne veze u AP-mestu. Dalju opravku vrše enzimi sistema opravke isecanjem.

Specifične ***glikozilaze*** prepoznaju hemijski izmenjene nukleotide. Ako dođe do dezaminacije citozina, on prelazi u uracil, koji nije uobičajena baza za DNK-molekul. Hemijski izmenjene baze dovode do tranzicije, ili neke druge promene u DNK. Glikozilaza seče N-gli-

kozilnu vezu (vezu između baze i šećera), pa umesto izmenjene baze u tom delu molekula ostaje AP-mesto. AP-endonukleaza i drugi enzimi isecanja oprave grešku. Svakodnevno se otkrivaju nove glikozilaze koje prepoznaju na različite načine izmenjene baze. Ovi enzimi imaju vitalan značaj za ćeliju.

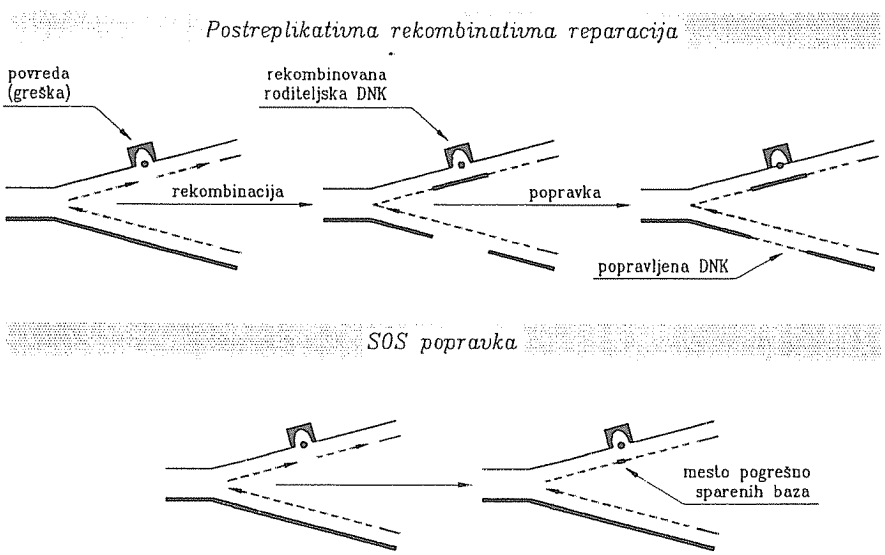
Postreplikativna reparacija pogrešno spojenih baza

U toku replikacije DNK može da dođe do pogrešnog sparivanja baza. Po završenoj replikaciji vrlo precizan sistem popravke prepoznaje pogrešno vezane baze i popravlja greške. Novonastali molekul DNK se sastoji od jedne stare (materinske) niti i jedne novosintetisane sa greškom, pa je vrlo važno da se opravka izvrši u novosintetisanoj, a ne u materinskoj niti. Sistem opravke mora da "zna" koji je lanac ishodan, korektan, a koji nosi grešku. U ćelijama je otkriven enzim ***adenin-metilaza*** koji vezuje CH_3 (metil)-grupu za N atom adenina u položaju 6 materinske niti. Novonastali dvojni DNK-lanac ima, prema tome, jednu metiliranu nit (materinsku) i jednu nemetiliranu, novosintetisanu nit. Greške se popravljaju u nemetiliranoj niti.

Postreplikativna rekombinativna reparacija

Ako se dimeri ne uklone iz molekula DNK pre replikacije, pri udvajanju molekula će nasuprot dimera biti gepovi (sl. 8.4). Ti gepovi će se, procesom rekombinacije, popuniti nukleotidima sa sestrinske hromatide. Sada na ovom molekulu ostaje prazan prostor. Nasuprot praznom prostoru je neoštećena nit DNK, koja će poslužiti kao matrica DNK-polimerazi koja popunjava gep. DNK-ligaza povezuje ove nukleotide sa susednim nukleotidima. Rekombinativne procese omogućava produkt rec A gena.

Svi opisani sistemi opravke popravljaju greške precizno i doprinose stabilnost genoma. Ako su greške u naslednoj osnovi tako velike da sprečavaju replikaciju hromosoma i ugrožavaju život ćelije, aktivira se ***sistem SOS***. Za razliku od drugih sistema opravke, sistem SOS toleriše greške.



Slika 8.4. – Uporedni prikaz postreplikativne, rekombinativne popravke i sistema SOS

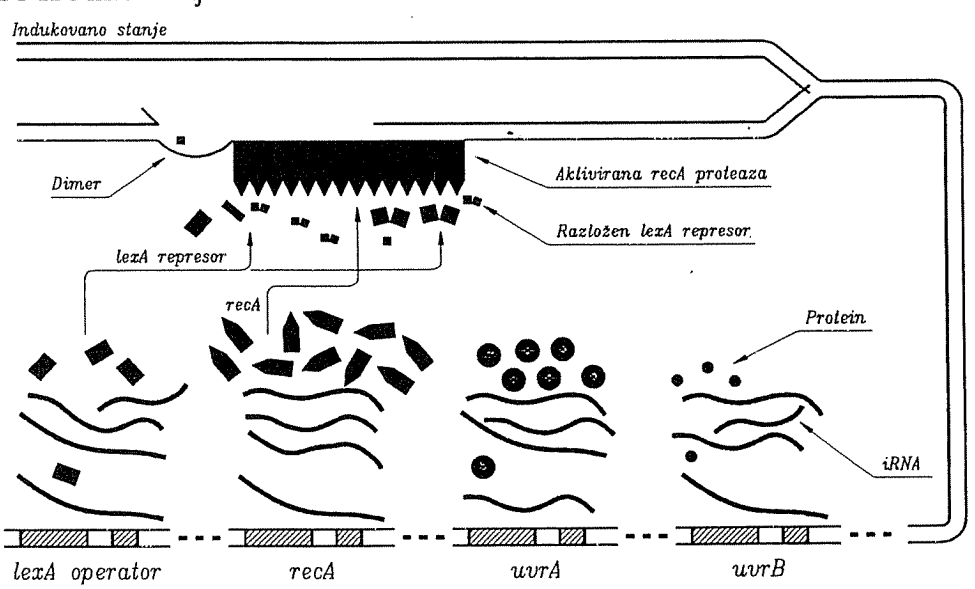
Ovaj sistem obuhvata više komponenti. Lex A gen proizvodi opšti represor koji supresivno deluje na operatore gena recA uvrA, uvrB, umuC, čiji produkti opravljaju greške u DNK-molekulu. LexA represor kontroliše i svoju aktivnost (autoregulacija). Ako se na DNK-molekulu javi veće oštećenje, ono stimuliše aktivnost recA gena. Produkt gena recA je jedna proteaza koja razlaže represor. U nedostatku represora lexA aktiviraju se geni uvrA, uvrB, umuC i počinje reparacija (sl. 8.5).

Sistem SOS nije specifičan samo za oštećenja DNK pri kojima se stvaraju dimeri, već ispravlja i druge greške. Zapaženo je da UV zraci, kao i različiti drugi mutageni, stimuliraju sistem SOS.

Zapaženo je da recA-proteaza deluje i na represore profaga ugrađenog u glavni hromosom bakterija. UV zraci oštećuju DNK, ova oštećenja aktiviraju gen recA, sintetiše se recA-proteaza koja deluje na represor, fag se oslobađa (izdvaja) iz DNK i lizira ćeliju.

Tabela 8.1

SISTEM OPRAVKE DNK		
Direktno uklanjanje grešaka	Alkil -transferaza	Alkil-guanin
	Fotoreaktivni enzim	UV fotodimeri
opšte isecanje	uvr A, B, C, pol A	distorzije DNK
specifično isecanje	AP-endonukleaze DNK-glikozilaze	AP-mesta, izmenjene baze
postreplikativna opravka	popravka pogrešno sparenih baza (mismached bases)	pogrešno sparene baze
	postreplikativna rekombinovana opravka	gepovi
	sistem SOS	lezije koje sprečavaju replikaciju DNK



Slika 8.5. – Usled greške u jednom lancu DNK sprečena je replikacija. Oštećenje aktivira rec A gen čiji produkt, rec A proteaza razlaže opšti represor lex. A. Aktivni su (oslobođeni supresivnog delovanja lex A represora) geni koji obezbeđuju popravku

9

Nasleđivanje u čoveka

Sva svojstva čoveka, karakteristike njegovog tela i uma, njegovo fizičko i mentalno zdravlje, uslovljeni su međusobnim delovanjem naslednih faktora i spoljašnje sredine u kojoj se razvija i živi.

Jedna individua ne nasleđuje plavu boju očiju, mrku boju kose ili bilo koje svojstvo, već nasleđuje gene, kao i sve druge komponente reproduktivnih jedinica. Svojstva svakog organizma se razvijaju pod kontrolom nasledne osnove u granicama određene intracelularne, ekstracelularne i spoljašnje sredine. Nasleđivanje jednog gena nije, znači, automatski ekvivalentno razviću određenog svojstva. Intracelularna sredina gena u prvom redu obuhvata druge gene i njihovu kompleksnu funkcionalnu interakciju, kao i citoplazmu, koja takođe u znatnoj meri utiče na razviće svojstva. Na primer, sve ćelije čoveka poseduju gene za boju očiju, ali samo ćelije dužice produkuju boju, što ukazuje da je citoplazma različitih ćelija diferencijalno osetljiva na sadržaj gena.

Nasledna osnova i uslovi sredine se neprekidno menjaju. Vrlo je verovatno, skoro sigurno, da ne postoje dva bića koja imaju istovetnu naslednu osnovu (izuzetak su jednojajni blizanci). Isto tako, dva bića nikada nisu izložena apsolutno istim spoljašnjim faktorima, a ni dve različite osobe ne reaguju jednako na slične uslove sredine.

Način nasleđivanja varira zavisno od načina reprodukcije. U uniparentalnih organizama, koji nastaju vegetativnom reprodukcijom, genotip roditelja neizmenjen prelazi u potomstvo, te su zato roditelji i njihovi potomci genetički istovetni; jedini izvor genetičkih varijacija u ovih organizama su povremene mutacije. Nasuprot tome, u biparentalnih organizama, sa seksualnim procesom kao integralnim delom reprodukcije, postoje dva izvora genetičkih informacija, u kojih rekombinacioni mehanizmi u gametogenezi i spajanje dva različita seta gena obezbeđuju varijabilitet potomaka.

Svojstva čoveka mogu biti "normalna" (uobičajena) i "nenormalna" (neuobičajena). Posmatrajući ljude, može se zaključiti da i "normalna" i "nenormalna" svojstva variraju i da su varijacije normalnih svojstava veće nego varijacije nenormalnih.

Vekovima je bilo poznato da se određena svojstva nasleđuju, da se prenose sa roditelja na decu, ali nije bilo poznato kako se prenose, na koji način ih roditelji predaju deci.

Osnovne principe nasleđivanja postavio je Gregor Mendel (1865), koji se prvi koristio pravim naučnim genetičkim eks-

perimentom u proučavanju mehanizama prenošenja naslednih faktora sa roditelja na potomke. Njegova otkrića su postavila temelje savremenoj genetici.

Mendel je brižljivo odabirao materijal i proučavao samo ona svojstva koja se jasno alternativno izražavaju, tj. javljaju se u jednom od dva postojeća fenotipa.

Mendel je prvi pretpostavio postojanje gena, na osnovu njihovih krajnjih efekata – dobijenih fenotipova, jer je ukazao da razviće svakog od analiziranih svojstava kontrolišu određeni nasledni faktori, sadržani u polnim ćelijama, čiju prirodu sâm nije poznavao. Nasledni faktori se javljaju u parovima i oni određuju nasleđivanje svojstava. Prilikom formiranja gameta nasledni faktori se odvajaju, tako da svaki gamet dobija po jedan faktor. Nasledni faktori se ne mešaju kada se kombinuju kod hibrida, već ostaju nezavisni i mogu se neizmenjeni pojaviti u sledećim generacijama. Ovo je formulisano kao *I Mendelovo pravilo rastavljanja gena,* odnosno svojstava.

Kada se dva nasledna faktora sa različitom fenotipskom ekspresijom nađu u zigotu, ako se u fenotipu izrazi svojstvo samo jednog roditelja, to svojstvo je označeno kao ***dominantno,*** a svojstvo koje se ne izrazi u heterozigotnom stanju i može se fenotipski izraziti samo u homozigotnom stanju označeno je kao *recesivno.* Fenotip hibrida može biti i intermedijaran u odsustvu dominacije jednog gena, pa je moguće razlikovati fenotip heterozigota od fenotipa homozigota.

Ako se prati nasleđivanje dva ili više svojstava, koja kontrolišu dva ili više parova naslednih faktora koji su smešteni na različitim hromosomima, ovi se mogu slučajno i nezavisno raspoređivati i kombinovati u procesu formiranja gameta. Ovaj princip je označen kao ***II Mendelovo pravilo nezavisnog i slobodnog kombinovanja gena, odnosno svojstava.***

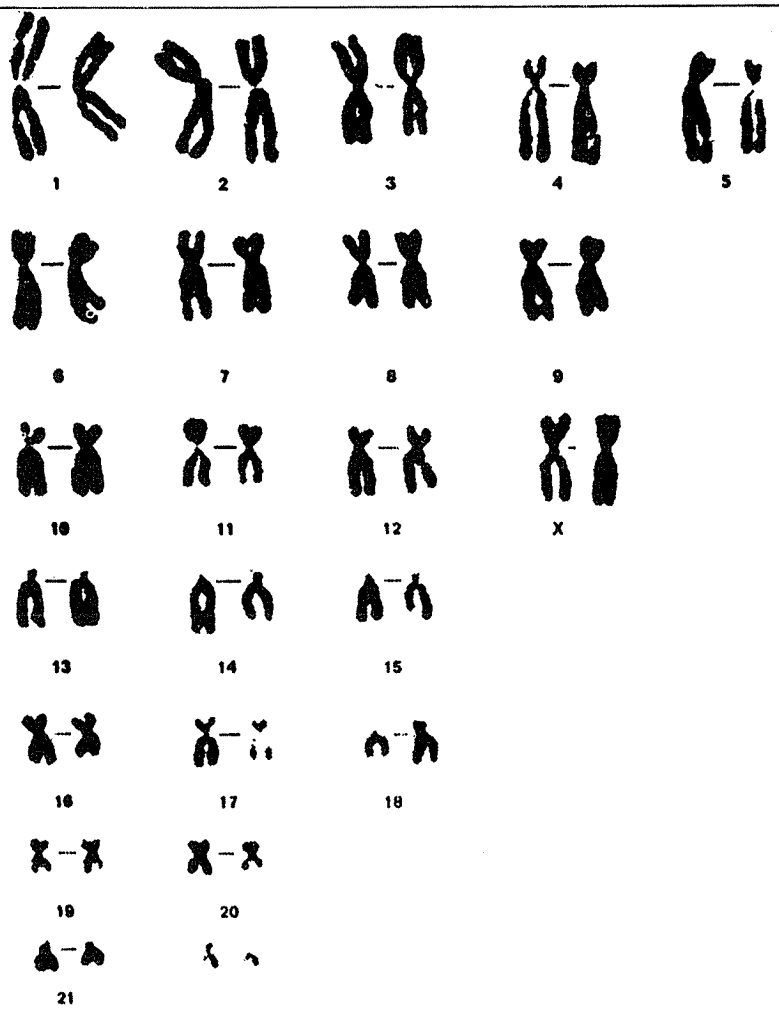
Ovo su dva najznačajnija koncepta koja je Mendel izveo iz svojih eksperimenata i oni predstavljaju fundament mendelskog nasleđivanja.

Geni su sada hemijski definisani. To su segmenti molekula DNK koji se sastoje u proseku od 500 do 1800 nukleotida i zna se da kontrolišu sintezu proteina. Geni su jedinice nasleđa i imaju linearan raspored u hromosomu. Ovaj koncept je primenljiv na sve oblike života, od virusa do čoveka. Hromosomi virusa i bakterija sadrže po jednu dozu svakog gena i zato su ovi organizmi haploidni. Hromosomi biparentalnih organizama se nalaze pojedinačno samo u reproduktivnim ćelijama (haploidno stanje), dok se u zigotu i telesnim ćelijama koje nastaju iz zigota javljaju u parovima (diploidna garnitura 2n). Ovi parovi se nazivaju ***homologim hromosomima,*** poreklom su jedan od oca, drugi od majke, i jedan drugom odgovaraju po veličini, obliku i sadržaju genetičkih informacija (sl. 9.1). Geni se takođe nalaze u parovima, a svaki par gena zauzima isti lokus na homologim hromosomima. Homologi hromosomi se odvajaju u toku redukcione deobe u mejozi i odlaze u različite ćelije.

Promene u nivou gena se nazivaju mutacije. U jednom lokusu se tako mogu javiti različiti oblici jednog gena sa različitom fenotipskom ekspresijom. Ovi međusobno različiti oblici, nastali iz jednog jedinstvenog, divljeg gena, nazivaju se *aleli* ili ***alelomorfni geni.*** Kod jedne individue u jednom paru lokusa nalaze se uvek samo dva alela, bez obzira na to koliko je varijanti jednog gena nastalo procesom mutacije.

Pošto u jednom paru lokusa kod jedne individue postoje samo dva alela, moguća su tri različita genotipa za dato svojstvo:

a) Individua koja poseduje na oba lokusa homologog para hromosoma istovet-



Slika 9.1 – Humani kariotip. Hromosomi su svrstani u parovima (ženski pol)

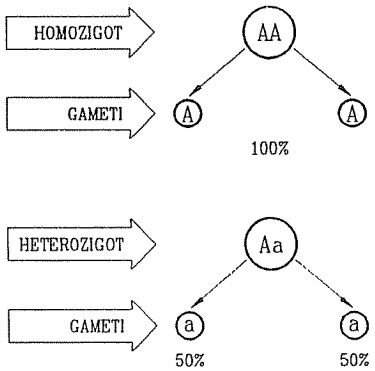
ne normalne alele predstavlja homozigot za date alele i imaće normalan fenotip.

b) Individua koja poseduje na jednom lokusu normalan, a na drugom mutantni alel je heterozigotna za alele pomenutog lokusa, a fenotip će biti izmenjen ili normalan, zavisno od ponašanja mutiranog gena.

c) Individua koja poseduje u oba lokusa po jedan mutantni alel predstavlja homozigot za mutirane alele i imaće izmenjen fenotip.

Homozigotna jedinka formira jedan tip gameta u odnosu na posmatrani par alela, heterozigotna (hibridna) jedinka obrazuje različite gamete zbog razdvajanja homologih hromosoma u mejozi, koji nose različite alele istog gena (sl. 9.2).

Primeri nasleđivanja po Mendelovim pravilima brzo su otkriveni i kod čoveka. Godine 1905. je dat prvi prikaz brahidaktilije u jednoj porodici kao primer dominantnog mendelskog nasleđivanja. Malo kasnije lekar A. Garrod je prvi



Slika 9.2 – Homozigoti daju samo jedan tip gameta a heterozigoti dva tipa.

ukazao na retka metabolička oboljenja u čoveka koja se nasleđuju po Mendelovim pravilima kao recesivna svojstva. Ovo je bio period kada je velika pažnja posvećena otkrivanju svojstava čoveka koja se nasleđuju po Mendelovim principima.

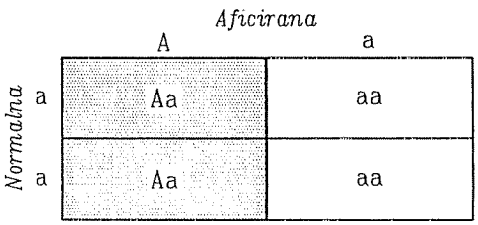
Mc Kusick je (1978) objavio spisak od 583 fenotipske karakteristike čoveka, koje su pod kontrolom jednog autosomnog dominantnog gena, dok se 635 verovatno nasleđuju kao autosomno dominantne. Autosomno recesivno se nasleđuje 466 svojstava, a 481 svojstvo je označeno kao verovatno autosomno recesivno. Pod kontrolom gena lociranih na X hromosomu nalazi se 171 svojstvo.

Autosomno dominantno nasleđivanje

Čitav niz normalnih i nenormalnih svojstava čoveka nasleđuju se prema Mendelovim pravilima kao autosomno dominantna. Analizom porodica utvrđeno je da se kao autosomno dominantna normalna svojstva nasleđuju: odvojenost ušne resice, sposobnost uvrtanja jezika, osetljivost na fenil-tiokarbamid (PTC), rupica na bradi i dr.

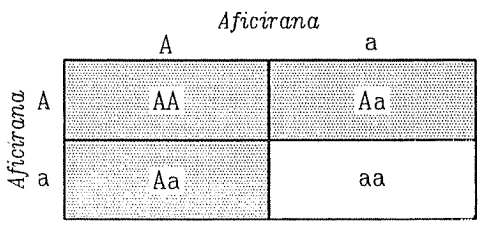
Pomenuto je da je prvo nenormalno monogensko svojstvo čoveka za koje je dokazano da se nasleđuje po Mendelovim pravilima bila brahidaktilija (skraćeni prsti).

U braku između jednog roditelja sa brahidaktilijom i drugog sa normalno razvijenim prstima postoji verovatnoća da jedna polovina potomaka nasledi ovu anomaliju, a druga polovina potomaka ima normalne prste. Ovakav odnos potomaka (1:1) karakterističan je za Mendelovo analizirajuće ukrštanje u kome je jedan roditelj dominantan heterozigot, a drugi recesivni homozigot. Zbog pravilnog razdvajanja hromosoma i gena u mejozi polovina potomaka dobija gen za brahidaktiliju a polovina normalan gen (sl. 9.3).



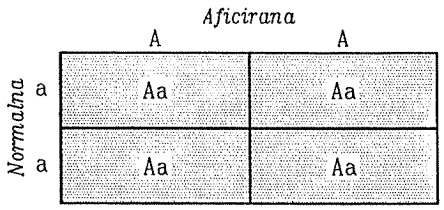
Slika 9.3 – U braku između normalne (recesivan homozigot) i aficirane (dominantni heterozigot) osobe 50% potomaka je normalno a 50% aficirano.

Na osnovu Mendelovih principa može se zaključiti da bi, ukoliko bi stupile u brak dve heterozigotne osobe sa brahidaktilijom, 3/4 potomaka trebalo da ima ovu anomaliju, a od njih 1/4 bi bila homozigotna za mutirani gen (AA), 1/4 homozigotna za normalne gene (aa), a 2/4 bi bile heterozigotne (Aa) sa fenotipski izraženom brahidaktilijom (sl. 9.4). Kada bi homozigotna (AA) osoba stupila u brak, svi njeni potomci imali bi brahi-



Slika 9.4 – Ako su oba roditelja aficirani heterozigoti, samo 25% potomaka može da bude normalno.

daktiliju bez obzira na genotip drugog roditelja (sl. 9.5). Na isti način se nasleđuju i sindaktilija, polidaktilija, juvenilna katarakta i mnoga druga svojstva.



Slika 9.5 – Ako je jedan roditelj dominantni homozigot za brahidaktiliju, svi potomci biće aficirani

Promena u jednom genskom lokusu može dovesti i do veoma teških poremećaja. Takav je slučaj hondrodistrofije, anomalije koja je vekovima poznata. Danas se zna da se ona nasleđuje kao dominantno svojstvo.

Analizom rodoslovnih stabala uočava se da se dominantna svojstva koja ne ugrožavaju život i reprodukciju nosioca vertikalno prenose kroz niz generacija i da potomci sa anomalijama uvek imaju bar jednog roditelja sa istim anomalijama. Ako su roditelji normalni, u pitanju je sveža (de novo) mutacija u reproduktivnoj ćeliji jednog od roditelja.

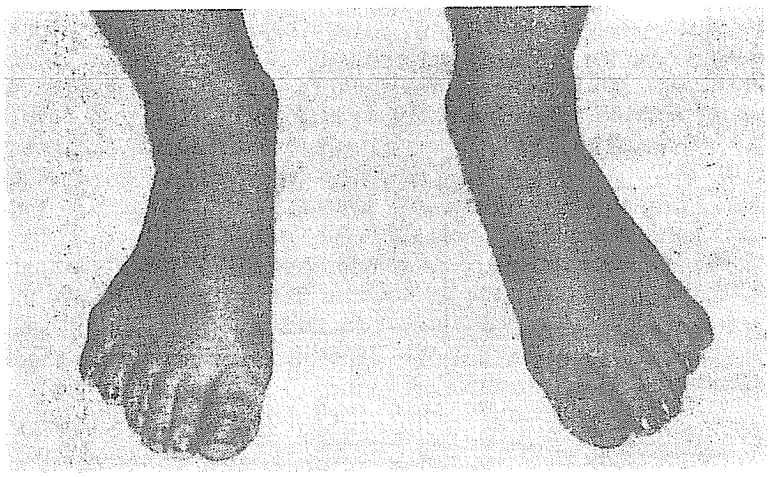
Ranije je naglašeno da jedan alel može fenotipski da se izrazi u heterozigotnom stanju. To je dominantni gen. Jedna od karakteristika dominantnog nasleđivanja u čoveka je da dominantni geni mogu pokazivati čitav spektar fenotipskih varijacija. Kada je heterozigot intermedijaran, između dva homozigota u odnosu na svojstvo koje posmatramo, dominacija je nepotpuna. Ako heterozigot odgovara mutantnom homozigotu, tada je dominacija potpuna. Većina štetnih dominantnih gena čoveka je tako retka u populaciji da homozigotne individue za određeni gen nikada nisu ni utvrđene. Štetni dominantni geni su izloženi selekciji već u jednostrukoj dozi i zato retko postižu takvu učestalost u populaciji koja bi obezbedila susret dva heterozigota. Postoje podaci za neke dominantne gene kao, npr., gen za brahidaktiliju, koji u jednostrukoj dozi prouzrokuje mali poremećaj u razviću skeleta, da je u dvostrukoj dozi (homozigotno stanje) letalan. Iz ovih razloga teško je reći da li dati gen pokazuje nepotpunu ili potpunu dominaciju i zato se u humanoj genetici koristi termin "dominantan" za bilo koji gen koji se fenotipski izražava u heterozigotnom stanju.

Ovu fenotipsku varijabilnost uslovljavaju dva značajna genska svojstva, ekspresivnost i penetrantnost.

1. ***Ekspresivnost*** označava stepen fenotipske izražajnosti jednog gena. Na primer, gen za polidaktiliju može manifestovati čitav niz fenotipskih varijacija, od izmene u vidu zadebljanja do pojave jednog ili više prekobrojnih prstiju (sl. 9.6).

2. ***Penetrantnost*** (probojnost) predstavlja statistički pojam kojim se izražava procenat od ukupnog broja individua nosilaca određenih dominantnih gena, kod kojih je svojstvo fenotipski izraženo. U nekim rodoslovima čoveka se zapaža da zbog slabe penetrantnosti gena cela jedna generacija potomaka može biti preskočena, da bi se svojstvo ponovo fenotipski izrazilo u narednoj generaciji. Gen koji se uvek fenotipski izrazi ima penetrantnost 100% – na primer, gen za krvnu grupu čoveka. Mnogi geni, međutim, imaju manju vrednost penetrantnosti.

Kada se u heterozigotnom stanju fenotipski potpuno izražavaju oba gena (alela), takva pojava se naziva ***kodominacija.*** Takvi aleli kontrolišu sintezu dva različita proteinska produkta koja se mogu izraziti u heterozigotnom stanju. Na primer, u čoveka je alel za krvnu grupu A kodominantan sa alelom za krvnu grupu B, pa heterozigot AB pokazuje fenotipske karakteristike obe krvne grupe. Ukrštanjem dva heterozigota fe-



Slika 9.6 – Polidaktilija i sindaktilija. Udružena dva autosomno dominantna svojstva

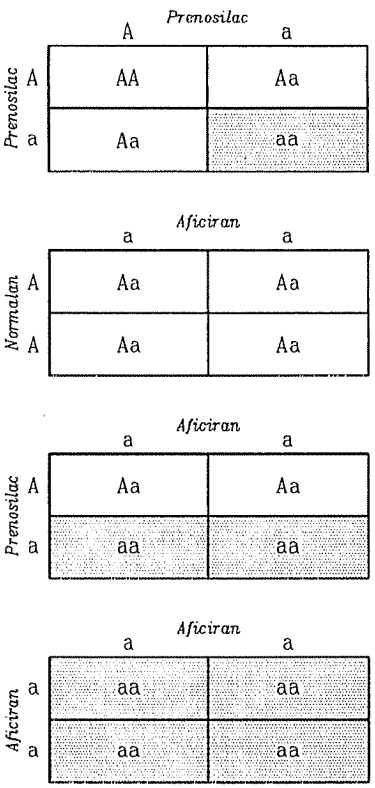
notipski odnos će zbog kodominacije biti 1 : 2 : 1 umesto 3 : 1.

Recesivno nasleđivanje

Mnoga "normalna" i "nenormalna" svojstva čoveka nasleđuju se kao recesivna. To su srasla ušna resica, normalan broj prstiju, neosetljivost na PTC (feniltiokarbamids) i sl. Od nenormalnih svojstava recesivno se nasleđuju noćno slepilo, neki oblici gluvonemosti, čitav niz metaboličkih poremećaja nastalih usled nedostatka biološki aktivnih enzima.

Recesivni geni se fenotipski izražavaju kada su u homozigotnom stanju, što znači da jedinka mora od oba roditelja da dobije po jedan mutirani gen. Za razliku od mutiranih, dominantnih štetnih gena, recesivni geni su češći u populaciji i mogu se akumulirati u heterozigotnom stanju i prenositi sa generacije na generaciju, dok se ne uspostavi homozigotno stanje. Jasno je da je u populaciji daleko veći broj fenotipski normalnih heterozigota nego homozigota u kojih se recesivno svojstvo izražava u fenotipu.

Prema Mendelovom pravilu, verovatnoća da se rodi homozigotno oštećeno dete u braku dva heterozigota je 1/4; 2/4 dece bili bi heterozigoti, fenotipski normalni nosioci recesivnog gena a 1/4 i fenotipski i genotipski normalni dominantni homozigoti (sl. 9.7).

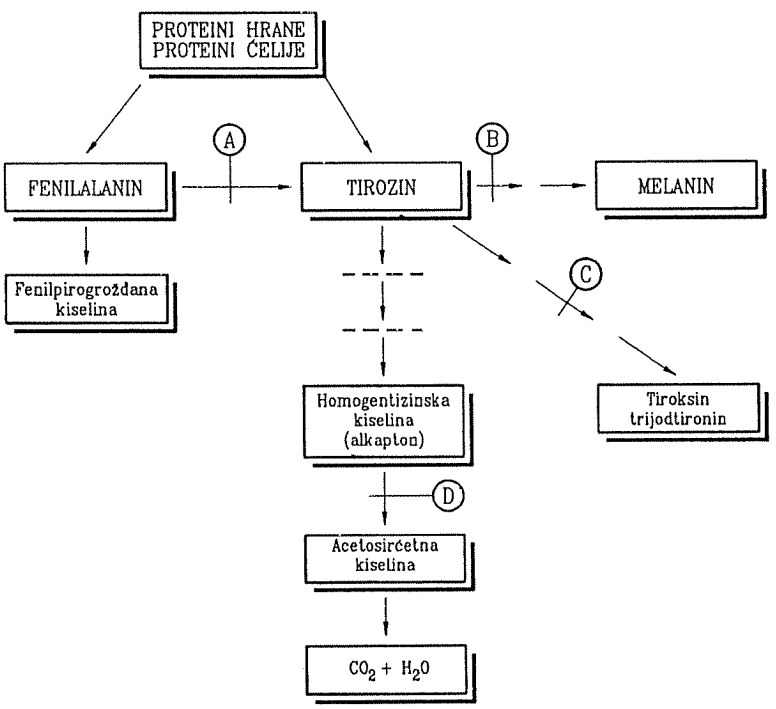


Slika 9.7 – Aficirani potomci u različitim tipovima brakova (prenošenje recesivnog alela)

Engleski lekar Garrod (1906) je prvi zapazio da se neke nasledne bolesti čoveka prenose kao tipična recesivna mendelska svojstva. Mada se početkom dvadesetog veka malo znalo o genima, biosintezi proteina i proteinskoj prirodi enzima, Garrod je pretpostavio da su ove bolesti izazvane nedostatkom određenih enzima, a da se taj nedostatak enzima nasleđuje. Pola veka kasnije Garrodove pretpostavke bile su potvrđene, objašnjene su priroda enzima, uspostavljena veza između gena-proteina-enzima, i uloga enzima u različitim metaboličkim putevima u ćeliji. Patologija je dobila novo poglavlje o enzimskim bolestima.

Poznato je da se tokom varenja proteini hrane razlažu do aminokiselina (AK), AK dospevaju u ćelije i mogu da se ugrade u proteine ćelije, mogu da se konvertuju u neke druge AK ili materije potrebne ćeliji, mogu da se razlože do CO_2 i H_2O (sl. 9.8).

U čoveka se, ne često (1/25.000 novorođenih), javlja bolest fenilketonurija. Biohemijski, bolest nastaje usled nedostatka enzima jetre koji katališe prelaz fenil-alanina u drugu AK, tirozin. Nedostatak enzima ili prisustvo biološki neaktivnog enzima je posledica mutacije gena koji direktno kontroliše biosintezu enzima. Heterozigotni nosioci mutiranog gena su fenotipski normalni jer heterozigot ima jedan normalan gen, dovoljan za biosintezu potrebne količine enzima, ali u krvi obično ima povišen nivo fenil-alanina. Homozigoti za mutirani gen su fenotipski (klinički) bolesni. Pošto se u homozigota fenil-alanin ne konvertuje u tirozin, fenil-alanin se nakuplja, prelazi u fenil-alanin-pirogrožđanu kiselinu ili druge metabolite, koji se nakupljaju u krvi i prelaze u mokraću. Krv bogata fenil-alaninom i fenil-pirogrožđanom kiselinom utiče na nervni sistem, pa su osobe sa fenilketonurijom mentalno za-



Slika 9.8 – Različiti metabolički putevi aminokiseline fenil-alanin

ostale. Simptomi bolesti mogu da se spreče dijetom u kojoj nema fenil-alanina.

Ukoliko je gen *A* normalan, fenil-alanin se konvertuje u *tirozin,* koji stupnjevito prelazi u *melanin,* pigment dužice, kože i kose. U tom metaboličkom putu učestvuje veći broj enzima. Ako mutira gen *B,* nema početne reakcije i dolazi do metaboličkog bloka, ne stvara se melanin. Osobe homozigotne za mutirani gen B su albino.

Ovaj metabolički put može da se prekine na različitim stupnjevima usled mutacije gena za različite enzime.

Pri razlaganju tirozina na CO_2 i H_2O u jednom stupnju razlaganja homogentizinska kiselina ili alkapton prelazi u acetosirćetnu kiselinu. Ovu reakciju katališe enzim koji je pod kontrolom gena *D.* Ako je jedna osoba homozigotna za ovaj mutirani gen (dd homozigot), imaće alkaptonuriju. Mokraća ovih osoba, zbog velike količine alkaptona, na vazduhu dobija mrku boju. Tokom vremena, hrskavica nosa i ušiju postaje takođe mrke a u drugoj ili trećoj deceniji života javlja se hronični artritis.

Usled mutacije gena *C* tirozin ne prelazi u *tironin* pa se ne stvaraju hormoni štitne žlezde, tiroskin i trijod-tironin. Deca homozigotna za mutirani gen C rađaju se sa teškim oštećenjima CNS (hipotiroidni kretenizam).

Iz navedenih primera se vidi da različite genske mutacije mogu da izmene ili prekinu metaboličke puteve jedne aminokiseline – fenilalanina. Svaki poremećaj normalnog metabolizma ima različitu fenotipsku ekspresiju odnosno različitu kliničku sliku.

Ako se podsetimo koliko ima aminokiselina, proteina i enzimskih reakcija, jasno je da su nebrojene mogućnosti nastanka metaboličkih grešaka.

Kod nasleđivanja metaboličkih poremećaja najčešće se dešava da su roditelji fenotipski normalni heterozigotni prenosioci mutiranog gena. Međutim, postoje porodice u kojima su oba roditelja aficirani homozigoti, a rađaju fenotipski normalnu decu. Tako, npr., homozigotni albino roditelji mogu biti nosioci različitih mutiranih gena sa istim fenotipskim efektom. Ovaj fenomen je označen kao *genokopija.* Njihovi potomci su heterozigoti za dve različite mutacije (geni za dva različita enzima koji regulišu različite stupnjeve biosinteze melanina), pa su fenotipski normalni.

Slično je sa hipotiroidnim kretenizmom, koji može biti posledica različitih genskih mutacija (gen za enzim koji reguliše biosintezu tironina ili gen za agenezu tiroideje).

Hipotiroidni kretenizam može da bude uslovljen i nedostatkom joda u okolnoj sredini, odnosno i genetički faktori i faktori sredine mogu da rezultiraju istim fenotipom. Ovaj fenomen je označen kao *fenokopija.*

I fenilketonurija može da se ispolji kao fenokopija. Poznat je slučaj da majka sa fenilketonurijom rađa heterozigotno, mentalno zaostalo dete. Po pravilu, heterozigot bi trebalo da bude fenotipski normalan. Do mentalne retardacije deteta dolazi usled toga što krv majke (faktor sredine), bogata fenil-pirogrožđanom kiselinom i drugim metabolitima fenil- alanina, prolazi kroz placentu i oštećuje CNS ploda.

Alelomorfni geni, o kojima je bilo reči, nalaze se na jednom od 22 para somatskih hromosoma ili autosoma. Ako se prati nasleđivanje svojstava koje kontrolišu geni locirani na autosomima, svojstvo na isti način nasleđuju potomci oba pola bez obzira na to da li ih prenosi otac ili majka.

Nasleđivanje pola

Jedan od posebnih problema za ljudski um bio je kako se nasleđuje pol. Možda nigde nije bilo toliko teorija i

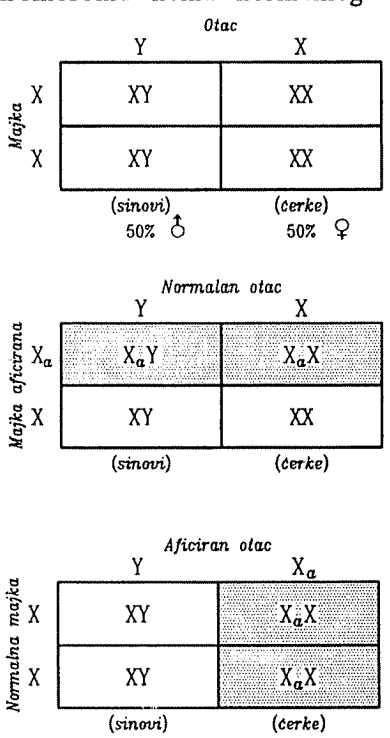
mistike kao u objašnjavanju nasleđivanja pola. Smatralo se da izrazito snažni muškarci dobijaju sinove. Žene su pile krv petla ili ekstrakt semenika kada su želele da rode sina.

Kada je otkriveno da se jajna ćelija stvara u jajniku i da se novi organizam razvija iz jajne ćelije, smatralo se da desni ovarijum stvara jaja za muški pol, a levi za ženski pol. Otkrivanjem polnih hromosoma insekata, a kasnije kada su opisani i polni hromosomi sisara i čoveka, došlo se do zaključka da je u čoveka ženski pol homogametski (XX) i da žene stvaraju samo jedan tip jajnih ćelija, ćelije sa X hromosomom. Muški pol je heterogametski i stvara dva tipa gameta, X- i Y-spermatozoide. Prema tome, stvar je slučaja da li će spermatozoid X ili Y oploditi jajnu ćeliju. Mogućnosti i verovatnoća su za oba tipa gameta iste, zato je u velikim populacijama odnos polova približno 1 : 1.

Nasleđivanje vezano za X-hromosom

Homogametnost i heterogametnost polova su značajne u pogledu nasleđivanja svojstava, naročito onih koje kontrolišu geni smešteni na X-hromosomu. Do sada je određeno oko 107 takvih gena koji kontrolišu i dominantna i recesivna svojstva. Dominantni poremećaji vezani za X-hromosom su relativno retki i pojavljuju se obično u više generacija jedne porodice. Jedan od dominantnih gena determiniše enzim glukozo-6-fosfat-dehidrogenazu (G6PD). Kada su u pitanju X-vezani geni za dominantno nasleđivanje, žene sa dva X-hromosoma su dva puta češće aficirane od muškaraca. Heterozigotne žene imaju fenotip koji varira od normalnog do aficiranog (zavisno od inaktivacije X). Homozigotna majka daje svoj X-hromosom sa mutacijom svim potomcima, a heterozigotna majka polovini svojih potomaka. Aficirani otac daje X-hromosom samo kćerima.

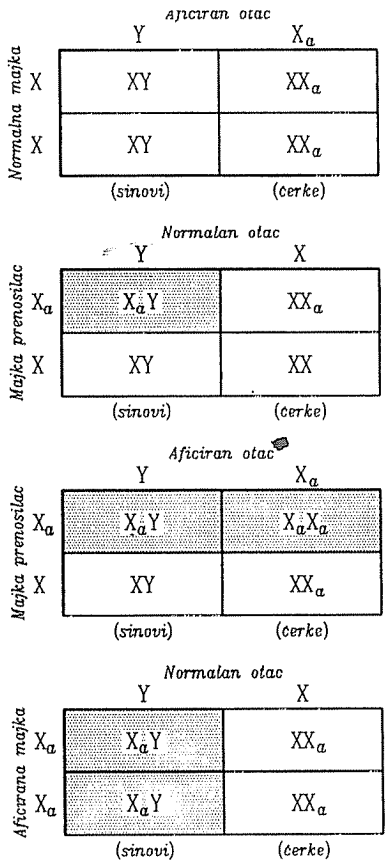
Ako je na jednom X-hromosomu žene mutirani recesivni gen (npr., za hemofiliju), na drugom X-hromosomu je njegov normalni, dominantni alel. Prema tome, žena je fenotipski zdrava. Heterozigotna žena predaje mutirani gen jednoj polovini svojih potomaka oba pola. Kćeri će biti heterozigotni nosioci mutiranog gena, a sinovi će biti aficirani. Ali ako normalna homozigotna žena stupi u brak sa muškarcem obolelim od hemofilije, sve kćeri će od oca dobiti X-hromosom sa mutiranim genom i biće prenosioci, a sinovi iz takvog braka biće potpuno normalni. Otac svojim sinovima daje Y-hromosom pa, prema tome, ne može da im prenese gene locirane na X-hromosomu. Muškarci imaju samo jedan X-hromosom i ako je na njemu mutiran gen, on se ispoljava u fenotipu jer na Y-hromosomu nema normalnog alela



Slika 9.9a – Nasleđivanje pola u čoveka i nasleđivanje dominantnog (A) svojstva kontrolisanog genom na X-hromosomu

(genski sastav X- i Y- hromosoma nije isti) koji bi potisnuo delovanje gena na X-hromosomu. Da bi osoba ženskog pola imala recesivno svojstvo izraženo u fenotipu, na oba X-hromosoma mora da bude mutiran gen. Drugim rečima, u muškom polu je dovoljna jedna doza gena da bi se svojstvo ispoljilo u fenotipu (hemizigotnost), a u ženskom polu su potrebne dve doze gena (par alela) (sl. 9.9 a i b).

Nužno je naglasiti da ponekad i osobe ženskog pola heterozigoti za recesivni mutirani gen mogu imati fenotipski izražen poremećaj zavisno od obrasca inaktivacije X-hromosoma, tj. ako u odgovarajućem tkivu preovlađuje aktivan



Slika 9.9b – Prenošenje recesivnog svojstva vezanog za X-hromosom (a).

X-hromosom sa mutiranim genom, tada će se recesivno svojstvo fenotipski izraziti i u heterozigotnom stanju.

Nasleđivanje vezano za Y-hromosom

Donedavno se malo znalo o genima smeštenim na Y-hromosomu. Jedino somatsko svojstvo za koje se pretpostavljalo da se nasleđuje preko Y-hromosoma su "dlakave uši" u muškarca. Najnovija istraživanja ukazuju da se, pored diferencijalnih segmenata koji kontrolišu razviće gonada, na Y-hromosomu nalaze i geni koji determinišu različita somatska svojstva i nasleđuju se na autosomni način. Ovi geni su smešteni u segmentu koji sinapsira sa X-hromosomom i imaju svoje homologe alelne parove na X-hromosomu, i označeni su kao pseudoautosomni geni.

Nasleđivanje ograničeno polom

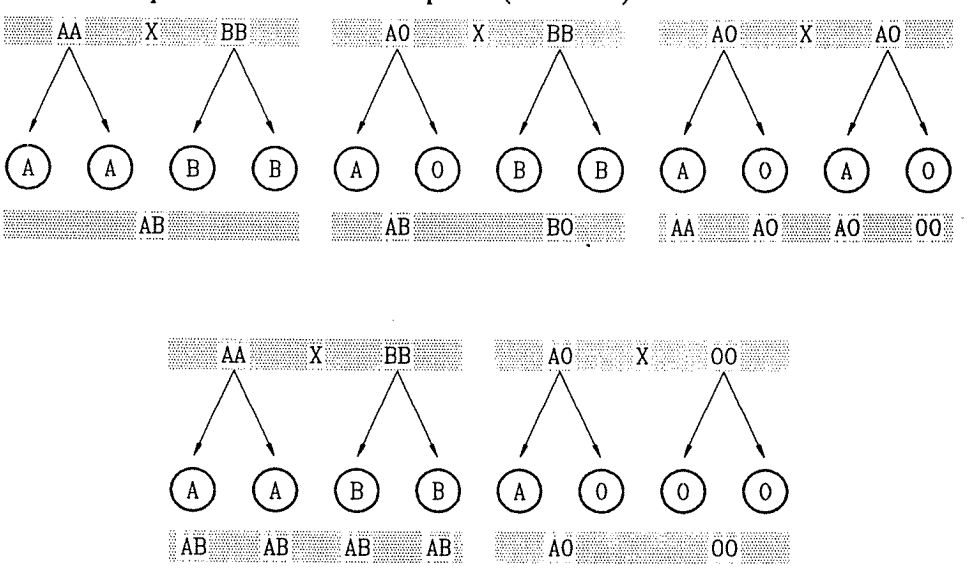
Neka svojstva čoveka nisu uslovljena genima koji se nalaze na polnim hromosomima, ali ekspresija gena zavisi od toga da li je u pitanju osoba ženskog ili muškog pola. Pretpostavlja se da su ti geni na autosomima, a da polni hormoni utiču na izražajnost gena. Tako gen za ćelavost (samo za naslednu ćelavost) u muškom polu pokazuje karakter dominantnog gena, verovatno zbog prisustva androgena, pa je zato u muškog pola ćelavost dosta česta pojava. U ženskom polu gen za ćelavost mora da bude u homozigotnom stanju (ponaša se kao recesivan) da bi se fenotipski izrazio.

	KK	KB	BK	BB
♀	normalna (K)	normalna (K)	normalna (K)	ćelava (K)
♂	normalan (K)	ćelav (B)	ćelav (B)	ćelav (B)

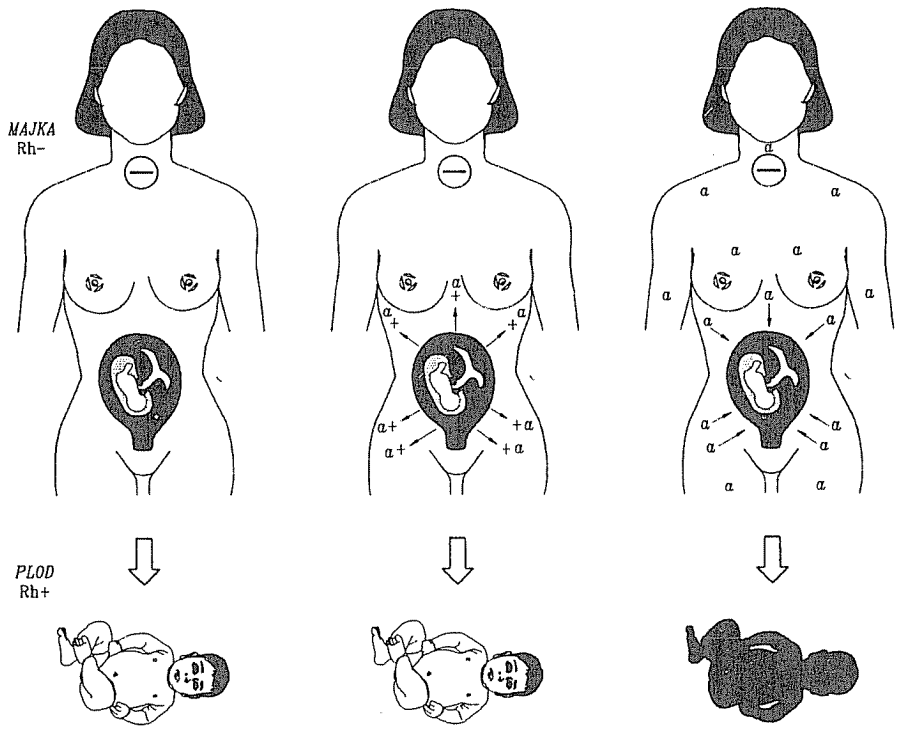
Multipni aleli

Ranije je naglašeno da su aleli alternativni oblici jednog gena na istim genskim mestima homologih hromosoma. Svaki gen ima veliki broj nukleotida i teorijski u svakom delu gena može da nastane mutacija, odnosno gen može da se izmeni. Različite mutantne forme divljeg gena nazivaju se multipnim alelima. Najpoznatiji primer multipnih alela u čoveka je ABO-sistem alela za osnovne krvne grupe. ABO-lokus se nalazi na hromosomu br. 9 u čoveka i ima tri alela. Aleli IA i IB su kodominanti, oba se izražavaju u fenotipu AB heterozigota, a alel I^o je recesivan, izražava se samo u fenotipu I^o I^o homozigota. Osobe A- i B-krvne grupe mogu biti homozigoti (AA, BB) i heterozigoti (AO, BO) (sl. 9.10). Ovi genski lokusi kontrolišu veoma važno svojstvo površine eritrocita čoveka. Sva tri alela određuju sintezu enzima glikozil-transferaze, koji katališe sintezu polisaharida. Ovi se vezuju za lipide i uključuju u ćelijsku membranu eritrocita kao glikolipidi, i imaju svojstvo antigena. Zavisno od tipa enzima sintetiše se polisaharid A ili polisaharid B. Osobe grupe I^o nemaju ni A- ni B-polisaharide već samo nemodifikovani glikolipid H.

Danas je poznato da oko 80% ljudi ima antigen Rh (Rh+). Kako se nasleđuje Rh-antigen, nije sasvim jasno. Po Wineru bi se nasleđivao kao i AB-antigeni, odnosno po tipu multipanih alela (6 ili više). Po Raceu i Fischeru, Rh-grupu određuje tri para gena C, D i E. Ti geni nisu aleli već blisko vezani geni, jer se nalaze na istom hromosomu. Pretpostavlja se da dominantni D-gen uslovljava pojavu Rh-antigena. Ako žena koja je Rh- stupi u brak sa čovekom koji je Rh+, postoji mogućnost da njihovo dete bude Rh+ (Rh-gen je dominantan). Rh+ dete proizvodi Rh-antigene eritrocita. Ako eritrociti ploda dospeju u krvotok majke i imuniziraju Rh-majku, ona stvara antitela, koja mogu da prodru u plod i da izazovu teška oštećenja pa i smrt ploda. Obično u prvoj trudnoći ovih pojava nema. Kako pri porođaju može doći do većih mešanja krvi ploda i majke, svaka nova trudnoća može da bude opasnija zbog veće količine antitela majke (slika 9.11).



Slika 9.10 – Nasleđivanje krvnih grupa ABO u čoveka



Slika 9.11 – Neslaganje krvne grupe Rh ¯ majke i Rh+ ploda

Pleiotropni geni

Pleiotropijom se naziva višestruki fenotipski efekat jednog gena, jer jedan primarni produkt gena – polipeptidni lanac-može ulaziti u sastav različitih proteina. Pleiotropni efekat gena je posebno značajan u periodu ranog razvoja i diferencijacije.

Tako, npr., gen za srpastu anemiju ispoljava štetni, pleiotropni efekat na različite biološke funkcije bolesnika: koštnu srž, srce,krvne sudove,bubreg, mišić, mozak.

Još 1981. god. Van der Hoeve i de Kleyn su opisali sindrom "krhkih kostiju, plave sklere i otoskleroza" (Van der Hoeveov sindrom). Danas se smatra da ovaj sindrom nastaje zbog ranog pleiotropnog efekta jednog dominantnog mutiranog gena, Kao i svi drugi dominantni geni, i ovaj može da ima različitu ekspresiju. Nosioci mutacije mogu da imaju samo osteoporozu ili samo plavu skleru ili otosklerozu. Drugi imaju sva tri poremećaja ili bilo koju kombinaciju poremećaja.

Letalni geni

Geni koji sprečavaju preživljavanje u toku embrionalnog i neonatalnog razvića nazivaju se letalni. Letalni geni se mogu ponašati kao dominantni ili recesivni.

Kada je letalni gen dominantan, on se odmah izrazi, nosilac ovog gena ugine i gen iščezava iz populacije. Zbog toga dominantni letalni geni nastaju kao nove mutacije i javljaju se sporadično.

Neki mutirani dominantni geni su letalni samo u homozigotnom stanju, dok u heterozigotnom stanju izazivaju određene poremećaje u razviću organizma. Na primer, dominantni gen kod čoveka

koji izaziva teške poremećaje u razviću skeleta u homozigotnom stanju se ponaša kao letalan, dok se u heterozigotnih individua zapaža samo mala abnormalnost u vidu skraćenog ili savijenog kažiprsta.

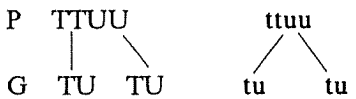
Recesivni letalni geni se izražavaju samo u homozigotnom stanju i oni prouzrokuju znatan procenat smrtnosti embriona i novorođene dece.

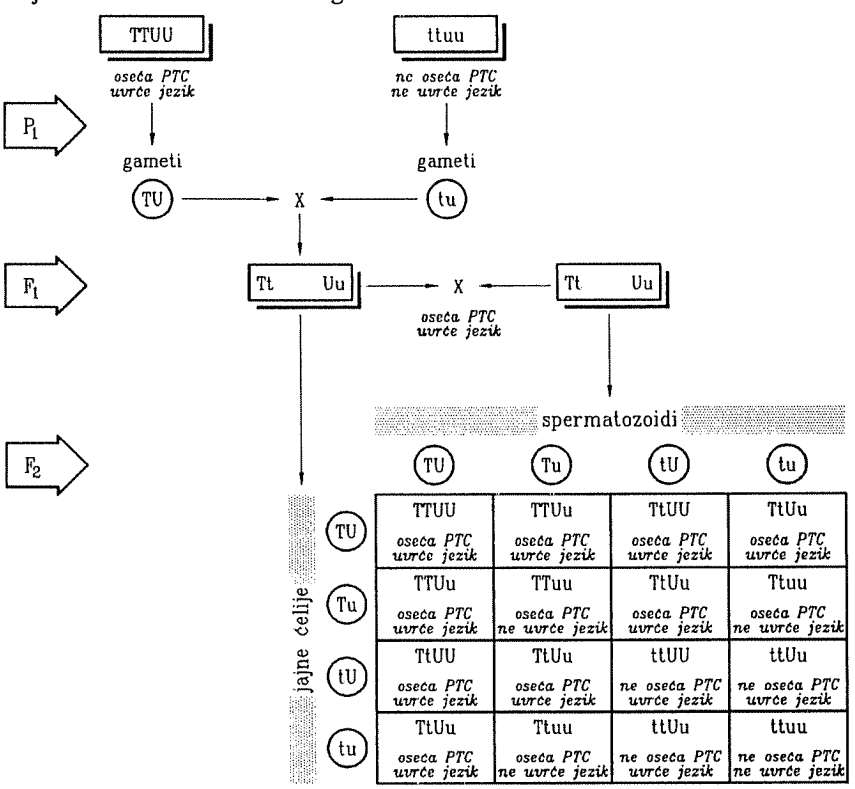
Vrlo je verovatno da su mnogi rani prekidi intrauterinog razvoja izazvani delovanjem letalnih gena.

Dihibridno ukrštanje

Jedno od normalnih svojstava čoveka je sposobnost uvrtanja jezika. Svojstvo se nasleđuje kao dominantno. Drugo normalno dominantno svojstvo je osećanje gorkog ukusa PTC-a (fenil-tiokarbamida). Analizirajmo mehanizam nasleđivanja ova dva svojstva u porodici u kojoj je majka homozigot za oba dominantna svojstva (UUTT): može da uvija jezik i oseća gorčinu PTC-a, a otac je homozigotan za oba recesivna svojstva (uutt): ne može da uvija jezik i ne oseća gorak ukus PTC-a. Geni koji determinišu ova svojstva nalaze se na dva različita para homolognih hromosoma.

Homozigotne osobe obrazuju samo jedan tip gameta:





Slika 9.12 – Dihibridno ukrštanje. Jedan roditelj oseća gorak ukus PTC-a i može da uvija jezik (dominantan homozigot) drugi ne oseća gorak ukus PTC-a i ne može da uvija jezik (recesivan homozigot). U F1 geneaciji svi potomci osećaju ukus PTC-a i svi mogu da uviju jezik (dominantni heterozigoti). U F2 generaciji geni se slobodno kombinuju i 9/16 potomaka ima oba dominantna svojstva, 1/16 oba recesivna a 6/16 su rekombinantne jedinke.

Spajanjem gameta (oplođenjem) nastaju potomci heterozigotni za oba svojstva, a sa fenotipski izraženim dominantnim svojstvima (princip uniformnosti).

Ako u brak stupe dve heterozigotne osobe (TtUu), njihova deca mogu da imaju jedan od četiri različita fenotipa. Pošto se geni nalaze na različitim parovima homologih hromosoma (slobodni geni) hromosomi će se u mejozi potpuno nezavisno razdvajati i svaki heterozigot će obrazovati četiri tipa gameta (sl. 9.12).

Poligenija

Razviće i fenotipski izraz jednog svojstva ostvaruju se često sadejstvom većeg broja gena koji su smešteni na različitim hromosomima. Ova pojava se naziva poligenijom. Ukoliko se svojstvo izrazi samo u onih osoba koje imaju, npr., gen A i B, a ne ispolji se ukoliko jedan od tih gena nije prisutan (npr., AAbb ili aaBB), govorimo o komplementarnoj poligeniji. Intenzitet svojstva je isti (fenotip je isti) i u osoba sa genotipom AABB, AaBB, AaBb, AABb, što znači da intenzitet svojstva ne zavisi od broja gena već je potrebno prisustvo oba tipa gena. Jedan od ilustrativnih primera komplementarne poligenije u čoveka je jedan oblik gluvonemosti. U braku između gluvoneme (aabb) i osobe sa normalnim sluhom (AABB) svi potomci imaju normalan sluh i heterozigotni su (AaBb). Dve heterozigotne osobe sa normalnim sluhom u potomstvu mogu da imaju ili gluvonemu decu ili decu sa normalnim sluhom (samo dva fenotipa) zbog komplementarnog i epistaznog delovanja gena. Samo one osobe koje imaju oba dominantna gena imaće normalan sluh. U ovom primeru nasleđivanja se lepo vidi epistazno delovanje nealelnih gena. *Epistaza* je tip genske interakcije pri kome jedan gen deluje inhibitorno na aktivnost drugog gena. Epistatički geni mogu biti i dominantni i recesivni. U nasleđivanju gluvonemosti svaki recesivni homozigotni par alela je epistatičan i sprečava efekte dominantnog gena koji je hipostatičan. Fenotipovi AAbb ili aaBB (gluvoneme osobe) primeri su epistatičkog dejstva recesivnog gena (sl. 9.13).

Aditivna poligenija – nasleđivanje kvantitativnih svojstava – predstavlja vid poligenog nasleđivanja jednog svojstva čija fenotipska ekspresija zavisi od kumulativnog dejstva većeg broja nealelnih gena. Svaki od ovih gena deluje malim efektom, čije se dejstvo sabira i nema potpune dominacije gena! Ovaj tip nasleđivanja se razlikuje od klasičnog mendelskog, jer u potomstvu ne postoje jasno razlučeni, alternativni fenotipovi, već se javlja čitav niz fenotipskih varijanti i zato se nasleđivanje ovih svojstava izražava statistički.

Mnoga svojstva čoveka se nasleđuju na ovaj način (visina, težina i dr). Klasičan i prvi proučen primer aditivne poligenije je nasleđivanje boje kože čoveka. Bračni par Davenport je još 1910. god. ispitivao mehanizam nasleđivanja boje kože stanovništva sa Jamajke i Bermuda. Danas se zna da boju kože određuje veći broj gena, ali je jednostavnije za ob-

A i B – geni za normalan sluh

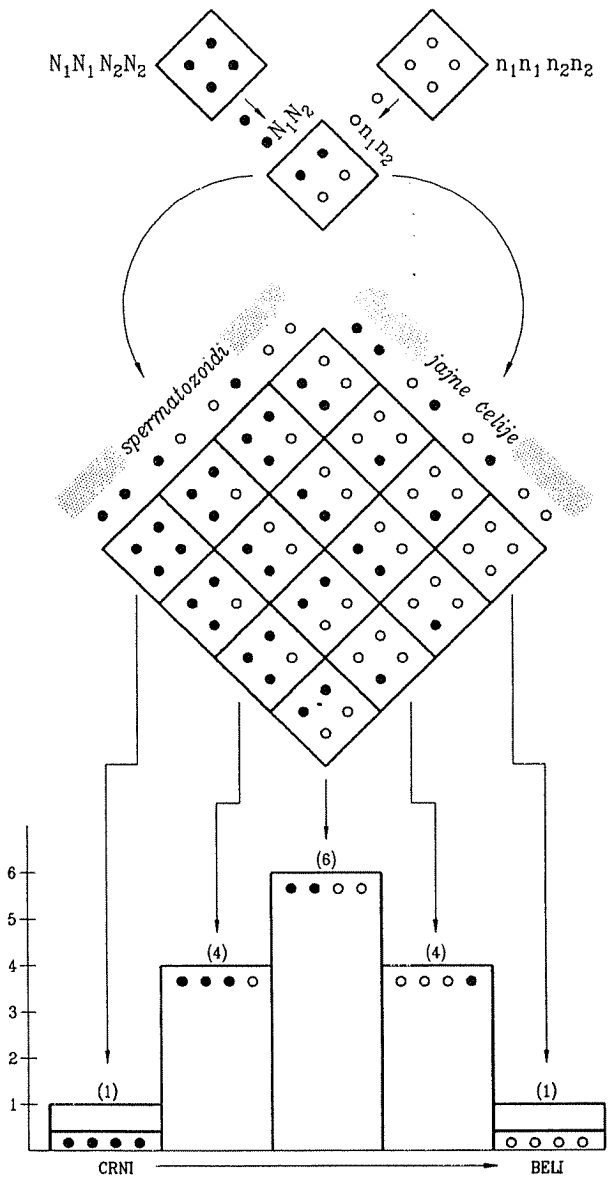
Aa Bb	gameti ♂ AB	Ab	aB	ab
gameti ♀ AB	AA BB *normalan*	AA Bb *normalan*	Aa BB *normalan*	Aa Bb *normalan*
Ab	AA Bb *normalan*	AA bb *gluv*	Aa Bb *normalan*	Aa bb *gluv*
aB	Aa BB *normalan*	Aa Bb *normalan*	aa BB *gluv*	aa Bb *gluv*
ab	aA Bb *normalan*	Aa bb *gluv*	aa Bb *gluv*	aa bb *gluv*

Slika 9.13 – Komplementarna poligenija. Samo jedinke koje imaju oba alela (A i B) imaju normalan sluh.

jašnjenje ako pretpostavimo da samo 4 gena određuju ovo svojstvo (sl. 9.14).

Ako u brak stupe dve homozigotne osobe crne i bele rase, jedna sa maksimalnim brojem gena (4N) za boju kože, a druga bez ovih gena u genotipu (ON), celokupno potomstvo ovih roditelja biće mulati zbog prisustva dva gena za boju kože i njihove nepotpune dominacije.

Mnogo češće mulati međusobno stupaju u brak. Mulati formiraju 4 tipa gameta i u njihovom potomstvu se oče-



Slika 9.14 – Aitivna poligenija. U F2 generaciji, intenzitet svojstva zavisi od broja gena koji determinišu to svojstvo.

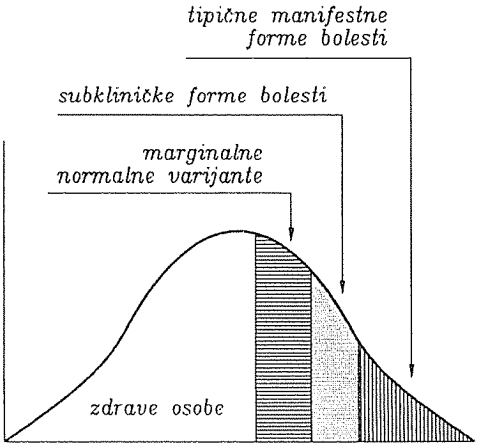
kuje više varijantnih fenotipova između dva ekstrema crne i bele boje kože. Analizom Panetove tablice i prenosom podataka na apcisu i ordinatu zapažamo da će najveći broj individua biti sa srednje izraženim svojstvom (imaju dva gena za boju kože); idući ka ekstremima, ovaj broj se sve više smanjuje.

Poligeno nasleđivanje uz sadejstvo najčešće nepoznatih činilaca sredine naziva se i ***multifaktorsko.*** Postoje brojni primeri patoloških svojstava čoveka koja su pod kontrolom većeg broja gena, a njihova fenotipska ekspresija zavisi u manjoj ili većoj meri od činilaca sredine. Najveći broj poremećaja i patoloških stanja čoveka koji su uslovljeni poremećajem nasledne osnove su multifaktorske etiologije. U ovu kategoriju poremećaja ubrajaju se i najčešća oboljenja savremenog čoveka: diabetes mellitus (šećerna bolest), kardiovaskularne bolesti, arterijska hipertenzija, povećana koncentracija holesterola, tireotoksikoza i sl.

Distribucija ovih svojstava u humanim populacijama u najvećem broju primera prati krivu normalne distribucije koja je ranije izložena. Prelazak između susednih varijanti je postupan, što govori u prilog mišljenju da ta svojstva uslovljavaju poligeni, a ne geni sa efektom "sve ili ništa". Za multifaktorske poremećaje je karakteristična agregacija. Kada se ovi poremećaji prate u porodicama obolelih vidi se da je distribucija svojstava asimetrična, sa znatno većom učestalošću određenih fenotipova na jednom kraju krive (sl. 9.15).

Multifikatorske nasledne bolesti razlikuju se od monogenskih po velikoj učestalosti u opštoj populaciji, po izraženoj porodičnoj agregaciji sa većom incidencijom bolesti u srodnika probanda, nego u opštoj populaciji.

Multifaktorska svojstva i tip njihovih nasleđivanja je veoma teško pratiti, jer ne podležu pravilnostima prenošenja un-



Slika 9.15 – Kriva multifaktorskih poremećaja u populaciji

utar porodice i zbog očiglednog uticaja činilaca sredine na ekspresiju gena. Verovatnoća da će se ista malformacija ili bolest ponovo javiti u porodici je manje predvidiva. Za ove poremećaje određuje se samo empirijski rizik pojave, jer nije moguća analiza segregacije poligena. Veći je rizik za ponovno javljanje u porodici ako je jedan roditelj aficiran, ako postoje u porodici dva ili više aficiranih prvostepenih srodnika i ako je anomalija ili bolest česta.

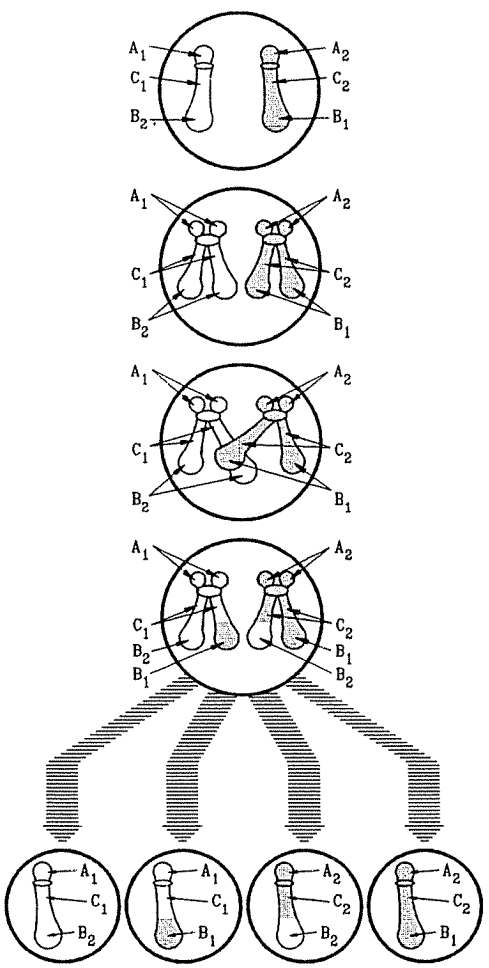
Da bi se procenio udeo naslednih činilaca i činilaca sredine u fenotipskoj eskpresiji multifaktorskog svojstva, koriste se metod blizanaca, populaciono-genetički metodi i dr.

VEZANI GENI

U izvesnim slučajevima, pri ukrštanju jedinki koje se razlikuju u dva svojstva, u F2-generaciji ne dobija se pravilan mendelski odnos 9 : 3 : 3 : 1 već se javlja najviše jedinki (oko 3/4) sa oba dominantni svojstva, oko 1/4 jedinki sa oba recesivna svojstva a mali broj jedinki ima rekombinantni fenotip (sl. 9.16). Detaljnim proučavanjem ovog fenomena Morgan i saradnici su otkrili da su u pitanju geni koji se nalaze na jednom (istom)

hromosomu. Ti geni se nazivaju vezanim genima i determinišu vezana svojstva. U čoveka, ženski pol ima 23 grupe vezanih gena (22 autosoma i jedan X-hromosom) a muški 24 grupe (22 autosoma + X + Y-hromosom).

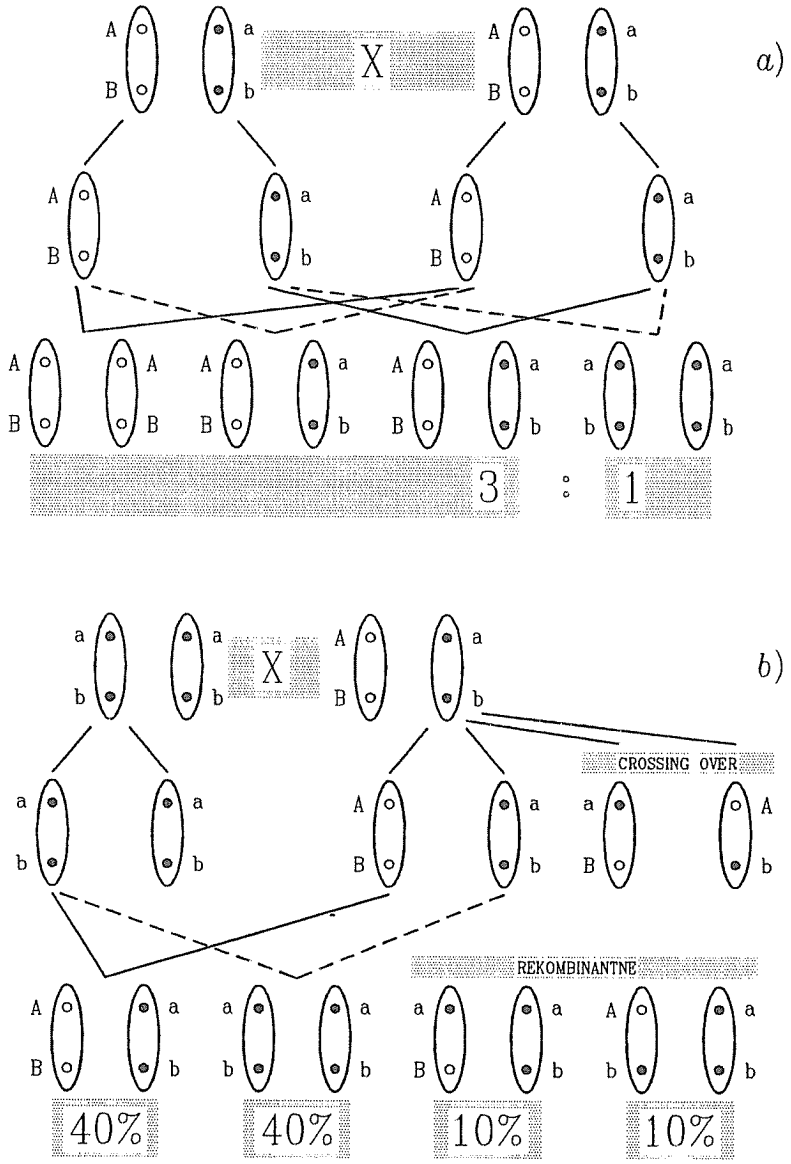
U mejozi, homologi hromosomi se razdvajaju i svi geni jednog člana homologog para odlaze u jednu kćerku ćeliju a drugog člana u drugu. Ukoliko u profazi I mejotičke deobe dođe do crossing overa i homologi hromosomi razmene odgovarajuće delove, vezani geni će se razdvojiti (sl. 9.16). Ako su genski lokusi vezanih gena veoma blizu, malo je verovatno da će se razdvojiti. Ukoliko su geni udaljeni jedan od drugog, verovatnoća da će se razdvojiti je veća. Drugim rečima, relativna udaljenost između vezanih gena može se odrediti na osnovu učestalosti crossing overa između tih gena. Rezultat crossing overa su rekombinovani potomci (rekombinantne jedinke, sl. 9.17).



Slika 9.16 – Crossing over, razmena homologih segmenata između nesestrinskih hromatida

Udaljenost se meri jedinicom genske mape, centi-Morganima, a svaki cM odgovara 1% crossing overa. Ispitivanje učestalosti crossing overa između vezanih gena koristi se za mapiranje hromosoma. Eksperimentalna ukrštanja su omogućila mapiranje čitavih genoma nižih oblika (neurospore, drozofile i dr). U čoveka eksperimentalni rad nije bio moguć pa su se koristili slučajno sklopljeni "informativni brakovi". U takvom braku jedan supružnik mora da bude sa fenotipski izraženim dominantnim svojstvima, ali da je heterozitog, a drugi je recesivni homozigot (Mendelovo analizirajuće ili povratno ukrštanje). Jedan gen mora da bude "marker", odnosno poznati i relativno čest gen (npr., gen za ABO-krvnu grupu, ili za osetljivost na PTC, za neki serumski protein i sl), drugi gen je za neko oboljenje ili anomaliju.

U čoveka je poznato nekoliko pari vezanih gena. Najčešće se govori o sindromu "nokti-čašica" (NP) i ABO genskom lokusu. Sindrom je posledica mutacije gena usled koje se obrazuju defektni, ili se uopšte ne obrazuju derivati ektoderma (nokti) i mezoderma (čašica). Novija istraživanja su pokazala da se ovaj sindrom u jednoj porodici javlja uvek kod onih članova koji imaju istu krvnu grupu. Znači, može da se javi kod osoba A; B-ili O-grupe, ali ako je vezan za A-grupu, svi članovi porodice sa krvnom grupom A imaju i ovaj sindrom. Kasnija ispitivanja su pokazala da se gen za sindrom NP



Slika 9.17 – Vezani geni: a. Ukrštanje heterozigota, bez crossing overa. b. Crossing over, stvaranje rekombinantnih jedinki

nalazi na istom hromosomu (br. 9) na kome je i lokus krvne grupe ABO (marker). Geni su udaljeni jedan od drugog za deset genskih mesta (učestalost crossing overa je 10%). Ako u brak stupi muškarac krvne grupe A sa NP sindromom i žena sa O krvnom grupom i normalnih noktiju i čašice (recesivni homozigot) a njihovi potomci imaju isti fenotip u odnosu 1 : 1, to znači da u gametogenezi nije bilo crossing overa. Ukoliko u potomstvu ne dobijemo mendelski odnos fenotipova karakterističan za analizirajuće ukrštanje 1 : 1 (50% :

Tabela

	AO		X	OO				AO		X	OO			
	NPn			nn				NPn			nn			
G	A	O		O	O			A	O		O	O		
	NP	n		n	n			NP	n		n	n		
F1	AO			OO		AO	AO	OO			OO			
	NPn			nn		NPn	nn	NPn			nn			
generacija	50%			50%		40%	10%	10%			40%			
	nije bilo crossing overa							crossing over						

50%) već se javi i određen procenat rekombinantnih fenotipova, znači da je bilo crossing overa i razdvajanja vezanih gena, ABO i NP. Rekombinovane jedinke imaju krvnu grupu A i normalne nokte i čašicu ili krvnu grupu O i sindrom NP (Tabela).

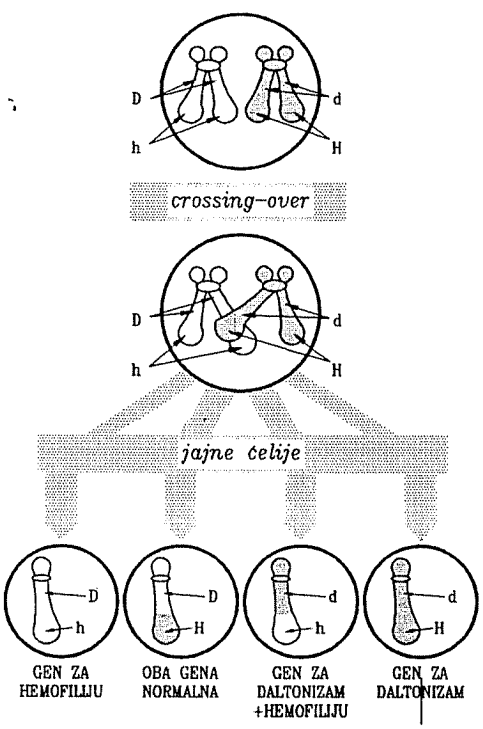
Na osnovu podataka dobijenih analizom različitih porodica smatra se da su geni ABO– lokusa i geni za NP– sindrom udaljeni za 10 cM.

Ima i podataka o razdvajanju gena čoveka, koji su locirani na X-hromosomu. Retki su slučajevi da jedna osoba nosi mutirane gene i za daltonizam i za hemofiliju. Ukoliko se to ipak dogodi, u potomstvu može da se prati razdvajanje gena (sl. 9.18). Smatra se da su geni za daltonizam i hemofiliju udaljeni za 12 genskih mesta.

GENEALOŠKA (RODOSLOVNA) STABLA

Da bi se ustanovilo na koji način se u čoveka nasleđuje neko svojstvo, pribegava se konstrukciji genealoških (rodoslovnih) stabala. Dobro konstruisano stablo, koje obuhvata veliki broj generacija i članova porodice, može da dâ značajne podatke.

Genealoški metod je najuniverzalniji u genetici čoveka i primenjuje se za rešavanje i teorijskih i praktičnih problema: 1) za utvrđivanje naslednog karak-



Slika 9.18 – Posledice crossing-overa između dva X-hromosoma od kojih jedan ima normalan gen za hemofiliju (H), a mutirani za daltonizam (d), a drugi X- hromosom mutirani gen za hemofiliju (h) i normalan za daltonizam (D)

tera svojstva koje izučavamo, 2) za određivanje tipa nasleđivanja i penetrantnosti gena, 3) za analizu vezanih gena i mapiranje hromosoma, 4) za izučavanje intenziteta mutacionog procesa, 5) za ispitivanje mehanizama interakcije između gena, 6) za medicinsko--genetsku konsultaciju.

Postoje utvrđena načela po kojima se prave rodoslovna stabla. Za žensku osobu normalnog fenotipa ucrtava se prazan krug, a za onu sa anomalijom (bolešću ili varijantom normalnog svojstva) ispunjen krug, za normalnog muškarca prazan kvadrat, za aficiranog (sa anomalijom, bolešću) ispunjen kvadrat. Abortirani plod se označava tačkom, umrla osoba precrtanim krugom odnosno kvadratom itd. (sl. 9.19).

Roditeljski par je povezan u stablu horizontalnom linijom (bračna linija). Ispod roditelja se unose deca i označavaju rednim brojem od 1, prema redosledu rađanja. Deca su povezana horizontalnom linijom između sebe, a jednom vertikalnom linijom, upravnom na bračnu liniju, sa roditeljima. Jedan horizontalan niz individua predstavlja jednu generaciju i označen je rimskim brojem. Najstarija generacija nosi broj I. Ako jedan član rodoslovnog stabla nosi oznaku II3, znači da je trećerođeno dete druge generacije. U prvoj generaciji broj 3 u kvdratu označava troje fenotipski zdrave muške dece (sl. 9.19). Pod brojem 4 i 5 su monozigotni blizanci, a pod brojem 6 i 7 su dizigotni blizanci. Ukoliko u jednom stablu pratimo više osobina, u legendi koja prati stablo mora se naznačiti kako obeležavamo određeno svojstvo.

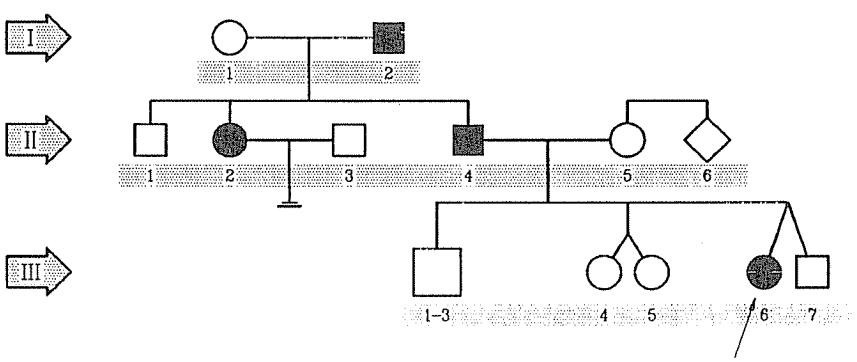
Pri konstrukciji rodoslovnog stabla polazimo od osobe koja se javlja na pregled (proband, propozitus). Prvo treba ustanoviti da li propozitus ima bar jednog roditelja, zatim sestre ili braću sa istom anomalijom.

Dominantno nasleđivanje

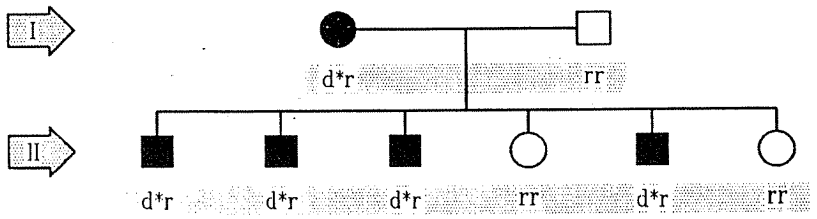
Na sl. 9.19. propozitus (devojčica) ima šestoro braće i sestara sa normalnim brojem prstiju. Otac devojčice, tetka po ocu i deda po ocu imaju polidaktiliju. U sve tri ispitane generacije javlja se polidaktilija, odnosno distribucija svojstva je *vertikalna.* Svaka aficirana osoba ima jednog aficiranog roditelja, a aficirani roditelji imaju i normalne potomke. Svi aficirani članovi rodoslova su, prema tome, dominantni heterozigoti.

Odnos aficiranih muških i ženskih potomaka je jednak, što kazuje da je gen za polidaktiliju lociran na autosomu.

Ako bismo želeli da označimo genotipove članova genealoškog stabla, dominantni mutirani gen obeležićemo sa d' a



Slika 9.19 – Genealoško stablo porodice sa polidaktilijom (autosomno, dominantno svojstvo). Anomalija se javlja u tri generacije (vertikalna distribucija)



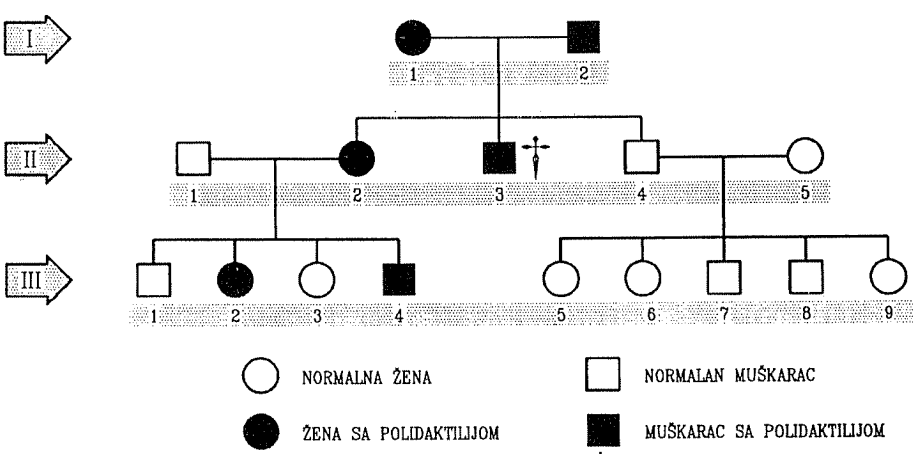
Slika 9.20 – Nasleđivanje autosomno dominantnog svojstva. Pošto među potomcima ima i zdrave dece, majka je heterozigot

njegov normalni, recesivni alel sa r (sl. 9.20).

Šanse da se u braku jedne normalne osobe (recesivan homozigot) i jednog heterozigota rodi aficirano dete su 50%. Kako su porodice čoveka uglavnom male, nećemo dobiti uvek očekivani odnos normalnih i aficiranih, 1 : 1. Ali, kada se prikupi veći broj porodica sa istom anomalijom, ukupan broj zdravih (normalnih) i aficiranih potomaka biće 1 : 1. U maloj porodici može da se dogodi da sva rođena deca budu ili normalna, ili aficirana. Ako bi jedan roditelj bio homozigotan za dominantan, mutiran gen (prema dosadašnjim podacima u literaturi homozigoti za dominantne mutacije ne prežive, homozigotnost je letalna), sva njegova deca nasledila bi d' gen i bila bi aficirana. Ukoliko su oba roditelja aficirana (sl. 9.21) na osnovu potomstva zaključujemo da li su homo ili heterozigoti.

U drugoj generaciji, pored aficiranih, rođen je i jedan normalan potomak, što govori da su roditelji dominantni heterozigoti. Aficirani potomci mogu biti homo- i heterozigoti. Član br. 2 II generacije je očigledno heterozigot. Osoba pod br. 3 je rano umrla, što ukazuje da dominantni geni u heterozigotnom stanju mogu imati letalan ili subletalan efekat.

Ako su oba roditelja fenotipski normalna, a rode dete sa dominantnom mutacijom, možemo pretpostaviti da je u gametogenezi jednog roditelja došlo do nove mutacije (pitanje očinstva takođe treba uzeti u obzir). Dete koje nije nasledilo dominantan mutirani gen fenotipski je normalno i imaće normalno potomstvo.



Slika 9.21 – U brak su stupile dve osobe sa polidaktilijom. Dvoje dece je nasledilo polidaktiliju. Treće dete je bez anomalija, znači da su roditelji heterozigoti. Dete pod brojem 3 je rano umrlo (verovatno je bilo homozigotno za mutiran gen)

Neke dominantne mutacije se ne uočavaju u novorođenog deteta, ali će se ispoljiti tokom života. Takav je slučaj sa veoma teškom bolešću, Huntingtonovom horejom. Prvi znaci bolesti se mogu javiti u trećoj deceniji života. Prema savremenom shvatanju, osobe koje su pod rizikom treba da sačekaju starost od 25 do 35 godina, pa tek onda, ukoliko nema znakova bolesti, mogu da se odluče na stvaranje potomstva.

Recesivno nasleđivanje

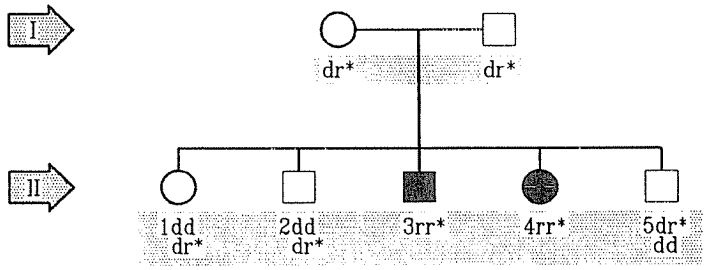
Recesivno svojstvo se javlja samo u fenotipu homozigota. Prema tome, da bi se neka anomalija ili oboljenje koje se prenosi kao autosomno recesivno pojavilo u fenotipu, treba da stupe u brak dva heterozigota za dato recesivno svojstvo. Prema Mendelu, u braku dva heterozigota 25% potomaka biće homozigotno za dati gen (za dato svojstvo). Od 75% potomaka sa normalnim fenotipom 25% su homozigoti, a 50% heterozigoti koji su fenotipski normalni, ali prenose recesivan gen. Kada se uzimaju podaci o propozitusu, obično se ustanovi da još neko od braće i sestara ima isto svojstvo, ali da u prethodnim generacijama i u očevom i majčinom stablu nije bilo afiziranih članova (sl. 9.22).

U nekim slučajevima, homozigot za recesivni gen ne doživi reproduktivni period ili ako doživi, nije sposoban za reprodukciju. Tako se prirodnom selekcijom mutirani geni eliminišu iz populacije. Učestalost heterozigota, a samim tim i homozigota za takav gen je znatno smanjena.

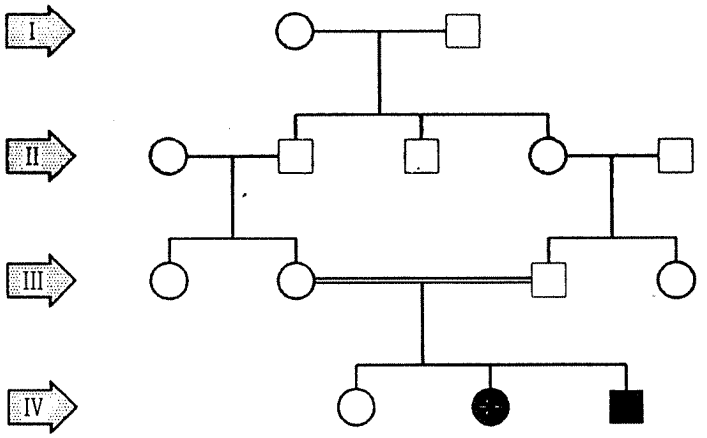
Izuzetno retki mutirani geni (geni za izuzetno retke bolesti ili anomalije) mogu se naći u homozigotnom stanju kod potomaka osoba koje su sklopile brak sa bliskim srodnikom (incest). To je i logično, jer dve osobe koje su potekle od zajedničkog pretka imaju veće šanse da naslede redak mutirani gen (sl. 9.23).

Ukoliko je u pitanju gen koji kontroliše neko benigno svojstvo, njegova učestalost u populacijama može da bude velika, pa se homozigoti jave u nekoliko uzastopnih generacija. U tom slučaju stablo za recesivno nasleđivanje podseća na stablo za dominantno nasleđivanje (sl. 9.24). Takav je slučaj sa recesivnim svojstvom albinizmom u panamskih Indijanaca.

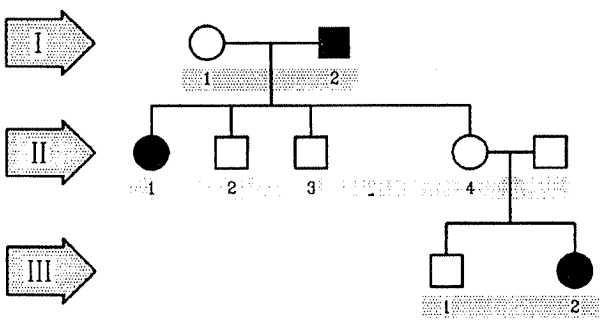
Za mnoga svojstva čoveka još uvek ne postoji definitivno mišljenje o tipu nasleđivanja. Stabla su nepotpuna, broj potomaka mali, podaci često nesigurni. Za istu anomaliju ili bolest nekada se navodi da je autosomno recesivno, ili X-vezano recesivno svojstvo, da je dominantno ili recesivno autosomno svojstvo. Moguće je da isti gen u okviru jednog genoma ima dominantan, a u sklopu drugog genoma recesivan efekat (zbog interakcije gena).



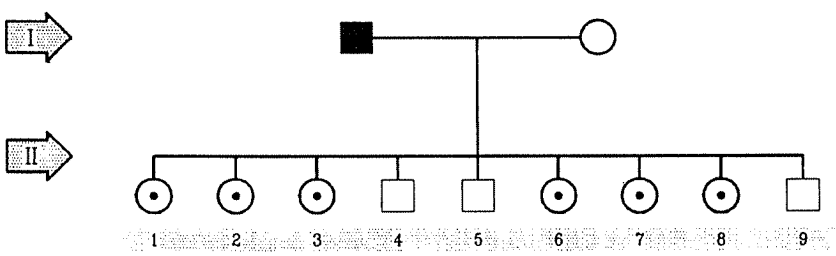
Slika 9.22 – U braku dve fenotipiski normalne osobe rođeno je petoro dece: troje zdrave i dvoje sa fenilketonurijom. Fenotiski normalna deca mogu biti homozigoti ili heterozigoti za normalni (dominantni) gen



Slika 9.23 – Retki recesivni gen će se naći u homozigotnom stanju u dece čiji su roditelji bliski srodnici. Recesivno svojstvo ima horizontalnu distribuciju



Slika 9.24 – Kada je učestalost recesivnog gena u populaciji visoka, genealoško stablo je slično onom za dominantno nasleđivanje



Slika 9.25 – Ako je otac nosilac mutiranog recesovnog gena na X hromozomu (X vezani gen) sve kćeri će biti prenosnici tog gena a sinovi će biti normalni (oni od oca dobijaju Y hromosom).

Nasleđivanje vezano za X-hromosom

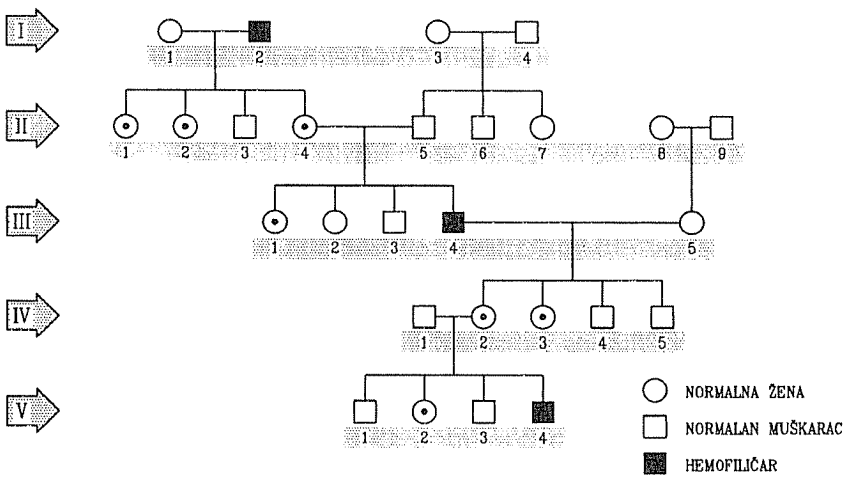
I geni na X-hromosomu mogu da kontrolišu svojstva koja se nasleđuju kao dominantna ili kao recesivna. Znatno je manji broj dominantnih svojstava. Jedan od dominantnih gena je gen za enzim glukozo-6-fosfat--dehidrogenazu (G6PD). Kada su u pitanju X-vezani geni za dominantno nasleđivanje, žene su dva puta češće aficirane od muškaraca (one imaju

dva X-hromosoma). Heterozigotne žene imaju fenotip koji varira od normalnog do aficiranog (zavisno od inaktivacije X). Homozigotna majka daje svoj X-hromosom sa mutacijom svim potomcima, a heterozigotna majka polovini svojih potomaka. Aficirani otac daje X-hromosom samo kćerima. Prema nekim podacima činilo se da se u nekim porodicama gen ipak prenosi sa oca na sinove. Detaljnom analizom takvog stabla je utvrđeno da je i majka bila nosilac gena (heterozigot) i da su sinovi nasledili gene od majke, a ne od oca.

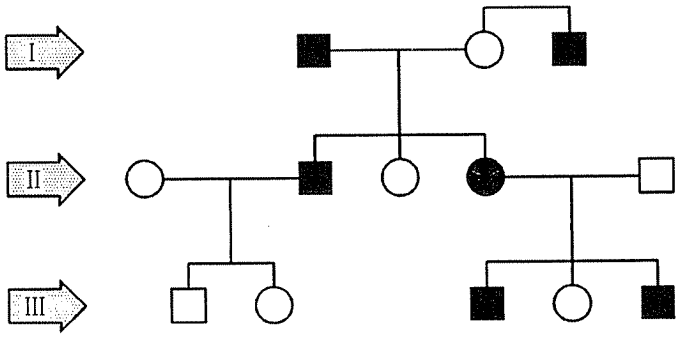
Ako posmatramo jedno stablo u kome su uglavnom aficirani članovi muškog pola, moramo da pretpostavimo da je reč o nasleđivanju vezanom za X-hromosom, i to recesivnom nasleđivanju. Ako je na jednom X-hromosomu žene mutirani recesivni gen (npr., za hemofiliju), na drugom X-hromosomu je njegov normalni, dominantni alel. Prema tome, žena je fenotipski zdrava. Heterozigotna žena predaje mutirani gen jednoj polovini svojih potomaka, i kćerima i sinovima. Ali ako normalna homozigotna žena stupi u brak sa muškarcem obolelim, npr. od hemofilije, sinovi iz takvog braka biće potpuno normalni (sl. 9.26). Sve kćeri će od oca dobiti X-hromosom sa mutiranim genom i biće prenosioci. Otac svojim sinovima daje Y-hromosom, pa prema tome ne može da im prenese gene locirane na X-hromosomu. Muškarci imaju samo jedan X-hromosom i ako je na njemu mutiran gen, on se ispoljava u fenotipu, jer na Y-hromosomu nema normalnog alela (genski sastav X- i Y-hromosoma nije isti) koji bi potisnuo delovanje gena na X-hromosomu. Da bi osoba ženskog pola imala recesivno svojstvo izraženo u fenotipu, na oba X-hromosoma mora da bude mutiran gen (mora da bude homozigot za mutirani, recesivni gen). Drugim rečima, u muškom polu je dovoljna jedna doza gena da bi se svojstvo ispoljilo u fenotipu (hemozigotnost), a u ženskom polu su potrebne dve doze gena (par alela).

Na sl. 9.26. vidimo tipičan primer "criss-cross" nasleđivanja, kada unuci preko majke nasleđuju mutiran gen od dede.

Da bi devojčica bila aficirana, mora i majka da potiče iz porodice sa, recimo, hemofilijom (majka da bude prenosilac) i otac oboleo. Obolele ženske osobe obično se rađaju u porodicama u kojima se sklapaju brakovi u srodstvu (sl. 9.27).



Slika 9.26 – "Cris-cros" nasleđivanje: muši potomci nasleđuju X vezani, recesivni gen od fentiski zdravih majki, prenosilaca

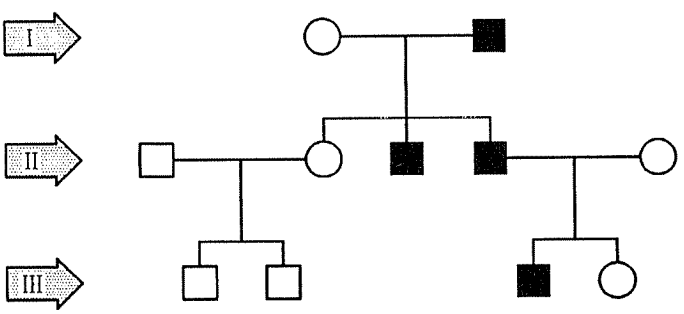


Slika 9.27 – Devojčica je nasledila gen za hemofiliju od aficiranog oca i majke koja potiče iz porodice gde se javlja hemofiija (ujak je bolestan)

Nasleđivanje vezano za Y-hromosom (holandrično nasleđivanje)

Za razliku od X-hromosoma, Y-hromosom ima vrlo malo somatskih gena. Jedan od tih gena je i gen za dlakavost ušiju.

Gen koji se nalazi na Y-hromosomu prenosi se isključivo sa oca na sina. U rodoslovnom stablu sve osobe muškog pola bile bi sa datim svojstvom (sl. 9.28).



Slika 9.28 – Holandrično nasleđivanje. Genje na Y hromozomu i svi muškarci u porodici su aficirani

10

Genetičko savetovanje i prevencija naslednih oboljenja

Genetičko savetovanje je postalo najznačajnija oblast humane genetike. Genetičko savetovanje obuhvata: a) postavljanje pravilne dijagnoze, b) procenu prognoze i vrednosti bilo kojeg od mogućih oblika lečenja i c) utvrđivanje rizika ponovnog javljanja nasledne bolesti i poremećaja u porodici.

Genetičko savetovanje podrazumeva i svestranu pomoć porodici u razumevanju genetičkih implikacija, kao i iznalaženje različitih mogućnosti da se posledice ublaže.

Kada su u pitanju monogenski autosomno dominantni i recesivni poremećaji koji se nasleđuju na jasan mendelski način, kao i kada je oboljenje vezano za X-hromosom, rizik ponovnog javljanja bolesti u porodici se lako izračunava. Druga grupa su tzv. multifaktorski poremećaji a to su mnoge česte bolesti u humanim populacijama u čijoj etiologiji nasleđe ima značajnu ulogu, ali se te bolesti ne nasleđuju po Mendelovim pravilima. Rizik njihovog ponovnog javljanja u porodici se procenjuje na osnovu posmatranja učestalosti bolesti u srodnika probanada (empirijski rizik).

U sklopu genetičkog savetovanja su i brakovi između srodnika, koji imaju određen nivo zajedničkih gena, jer imaju zajedničke pretke. Što je stepen srodstva viši, postoji veća verovàtnoća uspostavljanja homozigotnog stanja za štetne recesivne gene (videti poglavlje "Genetika populacije").

Prenatalna dijagnoza naslednih oboljenja

Za roditelje sa rizikom rađanje deteta sa anomalijama ili nekom naslednom bolešću mogućnost prenatalne dijagnoze i selektivnog pobačaja oštećenog ploda predstavlja danas značajno dostignuće. Jedna od široko primenjivanih metoda prenatalne dijagnoze u svetu i u našoj zemlji jeste amniocenteza. Ovim postupkom se dobijaju ćelije plodove vode, koje se mogu kultivisati i koristiti za analizu hromosoma ploda.

Optimalno vreme za amniocentezu je oko 16. nedelje trudnoće. Ćelije plodove vode (amnionske tečnosti) odgajaju se i umnožavaju in vitro na određenoj hranljivoj podlozi i posle određenog vremena uzimaju za analizu hromosoma.

Nekultivisane ćelije plodove vode se ispituju u cilju određivanja pola fetusa, putem analize X- i Y-hromatina. Ovaj metod je posebno značajan kad su posredi majke sa rizikom rađanja muškog deteta sa ozbiljnom bolešću vezanom za X hromosom. Da bi određivanje pola bilo

sigurnije, obično se ispituje i kariotip fetusa.

Druga metoda za prenatalno postavljanje dijagnoze hromosomopatija, koja se sve više koristi u citogenetičkim laboratorijama, jeste ispitivanje horionskih resica. Ova metoda se primenjuje ranije, u prvom tromesečju trudnoće, i zato ima izvesne prednosti u odnosu na amniocentezu, jer stvara manje traume kod trudnica, zato što je period čekanja na rezultat kraći i trudnica se može odlučiti da blagovremeno prekine trudnoću.

Obe ove metode zahtevaju prethodnu primenu ultrazvuka za određivanje: tačnog vremena trudnoće, položaja placente, isključivanja blizanačke trudnoće ili smrti ploda.

Kultivisane ćelije plodove vode se koriste i za otkrivanje oko 60 urođenih biohemijskih poremećaja. Ispitivanjem nivoa alfa fetoproteina u amnionskoj tečnosti mogu se u ranoj trudnoći otkriti poremećaji nervne cevi, anencefalija i spina bifida.

Za otkrivanje anomalija centralnog nervnog sistema koristi se i ultrazvuk, kao i za anomalije drugih organskih sistema.

Neke nasledne bolesti se mogu otkrivati sistematskim traganjem (screening) kod novorođene dece. Prvi put je sistematsko traganje primenjeno za otkrivanje fenilketonurije. Sistematsko traganje je značajno i za otkrivanje prekliničkih slučajeva i osoba genetički predisponiranih za određene bolesti. Ovaj postupak omogućuje primenu odgovarajuće terapije pre pojave simptoma bolesti.

Otkrivanje nosilaca recesivnih štetnih gena u humanim populacijama ima izuzetan značaj zbog visokog rizika ovih osoba da štetni gen prenesu na potomstvo. Heterozigoti za neka patološka svojstva su relativno česti u humanim populacijama. Nekada se ovi heterozigotni nosioci mogu lako prepoznati, kao, npr., u slučaju nedostatka u krvi enzima katalaze, dok se za neka oboljenja može identifikovati samo deo nosilaca, kao u slučaju fenilketonurije, hemofilije i dr. Postoje, međutim, i takvi genetički poremećaji za koje još uvek nisu pronađene metode za otkrivanje nosilaca mutiranog štetnog gena.

Danas se sve više koristi DNK tehnologija za postavljane dijagnoze i prevenciju naslednih bolesti.

Izolacija specifičnih sekvenci DNK i njihovo kloniranje su neophodni uslovi za dijagnostikovanje naslednih poremećaja.

Postoji nekoliko pristupa za dobijanje specifičnih sekvenci DNK koje su označene kao genske probe iz složene mešavine DNK sekvenci. Genske probe su komplementarne genu koji ispitujemo.

1) cDNK kloniranje, 2) kloniranje genomne DNK, 3) formiranje oligonukleotidnih proba.

cDNK se dobija kada se na iRNK izolovanoj iz određenog tkiva uz pomoć reverzne transkirptaze sintetiše komplementaran lanac DNK. Ova cDNK se može ugraditi u vektor, plazmid ili virus, i umnožavati u bakterijskoj ćeliji.

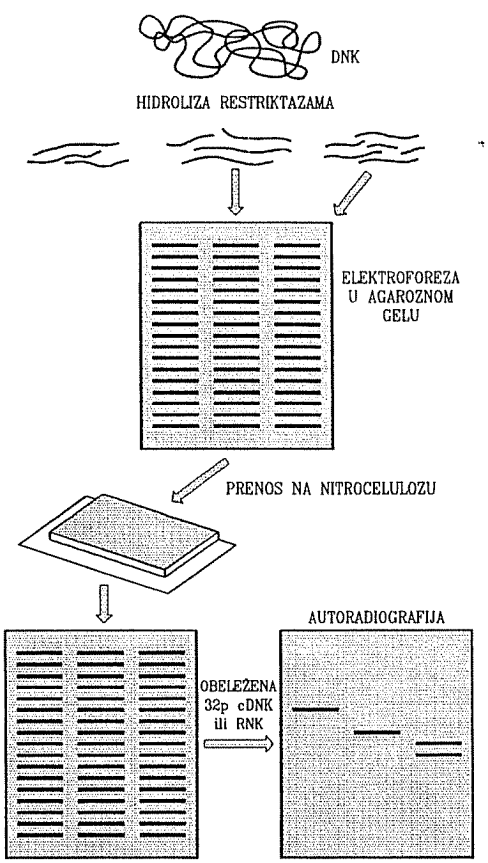
Genomna DNK se ekstrahuje iz jedra ćelija i dejstvom restrikcionih enzima se seče u fragmente različite dužine, koji se ugrađuju obično u viralni vektor. Rekombinovanim virusima se inficira bakterija i posle umnožavanja virusa vrši se odabiranje (screening) odgovarajućih kloniranih sekvenci (genskih proba).

Ranije je naglašeno da se kulture bakterija koje sadrže klonirane sekvence DNK nazivaju bibliotekama gena.

Ako se zna redosled aminokiselina u proteinskom produktu određenog gena, mogu se formirati delovi veštačkog gena, koji takođe služe kao probe za identifikaciju gena (oligonukleotidne probe).

DNK dijagnoza

Izvori DNK za analizu su jedra limfocita periferne krvi, kultivisani fibroblasti kože, ćelije plodove vode i horionske resice. Ekstrahovana DNK iz ovih ćelija se seče u fragmente odgovarajućim rekstrikcionim enzimom. Fragmenti DNK iz bilo kog izvora mogu biti razdvojeni na osnovu dužine putem elektroforeze u agaroznom gelu i daljim postupkom denaturacije i hibridizacije sa odgovarajućom radioaktivno obeleženom probom može se utvrditi genetički poremećaj u njima (sl. 10.1). Ovaj postupak je označen kao Southern blot tehnika, prema autoru koji ju je pronašao. Nasledne bolesti se mogu otkrivati direktno ili indirektno, DNK tehnologijom.



Slika 10.1

Ako u okviru jednog gena postoji mutacija u obliku delecije ili insercije, to može smanjiti ili povećati razmak između restrikcionih mesta za odgovarajući restrikcioni enzim. Isecanjem DNK tim enzimom i hibridizacijom fragmenata sa odgovarajućom obeleženom probom može se, autoradiografijom, uočiti kraći ili duži fragment u odnosu na dužinu fragmenta kod osoba koje nemaju datu mutaciju gena. Na primer, osobe homozigoti, koje imaju normalne gene za beta globin, hibridizacijom sa probom, daju na autoradiografiji jednu traku koja pokazuje fragment od 5,2 Kb, nastao isecanjem jednom restriktazom. Osobe homozigoti za mutirane gene će takođe imati jednu traku, koja otkriva kraći fragment od 4,6 Kb, što je posledica delecije u genu. Heterozigoti će pokazivati dve trake koje označavaju oba fragmenta od 5,2 Kb do 4,6 Kb.

Na ovaj način, analizom dužine restrikcionih fragmenata može se sprovesti prenatalna dijagnoza fetusa pod sumnjom za dato oboljenje.

Promena restrikcionog mesta može nastupiti i usled pojave tačkaste mutacije u okviru jednog gena. Analizom dužine restrikcionih fragmenata može se otkriti ova mutacija.

Ako je poznata tačkasta mutacija gena koja prouzrokuje određeno oboljenje, može se i primenom hibridizacije sa oligonukleotidnim probama za normalan i mutiran gen dokazati da li jedna osoba ili fetus ima ili nema datu mutaciju u genomu.

Monogenski poremećaji se mogu otkrivati i indirektno. Sada se zna da su u nekodirajućim regionima genoma, unutar samog gena i u njegovim susednim sekvencama prisutne tačkaste mutacije, koje nemaju fenotipsku ekspresiju. Ove mutacije, međutim, mogu da menjaju broj restrikcionih mesta, što rezultira promenom dužine restrikcionih fragmenata.

Ovo je normalna pojava, i označena je kako je navedeno, kao polimorfizam restrikcionih fragmenata. Ukoliko se polimorfno mesto nađe u blizini mutiranog gena, nasleđuje se zajedno sa mutiranim genom i može poslužiti kao koristan genetički marker u porodicama za otkrivanje članova porodice i fetusa pod sumnjom da su nosioci date mutacije.

Primena DNK analiza, direktna i indirektna, do sada je već omogućila prenatalnu i presimptomatsku dijagnozu niza naslednih oboljenja, kao i otkrivanje heterozigotnih nosilaca mutiranog gena. Sigurno je da će dalja ispitivanja na nivou DNK omogućiti da znatno veći broj naslednih poremećaja bude dostupan analizi, naročito u fetalnom periodu, što će biti veliki doprinos prevenciji naslednih oboljenja.

Može se očekivati da će u budućnosti DNK tehnologija biti primenjena i u lečenju naslednih bolesti zamenom mutiranih gena normalnim genima (genoterapija).

Indikacije za prenatalnu dijagnozu hromosomopatija i genopatija su:

1. Starost majke: trudnice starije od 35 godina imaju povećan rizik za rađanje deteta sa trisomijom hromosoma 21 i drugim vijabilnim trisomijama.
2. Dete – fetus iz prethodne trudnoće sa hromosomskom anomalijom
3. Jedan roditelj nosilac balansirane hromosomske aberacije (translokacije, inverzije)
4. Poremećaji vezani za X-hromosom
5. Marker X-sindrom: mentalna retardacija uslovljena fragilnim X-hromosomom
6. Hemoglobinopatije
7. Urođene greške metabolizma
8. Hemofilija A i druge nasledne bolesti
9. Poremećaji razvoja nervne cevi

11

Genetička kontrola, determinacije i diferencijacije embrionalnih ćelija

BIOLOGIJA RAZVIĆA

Biologija razvića je disciplina koja proučava morfološke i funkcionalne osobine najranijih stupnjeva individualnog razvića organizama. Individualno razviće, ***ontogeneza,*** počinje stvaranjem oplođene jajne ćelije, zigota, a završava se smrću jedinke. Može da se podeli na ***prenatalni*** period, koji obuhvata složene, uzajamno povezane morfološko-fiziološke promene od stvaranja zigota do izlaza jedinke iz jajnih opni ili ekstraembrionalnih zavoja, ***rođenje,*** i ***postnatalni period*** sa nizom promena od rođenja, rastenja, polnog sazrevanja, do starenja i smrti. Zbog svoje izuzetnosti, period neposredno pre i posle rođenja označen je kao ***perinatalni period.***

Nauka koja proučava najranije stupnjeve individualnog razvića naziva se ***embriologija.*** Kao i druge nauke, i embriologija je prolazila kroz različite razvojne periode: deskriptivan, komparativan, eksperimentalan. Veliki broj podataka klasičnih grana embriologije koristi i savremena biologija razvića, ali se težište istraživanja prenosi na molekularna zbivanja u samoj ćeliji. Primenom molekularnobioloških, genetičkih, citohemijskih, histohemijskih i drugih metoda treba da se objasni kako od jedne jedine ćelije, zigota, nastaju milijarde ćelija novog organizma i stotine tipova različitih, diferenciranih ćelija. Centralni problem savremene biologije razvića je otkrivanje mehanizma odnosno mehanizama osnovnih bioloških procesa celularne ***determinacije*** i ***diferencijacije.***

Za studente medicine razumevanje ovih procesa posebno je značajno jer kongenitalni poremećaji forme i funkcije predstavljaju jedan od najznačajnijih problema savremene medicine. Da bi se shvatili razlozi nastajanja grešaka u razvoju, neophodno je da se poznaju procesi normalnog razvića.

Osim toga, ima podataka da je i maligna transformacija ćelija posledica poremećaja diferencijacije, što čini ovaj fenomen još značajnijim za biomedicinu.

Zigot nastaje, kako je rečeno oplođenjem, odnosno spajanjem jajne ćelije i spermatozoida roditelja.

Brazdanjem, segmentacijom, jednoćelijski zigot se razvija u višećelijski embrion sastavljen od embrionalnih ćelija – blastomera. Zigot se deli na 2, 4, 8, 16 itd. ***blastomera.*** Učestalost deoba opada tek pošto se formiraju milioni ćelija. Kod odraslih organizama, između svake mitotičke deobe nastupa period rasta ćelija ćerki, u toku koga se one razvijaju do veličine ćelije majke; u toku segmenta-

cije, međutim, ne zapaža se period rasta blastomera i zato su blastomere posle svake deobe sve manjih dimenzija. U toku segmentacije menja se zapreminski odnos između citoplazme i jedra. Veličina jedra ostaje skoro ista kao i na početku brazdanja, jer se u jedrima novonastalih blastomera održava stalnom količina nukleoplazme. Treba naglasiti da se u toku brazdanja vrši intenzivna sinteza genetskog materijala i da se sa svakom novom deobom povećava ukupna količina DNK molekula embriona. U toku segmentacije u većine kičmenjaka se vrši složena transformacija rezervnih hranljivih materija, koje se lagano troše. Bez obzira na vrlo različite tipove jajnih ćelija i tipove brazdanja, osnovni stadijumi embrionalnog razvića su zajednički za sve višećelijske životinje.

Morula

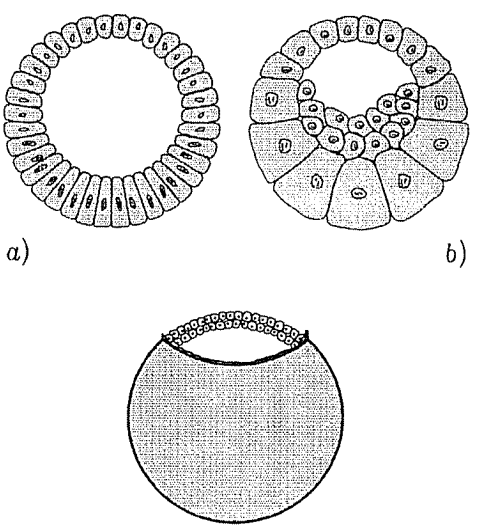
U toku brazdanja umnožavanjem blastomera formira se višećelijska struktura – morula. Morula oligolecitnih jaja (jaja sa malom količinom vitelusa) loptastog je oblika, bez međuprostora između blastomera, podseća na plod duda, zbog čega je ovaj stadijum embrionalnog razvića i nazvan morula (lat. morus – dud). Morula mezolecitnih jaja sličnog je oblika ali je sastavljena od mikromera i makromera. Morula polilecitnih jaja ptica, gmizavaca i riba ima oblik diska, razvučenog preko vitelusa, tako da se jasno razlikuje od prethodno opisanih oblika morule.

Blastula

Stadijum morule je kratkotrajan stupanj u razviću. Istovremeno sa daljim deobama blastomera ćelije iz centralnog dela morule se razmiču prema periferiji embriona, tako da od kompaktne morule nastaje loptasta blastula sa centralnom dupljom blastocelom, ispunjenom tečnošću. Ograničen slojem blastomera, ***blastodermom,*** blastocel se progresivno povećava. Ovakva vrsta blastule javlja se kod oligolecitnih jaja, a naziva se ***celoblastula.*** Blastoderm mezolecitnih jaja sastavljen je od mikromera na animalnom polu embriona i makromera na vegetativnom polu. Blastocel je usled toga ekscentričan, pomeren ka animalnom polu ***(amfiblastula).*** Blastula polilecitnih jaja teloblastičkog tipa je u obliku diska, koji leži na vitelusu, od koga je odeljen malim pukotinastim blastocelom. Naziva se ***diskoblastula*** (sl. 11.1).

Gastrula

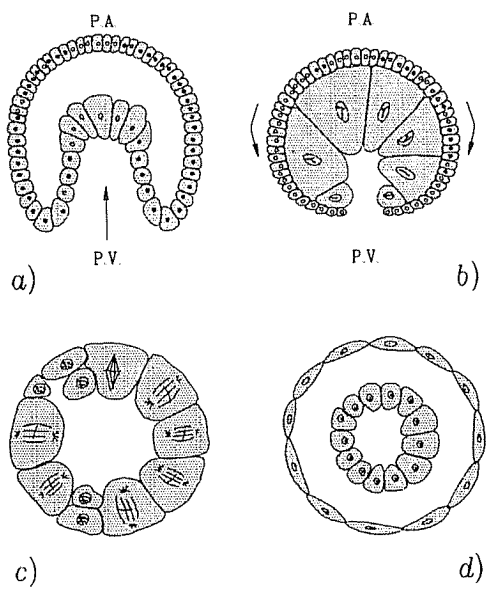
Gastrula je embrionalni stadijum u kome se, složenim transformacijama i intenzivnim pokretanjima ćelijskih masa, od nediferenciranog blastoderma formiraju klicini listovi, od kojih će se u daljem razviću formirati organi embriona. U zavisnosti od načina pokretanja ćelijskih masa, gastrula nastaje na nekoliko načina: invaginacijom, migracijom, delaminacijom i epibilijom.



Slika 11.1 – Različiti tipovi blastula: celoblastula, a; amfiblastula, b; diskoblastula c;

Gastrula oligolecitnih jaja (bodljokošci, amfioksus) invaginaciona je: blastoderm vegatativnog pola se aktivno uvlači, invaginiše u blastocel, tako da od jednoslojne loptaste blastule nastaje dvoslojna, peharasta gastrula. Spoljašnji sloj ćelija čini *ektoderm,* a unutrašnji sloj, koji se invaginisao, jeste *endoderm.* Ektoderm i endoderm su *primarni klicini listovi,* koji se razlikuju po položaju koji zauzimaju i po sposobnostima da u toku daljeg razvića učestvuju u obrazovanju određenih tkiva i organa. Gastrulacija je najvažniji moment u toku celokupnog embrionalnog razvića jer u ovoj fazi počinje odvajanje potencijalno različitih grupa ćelija (sl. 11.2).

Invaginisanjem vegetativnog pola obrazuje se nova duplja, *gastrocel,* ili *arhenteron,* a istovremeno dolazi do smanjivanja blastocela. Otvor preko koga gastrocel komunicira sa spoljašnjom sredinom naziva se *blastoporus* a u daljem razviću blastoporus će formirati usni ili



Slika 11.2 – Obrazovanje primarnih klicinih listova, ektoderma i endoderma tokom različitih tipova gastrulacije: invaginacija, a; epibolija, b; delaminacija, c; d;

analni otvor embriona. Prstenastog oblika, blastoporus ima četiri zone, četiri usne blastoporusa: dorzalnu, ventralnu i dve lateralne usne.

Ukoliko primarni klicini listovi nastaju migracijom pojedinih ćelija blastoderma, formira se tzv. imigraciona gastrula.

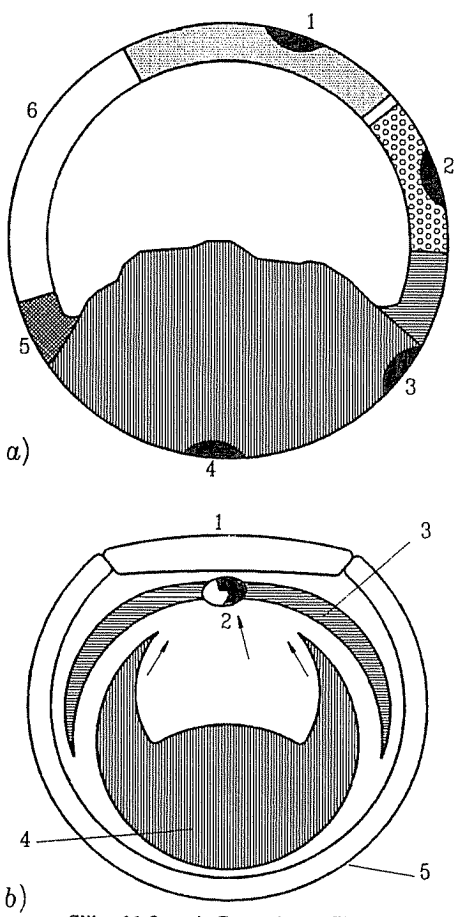
Delaminaciona gastrula nastaje tangencionalnim deobama ćelija blastoderma, čime se obrazuje dvoslojna gastrula, sastavljena od površinskog sloja, ektoderma, i unutrašnjeg sloja, endoderma.

Gastrulacija može da bude i kombinovana, kakva je, npr., kod mezo ecitnih jaja amfiba. Amfiblastula mezolecitnih jaja ima vegetativni pol, sa krupnim makromerama punim vitelusa, i animalni pol, sa sitnijim blastomerama, mikromerama, ispunjenim svetlijom citoplazmom. Na granici između animalnog i vegetativnog pola nalazi se zona sivog srpa sa ćelijama bogatim nukleinskim kiselinama (sl. 11.3a).

Gastrulacija počinje pukotinastom invaginacijoom u graničnom delu makromera i sivog srpa. Invaginacija se postepeno povećava i obrazuje potkovičasti gastrocel. Za to vreme mikromere se intenzivno dele i prerastaju vegetativni pol. Krov arhenterona čine ćelije sivog srpa (hordomezodermalne ćelije) a pod makromere. Iznad krova arhenterona je ektoderm buduće nervne ploče, odnosno nervne cevi (sl. 11.3b).

Diskoblastula telolecitnih jaja ima takođe kombinovanu gastrulaciju delaminaciono-migracionog tipa.

Prva faza gastrulacije, kojom se završava embrionalno razviće svih diploblastičnih životinja, karakteriše se formiranjem primarnih klicinih listova, ektoderma i endoderma. U drugoj fazi gastrulacije, kod triploblastičnih životinja, formira se treći klicin list – *mezoderm,* koji se postavlja između primarnih klicinih listova (sl. 11.3b). Mezoderm se



Slika 11.3 – a) Gastrula amfiba sa determinisanim predelom buduće nervne cevi. b) 1. nervna ploča, 2. horda, 3. mezoderm, 4. arhenteron, 5. epidermis

različito formira kod različitih vrsta triplobastika, mada se u osnovi, prema poreklu i načinu postanka, mogu razlikovati dva osnovna tipa mezoderma: enterocelni i teloblastički.

Enterocelni mezoderm, karakterističan za Enterocelomate, u koje se ubrajaju i kičmenjaci, nastaje evaginacijom zida primarnog creva, arhenterona. Ćelije budućeg mezoderma odvajaju se u obliku šupljih mešhova (amfioksus) ili kompaktivnih ćelijskih masa (amfibi) od lateralnog dela primarnog creva i formiraju mezoderm.

Teloblastički mezoderm je karakterističan za sve ostale triploblastike. Izvesne ćelije (inicijalne ćelije, teloblaste), koje se nalaze u gastruli na ivičnoj zoni ektoderma i endoderma, migriraju i ulaze u blastocel, dele se i stvaraju mezoderm.

Derivati klicinih listova

Nakon stvaranja klicinih listova embrionalni razvoj ulazi u fazu *specijalizacije*. U toku normalnog razvoja svaki klicin list predstavlja osnovu određenih budućih organa embriona. Analizom procesa *organogeneze* precizno je određeno od kog je klicinog lista nastalo određeno tkivo ili organ (tab. 11.1).

Embrionalno razviće sisara

Embrionalno razviće sisara se po mnogim karakteristikama razlikuje od embrionalnog razvića ostalih kičmenjaka, prvenstveno zbog toga što se odvija u uterusu majke. Do pre tridesetak godina malo se znalo o najranijim fazama razvića sisara: gametogenezi, oplođenju, implantaciji i stvaranju posteljice. Zahvaljujući novim metodama istraživanja, prvenstveno usavršavanju tehnika kultivacije in vitro, embriologija sisara postaje područje na kome se intenzivno radi u brojnim laboratorijama sveta.

Dosadašnja otkrića se koriste u lečenju steriliteta, omogućeno je veštačko oplođenje, vantelesno oplođenje, uspešno se vrši prenatalna dijagnoza različitih genetičkih grešaka ploda itd.

Sisari vode poreklo od gmizavaca, čija su jaja bogata vitelusom pa i najprimitivniji sisari, Monotremata, imaju krupna jaja bogata hranljivim materijama.

Sa prelaskom na viviparnost, jajne ćelije viših sisara, Euteria, gube vitelus i postaju alecitna ili oligolecitna jaja. Ovakve jajne ćelije se brazdaju totalno- ekvalno. Ali, pošto sisari vode poreklo od gmizavaca, već na stadijumu blastule

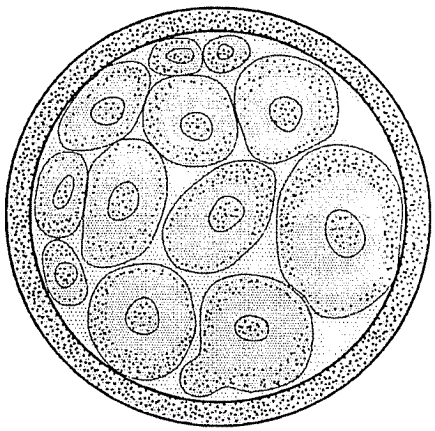
Tabela 11.1

EMBRION	PRIMEDBA	DIFERENCIRANE ĆELIJE I TKIVA
EKTODERM		
EPIDERMIS EMBRIONA		Koža-epitel i derivati: dlaka, folikul dlake, znojne, lojne, mlečne žlezde, sočivo oka, adenohipofiza, proktodeum, stomodeum
NERVNA PLOČA, NERVNA CEV		CNS, mozak i kičmena moždina, neurohipofiza
ĆELIJE NERVNOG GREBENA	Ove ćelije migriraju u različite delove embriona	Senzorne i autonomne ganglije, srž nadbubrežnih žlezda, pigmentne ćelije
EMBRIONALNI ZAVOJI	Zid horiona i amniona; placenta	
MEZODERM		
HORDA	Samo se povremeno javlja u embriogenezi kičmenjaka	
SOMITI	Dorzalno, segmentirani; od lateralnog mezoderma, nastaju zidovi celoma	Dermis (krzno) kože, mišići, vezivno tkivo, skelet, srce, krvni sudovi, krvne ćelije, urogenitalni sistem, masne ćelije, kora nadbubrežnih žlezda, gonade
MEZENHIM, RASTRESITO EMBRIONALNO VEZIVNO TKIVO	Pokretne ćelije koje obrazuju mezodermska tkiva; sa ektodermom i endodermom obrazuju organe	
EMBRIONALNI ZAVOJI	Ekstraembrionalni mezoderm amniona, alantoisa i žumančane kese; placenta	
ENDODERM		
ARHENTERON, PRIMITIVNO CREVO	Sa mezenhimom obrazuju organe	Srednje crevo, pljuvačne žlezde, pankreas, jetra, pluća, timus, tiroideja, paratireoideja, primordijalne germinativne ćelija
EMBRIONALNI ZAVOJI	Zid alantoisa i žumančane kese	

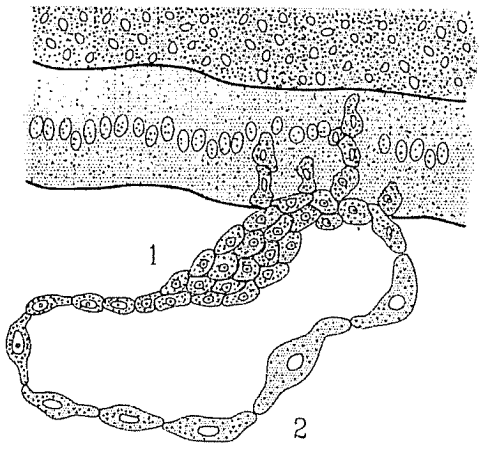
(blastocist) začetak embriona ima oblik diska pa je dalje razviće po tipu parcijalnog-diskoidalnog, odnosno u skladu sa evolutivnim poreklom sisara.

Mada je razviće raznovrsno u različitih sisara, ipak može da se ustanovi jedna zajednička shema razvića.

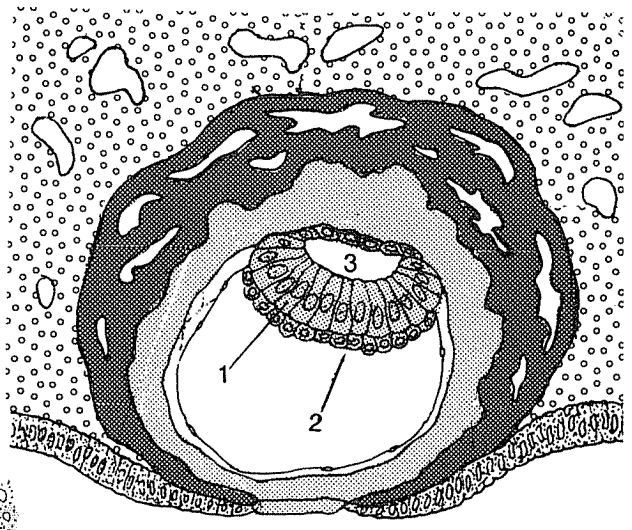
Jajna ćelija sisara sazreva tek po ulasku spermatozoida (završava drugu deobu sazrevanja). Oplođenje se vrši u početnom delu jajovoda a zigot kroz jajovod odlazi prema uterusu. Nekoliko sati po oplođenju počinje brazdanje i obrazuje se tipična morula (sl. 11.4), a zatim vrlo specifična blastula, blastocist. U blastocistu se uočavaju ćelije embrioblasta i ćelije koje ograničavaju blastocel, ćelije trofoblasta. Trofoblast će u daljoj embriogenezi učestvovati u formiranju posteljice (sl. 11.5).



Slika 11.4 – Morula sisara.



Slika 11.5 – Blastocist



Slika 11.6 – Humani blastocist sa diferenciranim epiblastom (1), hipoblastom (2). Iznad dvoslojnog embrionalnog diska uočava se amnion (3). Embrion je star oko 9 dana.

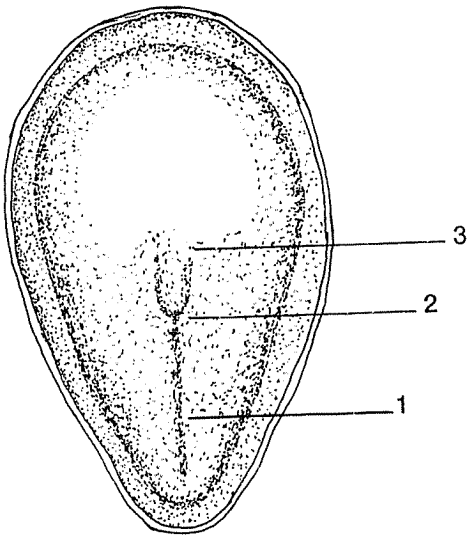
Embrioblast predstavlja pločastu tvorevinu sa ***epiblastom*** na dorzalnoj i ***hipoblastom*** na ventralnoj strani (sl. 11.6). Osnovni procesi rane embriogeneze su diferenciranje ovih embrionalnih začetaka u klicine listove: ektoderm, endoderm i mezoderm.

Intenzivnim umnožavanjem ćelija u zadnjem delu embrionalne ploče obrazuje se zadebljanje koje se širi od zadnjeg ka prednjem delu embriona i koje se naziva ***primitivna traka.*** Preko primitivne trake ćelije migriraju pod epiblast i obrazuju ***mezoblast.*** Usled toga se celom dužinom primitivne trake stvara udubljenje, ***primitivna brazda.*** Primitivna traka se smatra veoma razvučenim blastoporusom.

Migracija ćelija je najintenzivnija u krajnjem, cefaličnom delu trake, vrši se lateralno i prema napred, pa se tu javlja udubljenje, ***Henzenov čvor.*** Ispred Henzenovog čvora se obrazuje glaveni produžetak (sl. 11.7). Na poprečnom preseku glavenog produžetka uočavaju se sva tri klicina lista (sl. 11.8).

U procesu gastrulacije sukcesivno se smenjuju programirana deoba ćelija, kretanje ćelija, agregacija ćelija i stvaranje klicinih listova i, najzad, diferencijacija svakog klicinog lista u određena tkiva i organe. Strukture, obrazovane u jednom stadijumu razvića, uslovljavaju nastanak struktura sledeće razvojne faze.

Kao što je već rečeno, svaki klicin list predstavlja osnovu određenih organa embriona. Diferencijacija organa se odvija u širim predelima, poljima budućih organa. Tako se, npr., u ektodermu prvo odvaja deo koji će dati epidermis i deo koji daje



Slika 11.7 – Embrionalni disk posmatran sa dorzalne strane. U zadnjem/kaudalnom delu, zapaža se primitivna brazda (1) koja se završava Henzenovim čvorom (2). Ispred njega je glaveni produžetak (3)

nervnu ploču. Zatim se unutar polja izdvajaju očne, ušne ili nosne plakode, polja ekstremiteta i dr.

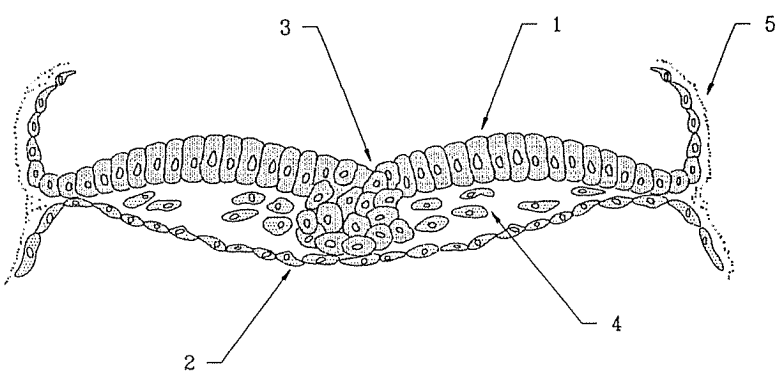
Endoderm primarno obrazuje arhenteron (pracrevo), zatim se javljaju pupoljci respiratornih organa, jetre, pankreasa i dr. Na dorzalnoj strani embriona, od glavenog ka repnom delu, grupe mezodermalnih ćelija obrazuju segmentisane *somite* a unutar somita se diferenciraju ćelije dermisa, budućeg skeleta i mišića. Lateralni mezoderm učestvuje u stvaranju pleura i unutrašnjih organa (tabela 11.1).

Embrionalni zavoji sisara

Embrionalni zavoji sisara, fetalne membrane, nastaju vrlo rano jer se vitalni procesi ploda – ishrana, disanje i eliminacija štetnih materija – vrše preko krvotoka majke.

Već na stadijumu blastocista uočavaju se ćelije *trofoblasta.* Trofoblast se diferencira na unutrašnji, celularni deo citotrofoblast, i spoljašnji, u kome nema granica među ćelijama, sinciciotrofoblast. U citoplazmi sinciciotrofoblasta nalaze se litički enzimi koji razgrađaju zid uterusa i omogućavaju implantaciju ploda.

U periodu gastrulacije, kada se diferencira embrionalni mezoderm, izdvajaju se ćelije koje oblažu citotrofoblast i obrazuju ekstraembrionalni, parijetalni mezoderm. Sa trofoblastom, ovaj mezoderm čini *horion.* Horion daje brojne evaginacije, *horionske resice,* koje, u različitih redova sisara, prodiru do različitih slojeva uterusa; u evoluciono starijih sisara samo naležu na epitel uterusa, a u evolutivno mlađih redova ulaze u mezoderm ili prodiru do krvnih sudova materice. Horionske resice ploda čoveka



Slika 11.8 – Poprečni presek embriona (16 dana star). Osim ektobalasta (1) i endoblasta (2) vide se ćelije koje, preko primitivne brazde (3) migriraju i obrazuju mezoblast (4). Od ektoblasta se obrazuje nabor amniona (5).

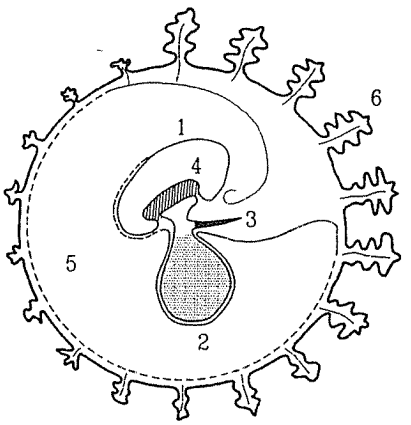
su utopljene u prostore ispunjene krvlju majke. Između krvotoka resica i krvotoka majke u normalnim uslovima uvek postoji, u različitih sisara manje ili više izražena, *opna placente,* tako da se krv ploda i majke nikada ne mešaju.

I raspored resica je različit: difuzan, u vidu kotiledona, pojaseva diska itd. Epitel resica i deo mezoderma potiču od horiona ali uskoro u njih prodire i mezoderm alantoisa (visceralni ekstraembrionalni mezoderm).

Amnion je embrionalni zavoj koji se obrazuju vrlo rano oko 12-14. dana embriogeneze čoveka, sa dorzalne strane embriona, u različitih sisara na različite načine, ali najčešće nabiranjem ili kavitacijom. Amnion se ispuni tečnošću (plodova voda) i štiti embrion od isušivanja, mehaničkih povreda i dr. U sastav zida amniona ulaze ektoderm sa unutrašnje strane i mezoderm sa spoljašnje strane pa po inverznom rasporedu klicinih listova odgovara amnionu ptica i reptila.

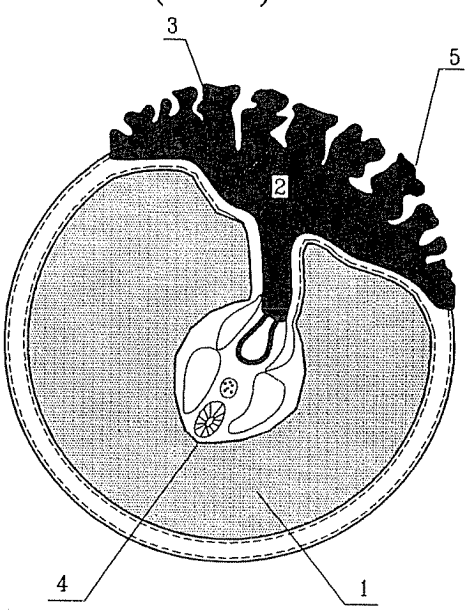
Vitelusna (žumančana) kesa nastaje evaginacijom endoderma, u isto vreme kad i amnion. Uskoro, ekstraembrionalni mezoderm prekriva endoderm. Kako u sisara vitelusana kesa gubi trofičku ulogu, ona se redukuje. Smatralo se da je vitelusna kesa samo atavistička tvorevina i dokaz da su jajne ćelije sisara evoluirale od telolecitnih jaja reptila. Danas se zna da se u mezodermu žumančane kese diferenciraju prvi elementi krvi a u endodermu, primarni gonociti. Drška redukcirane žumančane kese ulazi u pupčanu vrpcu.

Alantois takođe nastaje od splanhnopleure (endoderm i visceralni list mezoderma). U čoveka se rano razvija, već oko 21. dana embriogeneze. Dok endodermalna komponenta ovog embrionalnog zavoja atrofira, mezodermalni deo se širi i zalazi u horionske resice (alantohorion). U mezodermu resica, kao što je već rečeno, razvijaju se krvni sudovi preko kojih se uspostavlja veza između krvotoka majke i ploda (sl. 11.9).



Slika 11.9 – Embrion čoveka od tri nedelje. Amnion (1), žumančana kesa (2), mezodermalni deo alantoisa (3), embrion (4), ekstraembrionalni celom (5), horionske resice (6).

Horionske resice sa zidom uterusa obrazuju složen organ, ***placentu.*** Deo placente koji čine tkiva ploda naziva se ***pars fetalis*** a deo koji nastaje od tkiva majke ***pars materna*** (sl. 11.10).



Slika 11.10 – Stariji embrion čoveka: amnion (1), ostatak žumančane kese (2), mezoderm alantoisa (3), embrion (4), placenta (5).

Krv iz posteljice odlazi u embrion preko pupčane vene a vraća se u placentu preko pupčanih arterija. Osim ovih krvnih sudova i drške žumančane kese, u pupčanoj vrpci se nalazi i drška alantoisa.

Determinacija i diferencijacija embrionalnih ćelija

Život svake višećelijske jedinke, kao što je rečeno, počinje jednom jedinom, oplođenom jajnom ćelijom, zigotom. Zigot predstavlja novu, jedinstvenu kombinaciju gena roditelja, tako da ne postoje dve jedinke koje bi imale istovetan genom (izuzetak su jednojajni blizanci).

U genomu zigota je upisan razvojni plan novog organizma koji treba da se realizuje tokom embrionalnog i fetalnog perioda života.

I humani embrion se razvija iz zigota dugim i složenim procesima, od kojih su najznačajniji *proliferacija ćelija* (rast), *diferencijacija ćelija* i oblikovanje nove jedinke, *morfogeneze.* Morfogeneza je uslovljena rastom i diferencijacijom.

Centralni problem biologije razvića je pitanje: kako od jedne ćelije, zigota, nastaje složeni organizam od nekoliko milijardi ćelija? Kako te ćelije postaju specifične po formi i funkciji? Kako se raspoređuju u određene delove novog organizma? Kako se organizuju u tkiva i organe?

Sve ćelije nastaju od zigota, zigot je *totipotentan.* Sa svakom novom deobom potencije blastomera se ograničavaju *(pluripotentnost, multipotentnost)* da bi se, ranije ili kasnije, zavisno od vrste kojoj pripada embrion, definitivno svele na jedan jedini razvojni put: embrionalne ćelije postaju *unipotentne.* Još uvek nije jasno kada i kako jedna ćelija u toku daljeg razvoja može da postane samo ćelija jetre ili samo ćelija srca.

Diferencirana ćelija ima nove morfološko-fiziološke karakteristike koje je čine posebnom, drugačijom od ostalih embrionalnih ćelija. Promenila je oblik, veličinu, ponašanje prema susednim ćelijama. Diferencirana ćelija je osposobljena da vrši posebnu funkciju.

Dosadašnja ispitivanja su pokazala da je osnovna razlika među diferenciranim ćelijama u *biosintezi specifičnih proteina.* Neke diferencirane ćelije sintetišu velike količine specifičnih proteina, npr. 90% proteina eritrocita čini hemoglobin; druge sintetišu male količine specifičnog proteina, npr. enzim detoksikacije u ćelijama jetre. Jedne svoje proteine izlučuju direktno u krv (protein hormone), druge u spoljašnju sredinu (enzimi varenja, koje sintetišu ćelije egzokrinog pankreasa), treće u međućelijske prostore (vezivne ćelije sintetišu kolagen).

Zaključak bi bio da je diferencirana ćelija specifična po tipu proteina koji proizvodi i po ulozi koju ima u organizmu.

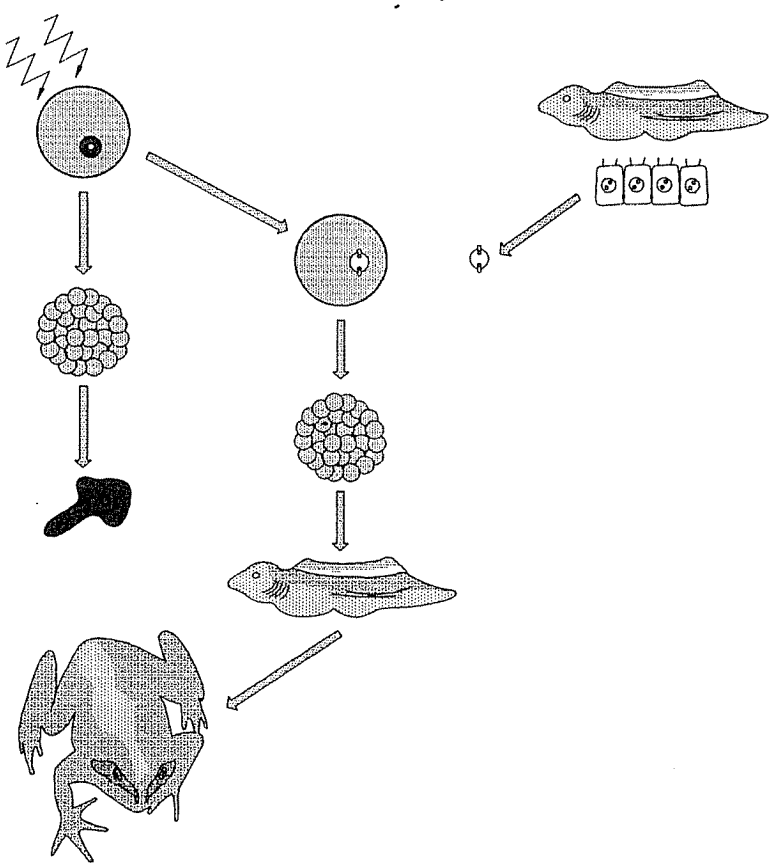
Strukturni elementi ćelije, proteini citomembrana, elementi koji omogućavaju deobu ćelije, kretanje, oblik ili promenu oblika, komunikaciju između ćelija, proteini koji kontrolišu rast i deobu ćelije i sve druge procese u ćeliji, predstavljaju *fenotipsku ekspresiju gena ćelije.* Ako u jednom trenutku embriogeneze blastomere počnu da se razlikuju između sebe po ovim karakteristikama, onda bi to značilo da u različitim blastomerama funkcionišu različiti geni. Da li različite blastomere imaju različite genome?

Rečeno je da se zigot i ćelije koje od njega nastaju dele mitotskom deobom a suština mitoze je u *ravnomernoj podeli* hromosoma i gena ćelije majke na ćelije kćerke. To znači da svaka naša ćelija ima iste hromosome i gene kao što je imao zigot: epitelna ćelija ima gen za hormon rastenja, ćelija hipofize gen za kolagen itd. Ako je tako, onda mora da postoje vrlo precizni mehanizmi *kontrole aktivnosti gena* koji u određeno vreme, na

određenom mestu u određenoj ćeliji jedne gene uključuju u rad, a druge isključuju iz rada.

Za sada su najmanje jasni regulatorni mehanizmi koji obezbeđuju aktivnost onih gena čiji su produkti, u određenoj fazi embriogeneze, potrebni ćeliji, kao i mehanizmi koji kontrolišu usklađen razvoj celokupnog višećelijskog organizma. Problem molekularne osnove kontrole aktivnosti gena je centralni problem savremene biologije.

Nije čudno da se dugo vreme pretpostavljalo da pri brazdanju zigota različite embrionalne ćelije dobijaju različite "determinante" koje određuju pravac razvoja svake embrionalne ćelije (Weismann A., 1892. god). Jednim relativno jednostavnim eksperimentom, ova teorija je oborena. Ako se mikropipetom iz oplođenja jajne ćelije amfiba izvadi jedro, pa se u ovakvu "enukleiranu" ćeliju unese jedro neke od ćelija blastule ili gastrule, u najvećem broju eksperimenata jajna ćelija počinje da se brazda i normalno se razvija (sl. 11.11). Kada bi se tokom brazdanja jedra kvalitativno menjala, ovakav eksperiment ne bi bio moguć. U novije vreme, čak i jedra različito diferenciranih ćelija larve (npr., ćelija crevnog epitela ili neurona), preneta u jajnu ćeliju kojoj je uklonjeno jedro, obezbeđuju normalan embrionalni razvoj.



Slika 11.11 – UV zracima ozračeno jedro jajne ćelije može da se zameni jedrom diferencirane ćelije crevnog epitela. Iz jajne ćelije se razvija normalni embrion, larva i adult. Nedavno su slični eksperimenti izvedeni na sisarima (ovca Doli)

Ako se tokom razvića jedra kvalitativno ne menjaju, zašto ipak dolazi do diferencijacije, do nastajanja razlika između embrionalnih ćelija?

Druga važna komponenta jajne ćelije je citoplazma. U mnogim jajnim ćelijama, neposredno po oplođenju, mogu da se uoče kvalitativno različiti predeli citoplazme. Ti predeli se razlikuju po konzistenciji citoplazme, po prisustvu ili odsustvu različitih inkluzija (pigment, vitelus), po količini RNK, rasporedu organela, biohemijskim procesima i dr.

U toku brazdanja, sa svakom novom deobom, embrionalne ćelije postaju sve manje i manje i ne menjaju svoj položaj u odnosu na predele zigota. To znači da od početka brazdanja blastomere dobijaju *kvalitativno različitu citoplazmu.* Citoplazma predstavlja spoljašnju sredinu jedra i može da utiče na aktivnost jedra. Ako se jedro diferencirane ćelije presadi u citoplazmu zigota, prestaje transkripcija rRNK, karakteristična za diferenciranu ćeliju.

Vrlo je verovatno da diferencijacija primarno zavisi od kvaliteta citoplazme u kojoj se nalazi jedro. Ako jedra različito reaguju na kvalitativno različitu citoplazmu, onda ona *postaju različita* ne po sadržaju gena, već po *aktivnosti gena.*

Ta primarna razlika se produbljuje jer će se izmeniti i interakcija izmenjenog jedra sa citoplazmom. Progresivno, nukleo-plazmatični odnosi postaju sve specijalizovaniji i sve više se razlikuju između ćelija usmerenih u različitim pravcima diferencijacije.

Da kvalitativno različita citoplazma može da utiče na diferencijaciju, dokazano je na primeru Ascarisa (valjkasti crv).

Zapaženo je da se tokom razvića Ascarisa deo citoplazme zigota sa mnogo RNK uvek nalazi samo u jednoj blastomeri. Blastomera bogata RNK ima 2n hromosoma. Sve ostale blastomere već posle prve deobe dobijaju fragmentisane hromosome, odnosno imaju manje DNK od 2n. Ćelije sa fragmentisanim hromosomima diferenciraće se u somatske ćelije a ćelije sa intaktnim hromosomima daju ćelijsku liniju gonocita. Izgleda da citoplazma bogata RNK utiče na stabilnost DNK i sprečava fragmentaciju hromosoma a time određuje razvojni put gonocita.

Eksperimentalna biologija je i na drugim vrstama pokazala da citoplazma zigota utiče na diferencijaciju embrionalnih ćelija.

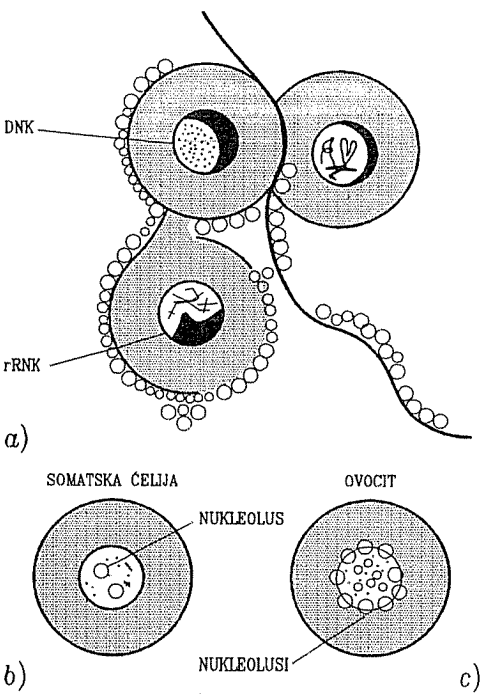
Oplođena jajna ćelija kojoj je uklonjeno jedro može da se brazda, zavisno od vrste kojoj pripada, do blastule, gastrule ili čak i larve. Ako je zigot bez jedra sposoban da se brazda, onda moramo da pretpostavimo da se u samoj citoplazmi zigota nalaze izvesne informacije koje obezbeđuju brazdanje. Te informacije mora da potiču od genoma jer se i zigot bez jedra brazda po određenom nasslednom planu, na određen nasledan način.

Ako u početnim stadijumima razvića citoplazma zigota ima tako značajnu ulogu, onda je to sigurno citoplazma jajne ćelije jer spermatozoid, kao visokodiferencirana ćelija, skoro da nema citoplazme (u nekih životinjskih vrsta, prisustvo spermatozoida i oplođenje čak i nisu uslov za početak razvića).

Jajna ćelija sazreva u jajniku. Trajanje sazrevanja je različito u različitih vrsta: nekoliko dana, nedelja pa i meseci. U čoveka, jajna ćelija počinje da sazreva u jajniku u toku embriogeneze i u stadijumu diktiotena (I mejotička profaza) može da provede i desetine godina. Završiće sazrevanje tek po ulasku spermatozoida, u jajovodu.

U jajnoj ćeliji kičmenjaka nakupljaju se hranljive materije iz okolne sredine ili iz krvotoka majke ali i sama jajna ćelija sintetiše brojne makromolekule, od kojih će neke koristiti tek posle oplođenja.

Najviše podataka o biosintetskoj aktivnosti ovocita prikupljeno je ispitivanjem amfiba, posebno vrste Xenopus laevis. Zapaženo je da mladi ovocit u stadijumu pahitena ima u jedru dve vrste DNK: rastresitu, hromosomsku DNK i kompaktnu, u vidu kalote, rDNK. Ribosomska DNK sadrži gene za prekursorsku, 45S rRNK. U ovocitu ima 100-1000 puta više gena za rRNK nego u somatskim ćelijama. Povećanje broja gena za rRNK vrši se procesom *amplifikacije,* diferencijalnim umnožavanjem rDNK, pri čemu se hromosomi ne replikuju. Ribosomska DNK se u vidu prstenova odvaja od hromosoma i obrazuje brojne nukleoluse. Dok somatske ćelije imaju samo dva nukleolusa, u ovocitu ih može biti i nekoliko hiljada. Zahvaljujući ovakvom povećanju broja gena za rRNK, jedan ovocit može da sintetiše toliko rRNK koliko u istom vremenskom periodu sintetiše 20.000 ćelija jetre (sl. 11.12).

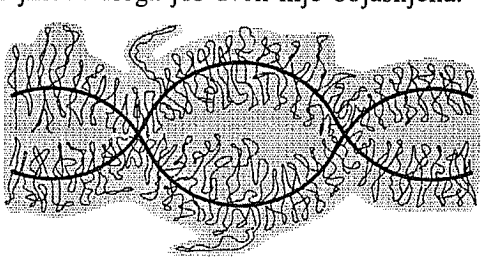


Slika 11.12 – Ovocit žabe, Xenopus laevis u stadijumu pahitena. U jedru se uočava kompaktna, rDNK i rastresita jedarna DNK(a). Amplificirani rRNK geni obrazuju veliki broj nuleolusa (c). U jedru somtskih ćelija nalaze se dva nukleolusa (b).

U stadijumu diplotena ovocit Xenopusa sadrži duge (oko 800.000 mikrona) hromosome, u vidu bivalenata. Oni imaju posebnu građu. Na njima se zapažaju mesta hijazmi, jedna centralna osovina koju čini spiralizovana, u smislu transkripcije neaktivna DNK a od nje se bočno izdvajaju simetrične despiralizovane petlje. Ovakvi hromosomi podsećaju na četke kojima su se nekad čistila stakla plinskih lampi, pa ih nazivaju lamp -bruch ili *četkasti hromosomi* (sl. 11.13).

Na petljama, koje predstavljaju aktivne gene, transkribuju se vrlo raznovrsne, *heterogene RNK.* One se spajaju sa proteinima (zaštita) pa se na petljama citohemijskim metodama dokazuje DNK petlje, niti tek sintetisanih RNK i granule nukleoproteida. Broj nukleotida u prepisanim RNK varira od nekoliko desetina do nekoliko hiljada. Pretpostavlja se da u heterogenim RNK ima i iRNK i tRNK. To su molekuli koji mogu dugo vreme da se očuvaju u citoplazmi ovocita i da se aktiviraju tek po oplođenju. Neki od njih sadrže informacije za proteine hromatina, za proteine deobnog vretena, kontraktilnih struktura i dr.

Neke od prepisanih RNK ne napuštaju jedro i najčešće bivaju razgrađene. Njihova uloga još uvek nije objašnjena.



Slika 11.13 – Hromosomi ovocita u diplotenu, četkasti hromozomi.

Oplođenje

Za većinu jajnih ćelija, ulazak spermatozoida i oplođenje predstavljaju veoma značajne događaje: haploidna jajna ćelija postaje diploidna; u mnogih vrsta pa i u čoveka se određuje genetički pol nove jedinke; citoplazma se kreće pa se određeni molekuli i organele raspoređuju u zigotu; uspostavljaju se različiti gradijenti: determiniše se pravac simetrije embriona, dorzoventralni i cefalokaudalni polaritet i dr.

Novija istraživanja su pokazala da kretanjem citoplazme makromolekuli koji utiču na determinaciju i diferencijaciju embrionalnih ćelija dospevaju u određene predele zigota. Jedan od njih, VG1-protein amfiba, lokalizuje se u vegetativnom delu zigota i u daljem razviću utiče na diferencijaciju mezoderma. Interesantno je da je Vgl-protein sličan faktorima rastenja sisara.

Pri oplođenju dolazi do aktiviranja fizioloških procesa u zigotu: rastu proteoliza, potrošnja kiseonika i biosinteza proteina. Ako se zigotu aplicira aktinomicin D, antibiotik koji blokira transkripciju, intenzitet navedenih procesa se ne menja. Pretpostavljalo se a i dokazano je da se u zigotu i u blastomerama u prvim periodima brazdanja biosinteza proteina uglavnom vrši na makromolekulima nasleđenim od majke preko citoplazme jajne ćelije.

Zavisno od vrste kojoj pripada, zigot tretiran Actinomycinom D ugine na stupnju morule ili blastule. To znači da se i na hromosomima zigota vrši transkripcija, ali se te iRNK ne koriste odmah već u kasnijim stupnjevima razvića.

Na ćelijama morule je, npr., otkriven jedan embrionalni antigen, F9, neophodan za obrazovanje morule. On je najverovatnije produkt embrionalnih gena. Ukoliko se antigen F9 neutrališe, morula ne može da se obrazuje.

Mnogi eksperimenti, posebno oni izvedeni tokom šezdesetih godina ovoga veka, potvrdili su da rana embriogeneza amfiba zavisi prvenstveno od makromolekula sintetisanih u periodu oogeneze.

Genom ploda izgleda da potpuno preuzima kontrolu razvića u periodu gastulacije amfiba. U jedrima počinju da se javljaju nukleolusi (sintetišu se rRNK), sintetišu se nove, vrlo raznovrsne iRNK, povećava se količina tRNK. Drugim rečima, nova jedinka počinje intenzivnu sintezu sopstvenih proteina na osnovu informacija svog genoma.

Eksperimenti na embrionima sisara pokazuju da se u njih genom ploda znatno ranije aktivira. Već posle druge deobe (stadijum od 4 blastomere) u jedrima se pojavljuje nukleolus, a aktivirani su i geni za neke enzime, glukozidazu, beta galaktozidazu. Ima podataka da embrion od dve blastomere sintetiše sopstvene beta 2 makroglobine. Embrion miša, homozigotan za mutirani gen za proteine deobnog vretena, tubuline, ugine posle treće deobe, tj. na stadijumu od 8 blastomera. To bi značilo da je tokom tri deobe koristio iRNK za tubuline nasleđene preko jajne ćelije heterozigotne majke. U trenutku kada bi morao da koristi sopstvene iRNK, homozigotni mutant ugine.

Treća deoba u sisara je, izgleda, vrlo značajna i za determinaciju ćelija budućeg embriona. Naime, tada se odigraju izvesne promene u ćelijama (još uvek se ne zna kakve) pa će jedne učestvovati u obrazovanju embriona (embrioblast) a druge u obrazovanju posteljice (trofoblast). U nekih sisara u prvima se povećava količina RNK a drugima se citoplazma vakuolizuje.

Punu fenotipsku ekspresiju geni embriona doživljavaju u periodu organogeneze. Mada se već u gastrulaciji, pri obrazovanju klicinih listova, uočavaju prvi znaci diferencijacije izraženi u specifičnom ponašanju ćelija – jedne se šire

po površini embriona (ektoderm) druge ulaze u unutrašnjost embriona (endoderm), treće se raspoređuju između endoderma i ektoderma itd. – morfološke razlike među ćelijama se još ne zapažaju. Unutar samih klicinih listova dokazano je postojanje "polja budućih organa" koja se još ne razlikuju od okolnih delova embriona, ali imaju determinisan razvojni put.

Krilo ptica (npr., embriona kokoši) počinje da se diferencira oko 60. sata inkubacije. Ako se polje budućeg krila izdvoji iz embriona 48. sata, pre nego što se u njemu zapažaju bilo kakve promene, i presadi na hranljivu podlogu, tokom sledećih 10-12 časova ono će se diferencirati u krilo. To znači da je razviće krila ***determinisano*** još 48 sata.

Uloženo je mnogo truda da se ustanovi šta se dešava u ćelijama u periodu determinacije. Da li se proteini determinisane i diferencirane ćelije razlikuju? Koji molekuli usmeravaju diferencijaciju jedne ćelije?

Na osnovu mnogih podataka moglo bi se zaključiti da u određenom trenutku embriogeneze ćelija primi neki signal (commitment), neko "uputstvo", pri čemu se uključuje u rad određena grupa gena ili se samo na toj grupi gena ubrzava transkripcija.

Kada se u ćeliji pojave novosintetisani proteini, koji još nemaju fenotpsku ekspresiju, to bi značilo da je počela determinacija. Kada se u ćelijama novosintetisani proteini počnu da ispoljavaju u fenotipu, ćelija počinje da se diferencira. Prema tome, periodi primanja naloga, determinacije i diferencijacije razlikovali bi se uglavnom po intenzitetu aktivnosti određenih gena odnosno po ***količini genskih produkata.***

Pretpostavlja se da u ćelijama postoje i specifični proteini u nemerljivim količinama i možda baš neki od njih ima presudnu ulogu u procesu diferencijacije. O takvim molekulima još uvek postoje samo pretpostavke koje nisu ni potvrđene ni odbačene. U svakom slučaju, ako bi embriogeneza, koja je izuzetno složen, u vremenu i prostoru strogo programiran proces, zavisila od intenziteta biosinteze specifičnih proteina, ta biosinteza morala bi da bude strogo kontrolisana.

Najteže je odgovoriti kojim se mehanizmima vrši ova kontrola. Diferencirano stanje ćelije je nasledno i zavisi od gena DNK, od korektne replikacije DNK, transkripcije određenih gena u određeno vreme i od prevođenja iRNK u proteine koji su tog trenutka potrebni ćeliji.

Danas se zna da brojni endogeni i egzogeni činioci utiču na aktivnost gena. To su: faktori rastenja, faktori diferencijacije, adhezivni CAM-molekuli, interleukini i drugi, ili hormoni, vitamini, antimetaboliti i drugi hemijski, fizički i biološki faktori. Eksperimentalno je dokazano da svi ovi faktori mogu da utiču na izbog gena i na biosintezu specifičnih proteina na složenom putu ovog procesa od DNK-gena do definitivnog, funkcionalnog proteina.

Na navedene signale genom eukariota odgovara *sintezom specifičnih proteina* ili produkcijom ***različite količine specifičnih proteina.***

Prema tome, ***kontrola genske aktivnosti*** sinteze proteina i diferencijacije može da se vrši:

a) na molekulima DNK (genima),
b) na nivou transkripcije,
c) posttranskripcije,
d) translacije i
e) posttranslacije.

Regulacija genske aktivnosti na molekulima DNK

a) hemijske promene DNK,
b) eliminacija gena,
c) amplifikacija gena,

d) preraspored genetičkog materijala (pozicioni efekat) i

e) heterohromatizacija.

a) *Mada se smatralo da hemijske promene DNK* ne bi bile uključene u mehanizme regulacije aktivnosti gena, novija istraživanja pokazuju da, npr., reverzibilne ili trajne hemijske promene baza DNK menjaju aktivnost gena. Tako stepen metilacije DNK utiče na aktivnost gena. Na ćelijama kunića je ustanovljeno da je u ćelijama koje sintetišu hemoglobin DNK u blizini gena za beta globine, nemetilirana ili vrlo malo metilirana a u ćelijama mozga je metilacija potpuna (100% citozina je metilirano). Ovaj proces je reverzibilan, regulisan metilazama i demetilizama pa je pretpostavka da bi selektivna metilacija i demetilacija citozina mogla da predstavlja jedan oblik regulacije, tim pre jer je ustanovljeno da različita tkiva imaju specifične demetilaze. Radovi na embrionima sisara su pokazali da je DNK blastomera na ranim stupnjevima brazdanja maksimalno metilirana. Demetilacija počinje u ćelijama trofoblasta (koji treba da se prvi diferencira i omogući implantaciju ploda) a nešto kasnije u ćelijama epiblasta pa tek nakon toga u ćelijama hipoblasta.

b) *Eliminacija ili gubitak genetskog materijala* kao mehanizma regulacije procesa diferencijacije opisana je u somatskim ćelijama valjkastih crva Nematodes (str. 261), u nekih protozoa i insekata, ali nema podataka da bi funkcionisao u sisara.

c) *Amplifikacija ili selektivno umnožavanje gena,* međutim, omogućava ćeliji da u određenom trenutku obezbedi veliki broj potrebnih molekula. Amplifikacija je detaljno opisana u ovocitima Xenopusa (str. 262) u predelu NOR-ova u čoveka, u DM i HSR segmentima malignih ćelija (vidi poglavlje Onkogenetika).

d) *Preraspored genetičkog materijala* ima značajnu ulogu u diferencijaciji ćelija koje produkuju antitela (vidi poglavlje Imunogenetika). Za sada nema podataka da se preraspoređom nukleotida u molekulima DNK vrši kontrola diferencijacije u drugim ćelijama sisara, što potvrđuju istraživanja molekularne organizacije DNK diferenciranih ćelija i činjenica da jedro diferencirane ćelije, transplantirano u citoplazmu zigota, ponovo postaje totipotentno.

e) *Heterohromatizacija,* kondenzacija hromatina može da bude jedan od mehanizama selektivne aktivacije gena. Stepen kondenzacije hromatina zavisi od rasporeda i načina vezivanja proteina na DNK i od spiralizacije i superspiralizacije DNK.

U sastav hromatina, kao što je već rečeno, ulaze histoni, bazni proteini koji su evolutivno konzervativni, vrlo slični i u evolutivno udaljenih vrsta (tako se, npr., H3 zelenog graška razlikuje samo u 4 aminokiseline od H3 ćelija govedeg timusa). Zato se smatra da histoni nespecifično blokiraju genom eukariota. Oslobađanje DNK od histona je uslov za početak transkripcije pa bi različite modifikacije histona (acetilacija, fosforilacija) omogućavale transkripciju gena. Ima podataka da se zaista tokom diferencijacije histoni, ili bar neki od njih, menjaju. Posebno su interesantni molekuli H1: ne ulaze u sastav nukleosoma, verovatno kontrolišu superspiralizaciju DNK i mogu biti specifični za tkivo ili za vrstu.

Na stepen spiralizacije hromatina, osim hemijskih promena proteina, i DNK nukleotida, utiče i izdvajanje histona iz nukleosoma, lokalne promene na DNK, promena pravca spiralizacije DNK itd. Koji sve faktori, a posebno kojim mehanizmima, ti faktori menjaju fizičko stanje hromatina, nije jasno. Ima podataka da je hromatin rastresitiji u predelu ak-

tivnih gena nego tamo gde su geni inaktivni; činjenica je da je heterohromatični (spiralizovani) X-hromosom ženki sisara inaktivan; dokazano je da se tokom razvića menja lokalizacija heterohromatičnih segmenata hromosoma u različitim ćelijama embriona.

Moguće je da tokom razvića i diferencijacije lokalne promene hromatina jedne gene čine pristupačnijim delovanju različitih signala (enzima, hormona, faktora rastenja i diferencijacije), a druge gene, kondenzacijom, isključuju iz rada.

U sastav hromatina ulaze i nehistonski, ***kiseli proteini (NHKP),*** koji su raznovrsni, tkivno specifični a menjaju se tokom diferencijacije ćelije. Postoji pretpostavka da u kompleks NHKP ulaze ranije navedeni, različiti, proteinski regulatori (signali). Ipak, još uvek nema dovoljno dokaza koji bi definitivno potvrdili ovu pretpostavku.

Kontrola transkripcije

- kontrola nuklearne sinteze iRNK (transkripcije)
- obrada primarnog prepisa (pre iRNK)
- stabilizacija-destabilizacija iRNK

Sve ranije navedene promene u molekulima DNK i hromatina omogućavaju ili sprečavaju prepisivanje određenih segmenata DNK, gena. Prvu hipotezu o regulaciji genske aktivnosti eukariota na nivou transkripcije dali su 1969. god. Britten i Davidson.

Po analogiji sa modelom Jacoba i Monoda o regulaciji genske aktivnosti u prokariota, Britten i Davidson su pretpostavili da u eukariota postoje četiri klase gena. Na genima prve klase prepisuju se iRNK za specifične proteine. To su ***geni produktori*** (GP) i predstavljaju jedinstvene, singl-sekvence genoma. Kako je u eukariota genom blokiran histonima, GP su neaktivni. Da bi se aktivirali, da bi na njima počela transkripcija, aktivatorski molekul (AM) treba da prepozna i da se veže za *receptorni gen* (II klasa, RG) koji je lociran neposredno uz GP. Aktivatorski molekul može da bude ***iRNK-aktivator,*** ili *protein,* sintetisan na toj iRNK. Ova iRNK se prepisuje na III klasi gena, genu ***integratoru*** (GI). GI je takođe blokiran histonima. On se nalazi neposredno uz *senzorni gen* (IV klasa). Neki efektor, a to mogu da budu vrlo različiti molekuli, metaboliti u ćeliji, hormoni, cAMP i drugi "signali", indukujuće supstancije iz susednih tkiva itd., mora da se veže za senzorni gen i da ga aktivira. Tada senzorni gen aktivira GI, ovaj se prepisuje u iRNK (protein aktivator), AM prepoznaje receptorni gen i vezujući se za njega, aktivira gen produktor.

Ako u jednom metaboličkom procesu učestvuje veći broj enzima, uz svaki GP za enzim mora da bude RG koga prepoznaje isti AM. Znači da se pojedine sekvence genoma mogu više puta ponavljati (repetitivne sekvence). Isto tako, tokom ontogeneze ćelija može na različite načine (uključivanjem različitih gena) da reaguje na isti stimulans. Prema tome, svaki od regulatornih gena (GI, RG) može da se javi u više kopija, a svi geni aktivirani u jednom procesu čine bateriju gena.

Nešto kasnije, kada je ustanovljeno da iRNK na ribosomima predstavljaju samo mali deo iRNK koje se nalaze u jedru (nRNK ili heterogene, hnRNK), Britten i Davidson su izmenili svoju hipotezu. Po njima, većina gena se prepisuje pa zato u ćelijama jetre, koje nikad ne sintetišu hemoglobin, mogu da se nađu iRNK za globinske lance Hb. Mnoge od tih iRNK nikada ne napuštaju jedro i verovatno se odmah razgrade. Samo one iRNK koje su neophodne za održavanje ćelije (iRNK, npr., za enzime Krebsovog ciklusa) i one koje nose informaciju za specifične proteine te ćelije (npr., za aktin mišićnih ćelija ili za hormon ras-

tenja hipofize i sl) odlaze na ribosome i bivaju prevedene u proteine. Njihov model je dosta komplikovan, ali vrednost ove hipoteze je u tome što pretpostavlja regulaciju na nivou posttranskripcije.

Obe hipoteze su interesantne, potkrepljene su i eksperimentalnim podacima, govore o regulaciji na različitim etapama biosintetskog procesa i objašnjavaju regulatornu ulogu repetitivnih sekvenci.

Sva novija ispitivanja pokazuju da su Britten i Davidson naslutili neke elemente regulacije, ali ta regulacija je u eukariota, očigledno, izuzetno složena i mehanizmi kontrole genske aktivnosti još uvek nisu objašnjeni. Zato i nema jedne jedinstvene, opšte prihvaćene teorije.

Sve više preovlađuje mišljenje da fenotipska ekspresija gena ne zavisi od mehanizma "uključivanja i isključivanja" gena već od *intenziteta* transkripcije, odnosno brzine prepisivanja. Samo onaj gen koji može da obezbedi dovoljne količine iRNK koje će biti prevedene u određeni polipeptid (protein) imaće fenotipsku ekspresiju. Brzina transkripcije izgleda da prvenstveno zavisi od inicijacije transkripcije, a manje od brzine terminacije. Brzina inicijacije je najverovatnije kontrolisana regulatornim genima.

U mnogih eukariota pa i u čoveka u jedru je dokazano prisustvo proteinskih molekula koji prepoznaju regulatorne gene i vezujući se za njih najčešće ubrzavaju transkripciju. Zato se nazivaju "pozitivnim regulatorima". Na osnovu hemijske analize ovih regulatornih proteina ustanovljena je izvesna homologija u redosledu njihovih aminokiselina, čak i kad potiču od tako udaljenih oblika kao što su neurospora i čovek (GCN4 i AP1 protein čoveka).

Prikupljeno je dosta podataka o delovanju hormona na aktivnost gena i u toku razvića i u adulta.

Poznato je da pod delovanjem endogenih estrogena dolazi do proliferacije ćelija zida uterusa. Ako se ženki pacova uklone ovarijumi, cikličnih promena u uterusu nema. Kako pacov ima specifičan uterus (uterus dupleks), moguće je da se kastriranoj ženki ubrizga beta estradiol samo u jednu granu uterusa. U toj grani počinje proliferacija ćelija a odigravaju se i druge promene karakteristične za proestrus. Vidljivim promenama prethodi intenzivna sinteza RNK. Ako se ova RNK ekstrahuje i ubrizga u netretiranu "mirnu" granu uterusa, doći će do proliferacije, hiperemije, hipertrofije žlezda, kao da je injiciran beta estradiol. Ukoliko se istovremeno ubrizgavaju estradiol i Actinomycin D (koji sprečava transkripciju), zid uterusa se neće menjati. Kasnije je utvrđeno da beta estradiol, preko specifičnih nosača, može da se direktno veže za DNK i da aktivira grupe gena koji svojim produktima omogućavaju pripremu zida uterusa za prijem ploda.

Hormoni mogu da budu mali molekuli ili polipeptidi, mogu da deluju na različite ćelije (npr., somatotropni hormoni ili insulin) ili samo na određene, ciljne ćelije (npr., prolaktin na ćelije dojke).

Faktori rastenja takođe mogu da budu vrlo specifičnog delovanja (npr., NGF deluje samo na ćelije nervnog tkiva) a EGF (epidermalni faktor rastenja), tokom embriogeneze deluje na ćelije epidermisa, ali stimulira rast i mnogih drugih ćelija koje imaju receptore za EGF.

Interferoni (grupa od 20 do 25 proteina male molekulske težine koju produkuju ćelije) čine ćelije otpornom na virusne infekcije aktiviranjem gena za odbrambene proteine.

Neki signali dospevaju do ćelija putem krvi, neke preko međućelijskog matriksa a neki u direktnom kontaktu među ćelijama. Ima podataka da se neki signali vezuju za receptore membrane i aktiviraju fosforilaciju intracelularnih de-

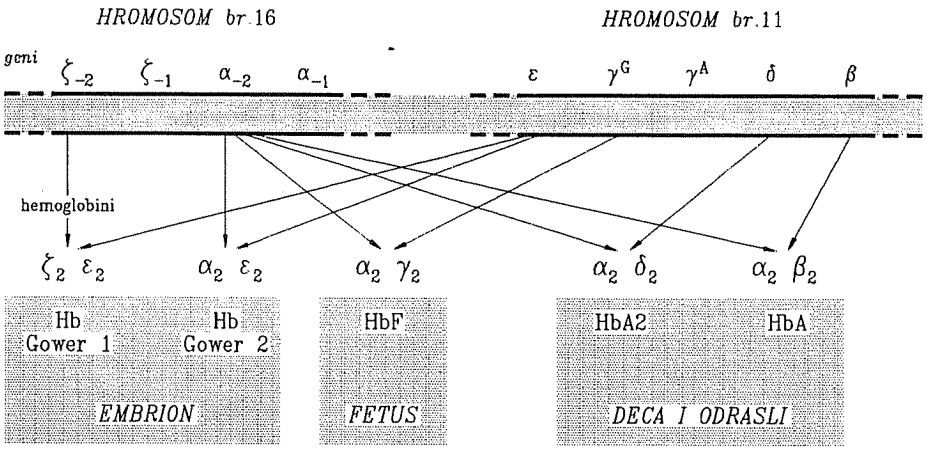
lova receptora ili intercelularnih molekula, čime se stimulira rast ćelije i ubrzava replikacija.

Činjenica je da tokom embriogeneze dolazi do kontrolisanih promena u aktivnosti gena, što se jasno vidi na primeru humanih hemoglobina. Geni za globinske lance locirani su na hromosomu 11 (gen epsilon, gama G, gama A, delta i beta) i hromosomu 16 (zeta 2, zeta 1, alfa 2 i alfa 1).

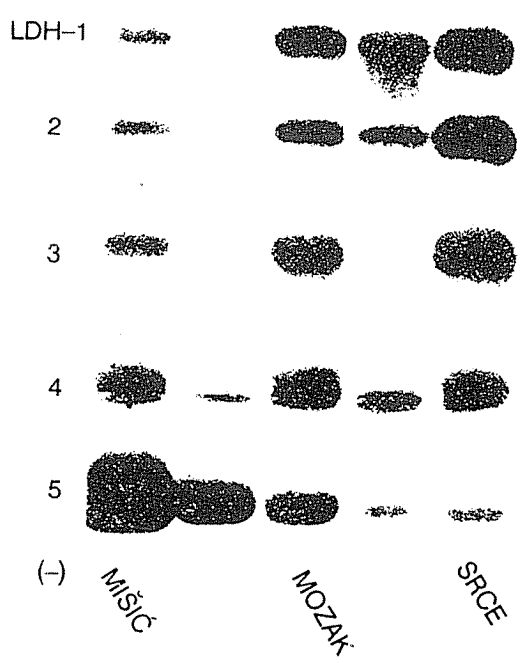
U ranom embrionalnom periodu, u sastav hemoglobina ulaze dva epsilon i dva zeta lanca (Gover 1), zatim prestaje fenotipska ekspresija zeta gena a javljaju se produkti alfa gena (Gover 2). U fetalnom periodu se gube produkti epsilon gena, javljaju se lanci gama pa fetalni hemoglobin sadrži dva alfa i dva gama globinska lanca. Pred kraj intrauterinog života opada sinteza gama lanaca a raste produkcija beta lanaca. U adulta, najveći deo hemoglobina sadrži dva alfa i dva beta lanca (Hbl) a samo oko 10% hemoglobina odraslih sadrži 2 alfa i dva delta lanca (Hb2). Prenesena deca imaju manje fetalnog hemoglobina, a nedonešena znatno više od dece rođene u terminu.

Da su globinski geni i kod adulta prisutni u genomu, govori činjenica da se kod nekih bolesnika sa leukemijom javlja fetalni hemoglobin (gama geni su reaktiviriani u pogrešno vreme). U ćeliji koja se maligno menja mogu i drugi embrionalni ili fetalni geni da se reaktiviraju pa se kod bolesnika sa rakom otkrivaju karcinoembrionalni ili karcinofetalni proteini. Interesantno je da su globinski geni hronološki locirani na hromosomima 11 i 16 (sl. 11.14).

Slično smenjivanju funkcije gena opisano je i pri sintezi enzima laktat - dehidrogenaza. Sinteza lanca A kontrolisana je genom na hromosomu 11 a sinteza lanca B genom na hromosomu br. 12. Ova dva tipa polipeptida mogu da obrazuju 5 izozima. U embrionalnim tkivima ima najviše enzima tipa 3, koji se sastoje iz 2A i 2B lanca (oba gena imaju istu ekspresiju). Za mišićne ćeije adulta karakterističan je tip 5 enzima (4A lanca, kao da je B-gen isključen iz rada) a za srčani mišić tip 1 enzima (4B lanca) (gen A nema fenotipsku ekspresiju). I u različitim tkivima i u različitim ontogenetskim stupnjevima aktivnost gena A i B je različita (slika 11.15)



Slika 11.14 – Geni za humane hemoglobine nalaze se na hromozomima br. 11 i br. 16. Tokom embriogeneze, aktivni su zeta i epsilon geni (Gover 1) a zatim se aktiviraju alfa geni (Gover 2). U fetalnom periodu prepisuju se alfa i gama geni (fetalni hemoglobin). Pri kraju trudnoće, opada aktivnost gama gena a aktiviraju se beta i delta geni pa deca i odrasli imaju hemoglobin sa dva alfa i dva beta lanca (Hb A, oko 90%) ili dva alfa i dva delta lanca (HbA2, oko 10%.



Slika 11.15 – U različitim tkivima čoveka i u različitim ontogenetskim periodima, menja se tip enzima laktat dehidrogenaze (LDH). U mišićnim ćelijama ima najviše enzima tipa 5 (4A lanca) a u srčanom mišiću enzima tipa 1 (4B lanca).

Najviše podataka o delovanju "signala" pri direktnom kontaktu ćelija dobijeno je ispitivanjem procesa embrionalnih indukcija.

EMBRIONALNE INDUKCIJE

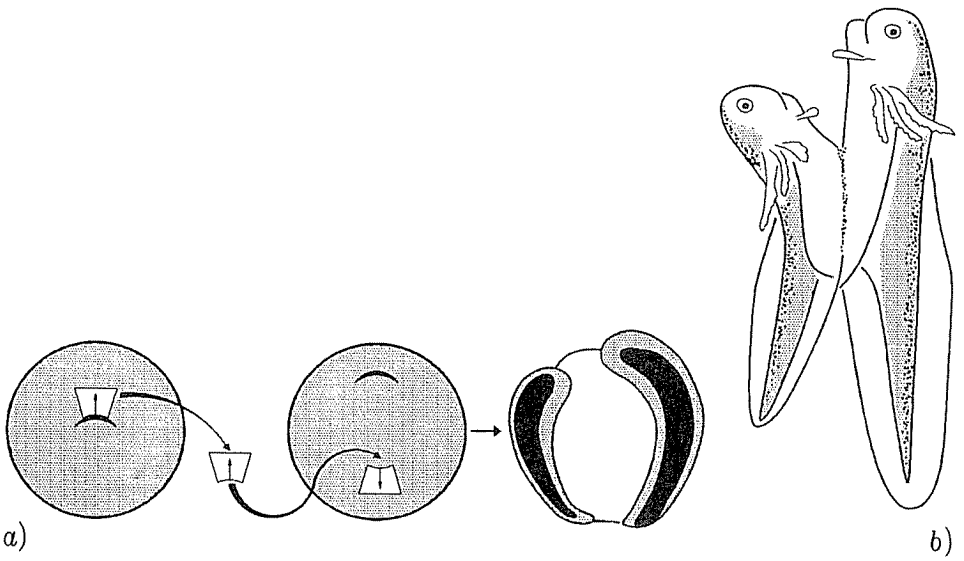
Embrionalne indukcije imaju izuzetno značajnu ulogu u periodu morfogeneze (oblikovanja embriona). Tokom gastrulacije, pri obrazovanju klicinih listova, ćelije različitog porekla dolaze u kontakt i jednosmernim ili recipročnim delovanjem, usmeravaju diferencijaciju delova embriona.

U procesu indukcije, tkivo koje usmerava diferencijaciju susednog tkiva naziva se ***induktorom*** a tkivo koje odgovara na indukciju ***reaktantom.*** Brojni eksperimenti su pokazali da pri indukciji neka "induktorna supstancija" prelazi iz induktora u reaktant. Iako se indukcije ispituju već više od pola veka, priroda induktora nije razjašnjena. Različita tkiva, živa ili prokukovana, ubijena etrom ili formolom, organske materije, kancerogeni i dr. mogu da vrše indukcije.

Sa molekularnog stanovišta, induktor pomoću "indukujuće supstancije", aktivira u ćelijama reaktanta grupe gena koje do tada nisu imale fenotipsku ekspresiju. Produkti aktiviranih gena menjaju ponašanje ćelija, njihovu morfologiju i funkciju.

Da bi reaktant mogao da odgovori na indukciju, treba da bude ***kompetentan.*** Najverovatnije da je kompetentnost uslovljena prisustvom specifičnih receptora na membranama ćelija. Sinteza receptora je pod kontrolom gena pa bi prisustvo ili odsustvo receptora, njihov broj i raspored, smenjivanje receptora u vremenu i prostoru mogli da budu snažni faktori regulacije razvića.

Indukcijom prvog reda smatra se ona koju vrši hordomezodermalno tkivo u ektodermu, u periodu neurulacije. Ako se spreči gastrulacija (npr., ako se embrion amfiba stavi u vodu u kojoj ima soli litijuma) hordomezodermalno tkivo i ektoderm neće doći u dodir i neće se diferencirati nervna cev. Ako se mladoj gastruli presadi deo hordomezodermalnog tkiva u predeo ispod trbušnog epidermisa, razviće se nervna cev i u trbušnom predelu. Presađeno hordomezodormalno tkivo ***(induktor I reda)*** ima i sposobnost da organizuje okolna tkiva i da indukuje formiranje kompletnog, dodatnog embriona, na trbušnoj strani (slika 11.16.a,b). Zato se ovo tkivo naziva i ***organizacioni centar I reda.*** Mada se hordomezodermalno tkivo još uvek naziva induktorom I reda, novija ispitivanja na Xenopusu su pokazala da, još na, stupnju blastule, makromere utiču na diferencijaciju mikromera granične zone blastule (sl. 11.17).

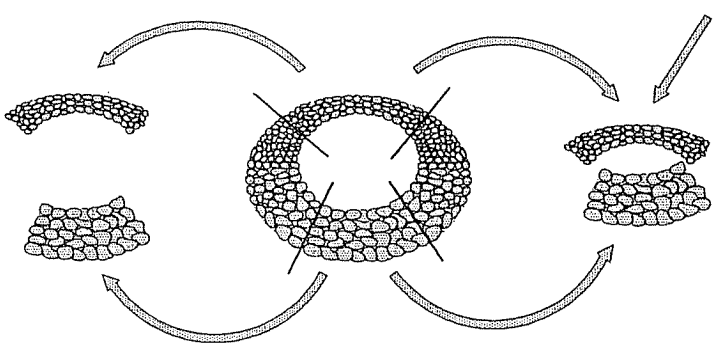


Slika 11.16 – Ako se hordomezodermalno tkivo mlade gastrule, presadi u trbušni predeo druge gastrule, ono indukuje diferencijaciju nervne cevi i organizaciju dodatnog embriona na ventralnoj strani

Ako se deo animalnog pola blastule izdvoji iz embriona i stavi na hranljivu podlogu nezavisno od dela vegetativnog pola, diferenciraće se neka ektodermalne strukture. Ali, ako se animalni i vegetativni eksplant stave jedan kraj drugog, diferenciraće se i mezodermalne strukture: tkivo horde, mišići, elementi krvi. Prvi znak diferencijacije u marginalnim mikromerama, prvi odgovor na indukčiju jeste pojava alfa aktina, specifičnog proteina mišićnih ćelija. Na vegatitivnom polu jajne ćelije Xenopusa otkriven je specifičan protein Vgl koji ima karakteristike induktorne supstancije a prisutan je i u makromerama.

To bi značilo da se prva indukcija vrši vrlo rano, još na stadijumu blastule, ali je za dalji tok diferencijacije potrebna i dodatna indukcija, koju vrši hordomezodermalno tkivo.

Iz larve Xenopusa je izolovana snažna induktorna supstancija XTC-ekstrakt koja, u eksperimentalnim uslvima, utiče na diferencijaciju mezodermalnih struktura.



Slika 11.17 – Ako se ćelije animalnog i vegetativnog pola amfiblastioule eksplantiraju nezavisno jedneod drugih, nema znakova diferencijacije mezoderma. Ako su eksplanti u kontaktu, u ćelijama granične zone javlja se alfa aktin, specifični protein mišićnih ćelija

Velike koncentracije XTCE indukuju stvaranje horde i dorzalne muskulature a manje koncentracije utiču na diferencijaciju ventralnih struktura: bubrega, krvnih elemenata i dr. Vrlo je verovatno da se i u embrionu javljaju ovakvi *gradijenti koncentracije* induktora koji određuju regionalno diferenciranje embrionalnih organa.

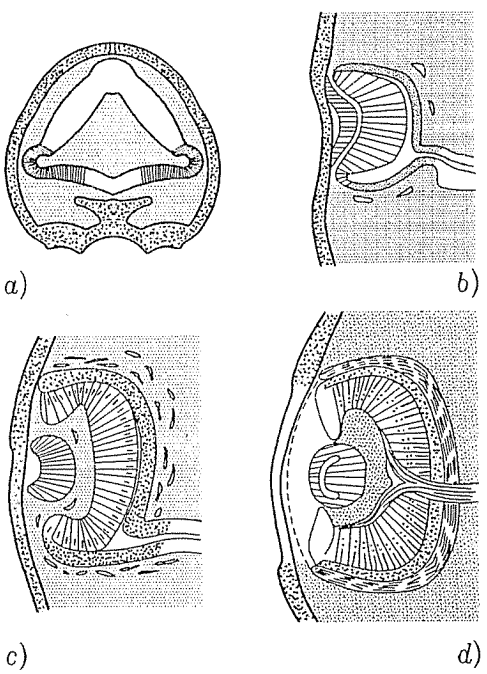
Interesantno je da su prve hemijske analize XTCE pokazale da ovaj sadrži proteine u kojima je jedan deo molekula (sekvence aminokiselina) identičan delovima molekula proteina Vgl i delovima molekula faktora rastenja (TGF).

Diferencijacija nervne cevi je jedna od najvažnijih indukcija. Tokom razvića u ektodermu se diferencira nervna ploča, ona se savija u nervni žleb a zatim zatvara u nervnu cev. U tom periodu (stadijum neurule) na regionalnu diferencijaciju nervne cevi utiče okolni mezenhim. U prednjem delu embriona glaveni mezenhim indukuje stvaranje tri moždana mehura: prednji, srednji i zadnji mozak i stvaranje očnog pehara. U središnjem i zadnjem delu diferencira se kičmena moždina. Ima podataka da mezenhim utiče na diferencijaciju "signalima", aktivitorima i inhibitorima, koji se pravilno smenjuju. Ko i kako kontroliše "signale", nije jasno.

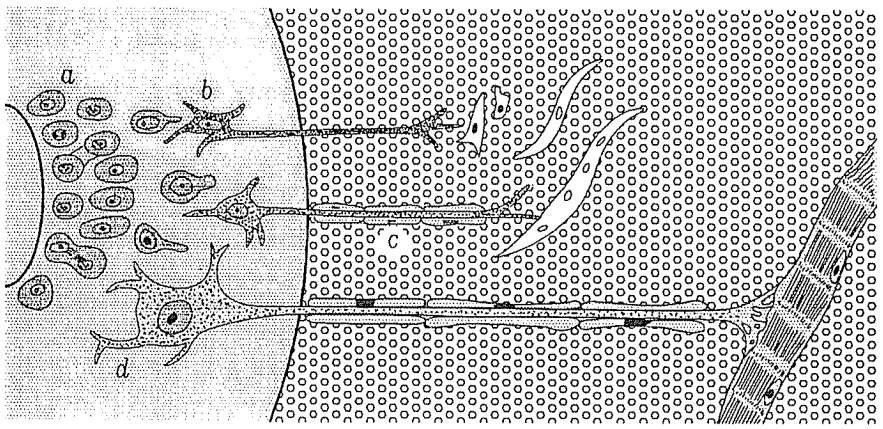
Pri oblikovanju složenih organa primarnu ulogu imaju procesi proliferacije ćelija, spajanja i odbijanja ćelija pa i smrt ćelija. Pri tim procesima različite ćelije dolaze u kontakt pa se stvaraju uslovi za sekundarne indukcije i lance indukcija (sl. 11.18).

Sigurno je da mnoge kongenitalne malformacije (ageneze, disgeneze i dr) nastaju zbog grešaka u ovim složenim interakcijama embrionalnih ćelija. Mada se intenzivno radi na otkrivanju "induktornih supstancija", očigledno je da su mehanizmi koji omogućavaju pravilno razviće mnogo kompleksniji a indukcije su samo jedan od tih mehanizama (sl. 11.19).

U poslednje vreme se znatna pažnja posvećuje molekulima CAM koji se javljaju na površini ćelija a regulišu spajanje i odbijanje ćelija. Ustanovljeno je da su to proteini, molekularne težine 125.000 – 250.000, specifični samo za embrionalna tkiva (E-CAM) ili za tkiva adulta (A-CAM). Neki od njih (L-CAM) utvrđeni su na ćelijama sva tri klicina lista, drugi samo na ćelijama ektoderma i mezoderma (N-CAM). Interesantno je da je u miševa sa poremećenom diferencijacijom malog mozga utvrđen jedan mutirani oblik CAM-a (sl. 11.20).



Slika 11.18 –Lanac indukcija. Pod delovanjem glavenog mezoderma, na prednjoj strani nervne cevi javljaju se očni mehuri (a) koji obrazuju očne pehare. U kontaktu sa ektodermom očni pehari indukuju diferencijaciju očnog sočiva (b); očno sočivo se odvaja od ektoderma i spušta prema očnom peharu. Ektoderm se zatvara iznad sočiva (c) i postaje prozračan, diferencira se u rožnjaču (d). Ako se lanac indukcije prekine, prestaje diferencijacija oka

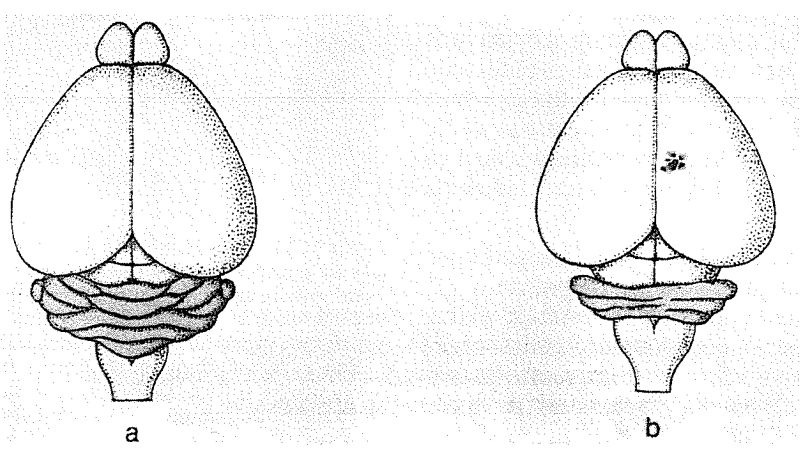


Slika 11.19 – Neki od mehanizama diferencijacije nervnih i mišićnih ćelija: proliferacija (a), migracija (b), interakcija (c); diferencirana ćelija (d)

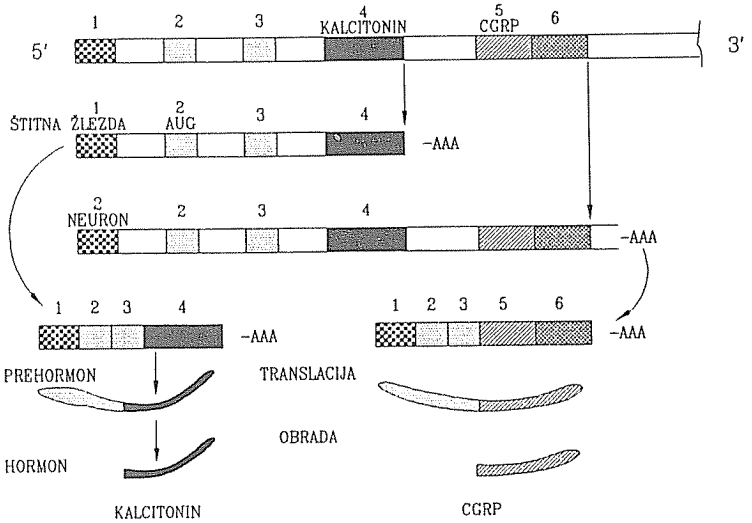
U svim delovima embriona sisara u kojima se odigravaju primarne i sekundarne indukcije zapaženo je da se količina, tip i raspored CAM-a vrlo dinamično menjaju. Ove promene mogle bi da utiču na spajanje i razdvajanje ćelija u organogenezi. Kako su molekuli CAM proteini, jasno je da tip, količina i raspored CAM-a moraju da budu pod kontrolom gena.

Obrada primarnog prepisa (posttranskripcija)

Rečeno je da u jedru postoje iRNK koje nikada neće biti prevedene u polipeptide. To znači da nakon transkripcije može da se izvrši odabir iRNK. Poznato je da u toku nuklearne sinteze primarnog prepisa treba da se za iRNK veže metilirani guanin (N7 metil-guanin ili CAP-struktura). Zatim, na kraj prepisa treba da se veže poliadeniiatni rep. U nekim genima postoji više od jednog mesta za vezivanje poliadenilata pa se, zavisno od toga koje se mesto aktivira, pre iRNK međusobom razlikuju. Tako, npr., jedan gen sa dva mesta za vezivanje poliadenilata daje dva genska produkta. U interfolikularnim ćelijama tiroideje koristi se prvo mesto a produkt je hormon kalcitonin. Isti gen u ćelijama nevnog tkiva



Slika 11.20 – Prikaz mozga normalnog (a) miša i miša sa mutacijom gena za CAM (ćelijske adhezivne proteine((b). Mutantni miš ima izrazito manji mali mozak, otežano se kreće i rano ugine



Slika 11.21 – Gen sa dva mesta za vezivanje "poliadenilatnog repa". U ćelijama tireoideje aktivno je prvo mesto; prepisana iRNK se prevodi u hormon kalcitonin. U ćelijama nervnog tkiva je aktivno drugo mesto a prepisana iRNK se prevodi u jedan neuropeptid (CGRP)

daje neuropeptid jer se koristi drugo mesto za vezivanje poliadenilata (sl. 11.21).

Primarni prepis, pre iRNK eukariota je znatno duži od iRNK koja dolazi na ribosome, jer sadrži kodirajuće i nekodirajuće sekvence, egzone i introne. Posebne male jedarne RNK (snRNK) omogućavaju da specifični enzimi iseku veze između introna i egzona tako da se definitivna iRNK sastoji samo od egzona. Ovakva, posttranskripciona obrada DNK moguća je i u uslovima in vitro pa su danas mnogi detalji procesa poznati, ali mehanizmi koji te procese kontrolišu i koji odabiraju primarne prepise koji će stići na ribosome nisu jasni.

Stabilizacija iRNK

Kada definitivno obrađen prepis iRNK dođe do citoplazme, on dospeva do ribosoma i počinje ***translacija.*** Molekuli iRNK se relativno brzo razgrađuju odnosno imaju kratak poluživot. Pod delovanje različitih faktora, iRNK mogu da se ***stabilizuju*** odnosno da im se produži poluživot.

Poznato je da hormoni deluju na sintezu kazeina, glavnog proteina mleka. Ako se kulturi ćelija epitela dojke dodaje prolaktin, one sintetišu oko 100 puta više kazeina nego ćelije koje ne dobijaju hormon. Međutim, njihovi geni prepisuju samo oko 3 puta više iRNK nego netretirane ćelije. Pošto intenzitet prepisivanja nije znatno povećan, jedino može biti da su iRNK za kazein u prisustvu prolaktina postale stabilnije, produžen im je poluživot i mogu da se duže koriste za translaciju. Tako je, npr., u mlečnim žlezdama pacova poluživot iRNK za kazein u prisustvu LTH oko 92 sata, a bez efektora 5 sati.

Kontrola translacije takođe postoji. Ranije je rečeno da ovocit priprema iRNK koje se koriste tek posle oplođenja u prvim fazama brazdanja. Znači da iRNK mogu da se blokiraju. Ako su za translaciju neophodni ribosomi, onda intenzitet transkripcije rRNK, sinteza proteina za ribosome, prisustvo različitih proteinskih faktora inicijacije, elongacije, terminacije, prisustvo sintetaze, tRNK, jona magnezijuma, ili amonijuma, GTP-

a, ATP-a' hormona i dr. mogu da utiču na intenzitet translacije.

Regulacijom translacije može da se vrši selekcija iRNK koja će se prevesti u protein. Tako, npr., ako se ćelije izlože visokoj temperaturi (naravno, ne višoj od 42C), prestaje sinteza mnogih proteina, ali se selektivno vrši intenzivna sinteza proteina temperaturnog šoka. Pretpostavlja se da ovi proteini adaptiraju ćeliju na uslove više temperature i nakon 2 sata uspostavlja se normalna biosinteza u ćeliji.

Kontrola posttranslacije

Najzad, kada je iRNK prevedena u polipeptid, može da se kontroliše ***obrada*** primarnog polipeptidnog lanca ***(posttranslacija)*** (sl. 11.21). Tako, npr., primarni lanac preproinsulina mora da izgubi 23 aminokiseline da bi prešao u proinsulin, a proinsulin, koji se sastoji od lanaca B, C i A, mora da se "obradi" odnosno da izgubi lanac C da bi prešao u aktivni insulin. Enzimi koji isecaju aminokiseline, njihovo prisustvo i njihova biološka aktivnost mogu da budu značajni regulatori u produkciji aktivnog hormona.

Regulacija posttranslacije, iako se o njoj još malo zna, sigurno učestvuje u složenom procesu regulacije ekspresije gena.

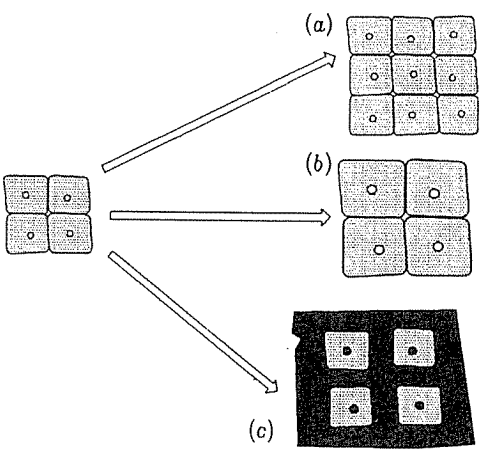
Savremena ispitivanja regulacije aktivnosti gena prvenstveno su usmerena na proučavanje regulatornih sekvenci DNK-promotora i enhancera (pojačivača). Promotori su detaljno proučeni, utvrđeni su redosledi nukleotida promotora a zna se da oni omogućavaju vezivanje RNK-polimeraze i određuju mesto inicijacije transkripcije. O enhancerima se manje zna. Oni mogu biti udaljeni od gena koji se prepisuje i za nekoliko hiljada parova nukleotida a mogu da budu iste orijentacije kao gen ili suprotno orijentisani. Enhanceri su otkriveni i ispituju se u virusa, prokariota i eukariota.

RAST

Ranije je rečeno da su diferencijacija i rast dva osnovna procesa koja omogućavaju embrionalno razviće. Podaci prikupljeni tokom poslednjih desetak godina pokazuju da je i rast, pomoću koga se oblikuju tkiva, organi i embrion u celini, kao i diferencijacija, uslovljen sintezom specifičnih proteina, odnosno da je pod kontrolom nasledne osnove, genoma. Osim genetičkih faktora, na rast utiču i drugi činioci, posebno hormoni i ishrana.

Rast je posledica (a) umnožavanja broja ćelija (deoba ćelija), (b) povećanja samih ćelija i (c) povećanja količine međućelijskog matriksa. U morfogenezi se najčešće istovremeno odvijaju sva tri procesa (sl. 11.22).

Umnožavanje ćelija (proliferacija) kao mehanizam rasta detaljno je ispitano tokom diferencijacije nervne cevi embriona pileta. Ćelije nervne ploče se intenzivno dele pa se svakih osam časova broj ćelija udvostruči, što dovodi do širenja ovog embrionalnog začetka u cefalokaudalnom pravcu. U tom periodu su sve neuro-



Slika 11.22 – Shematski prikaz tipova rasta: umnožavanje ćelija (proliferacija (a); rast ćelija (hipertrofija (b) i povećanje međućelijske supstance (acervacija) (c).

epitelne ćelije sposobne za deobu. Kad počne zatvaranje nervne cevi, neuroepitelna ćelija se podeli na dve ćelije kćerke, od kojih jedna zadržava sposobnost deobe, a druga prestaje da se deli, migrira u periferni deo nervne ploče. Jedro te ćelije postaje krupno i svetlo i sadrži veliki, taman nukleolus. Ove ćelije su budući neuroblasti. Kada se nervna cev definitivno zatvori, neke od neuroepitelnih ćelija se diferenciraju u glija- ćelije, tako da ima vrlo malo tipičnih neuroepitelnih ćelija. Dalje rast nervne cevi ostvaruje se prvenstveno rastom neuroblasta.

Rast ćelija kao mehanizam kojim se omogućava rast embriona nije tako čest. Izuzetak su neke vrste (npr., valjkasti crvi), u kojih je dokazano da embrionalne ćelije imaju strogo ograničen broj deoba, koji je genetski kontrolisan. Poznato je da dečija glista ima, npr., protonefridije koje predstavljaju jednu jedinu diferenciranu ćeliju dužine 30-40 cm.

U kičmenjaka, rast ćelija je zastupljen u diferencijaciji očnog sočiva kada ćelije intenzivno rastu jer se u njima nakupljaju specifični proteini-kristalini. I već pomenuti neuroblasti rastu, u citoplazmi im se razvija moćan Goldžijev-predeo i jako razvijena endoplazmatična mreža a nakuplja se i Nisslova supstancija. Od tela ćelije izrastaju dendriti i neurit. Diferencirana ćelija prestaje da se deli. Smatra se da piramidalne ćelije korteksa ili Purkinjeove ćelije malog mozga mogu da se povećaju 5-10 puta.

Nakupljanje međućelijske supstancije kao mehanizam rasta najizraženije je u procesu obrazovanja hrskavice.

Kontrola rasta

Ako se ima u vidu da mnogi morfogenetski procesi, invaginacija, evaginacija, migracija i dr., zavise od diferencijalnog rasta različitih delova embriona, onda ovaj proces mora da bude strogo kontrolisan. Danas se smatra da se kontrola vrši u "odeljcima" (compartment), delovima embriona koji se razvijaju u određene strukture. Prema podacima dobijenim na beskičmenjacima (valjkasti crvi, drozofila), unutar odeljaka ćelije primaju određene "instrukcije", signale, i u skladu sa tim signalima se umnožavaju i diferenciraju.

U kičmenjaka je dokazano da postoje pozicione informacije. Tako, npr., u prednjem delu embriona diferenciraju se prednji ekstremiteti, u zadnjem zadnji. I jedni i drugi imaju iste embrionalne začetke: epitel i mezenhim. Mezenhim se diferencira u mišiće, kosti, krvne sudove, vezivno tkivo. Ali, ako se pupoljak noge presadi embrionu pileta u predeo krlia, razviće se ekstremitet koji više liči na nogu nego na krilo. Znači da je začetak dobio "pozicionu infomrmaciju" pa se u drugom delu embriona diferencira u skladu sa primljenom informacijom. Interesantno je da se kod repatih vodozemaca ta informacija zadržava i kod odrasle životinje. Ako odraslom tritonu odsečemo nogu, noga regeneriše. Najviše podataka o makromolekulima koji regulišu rast dobijeno je u ispitivanjima malignih tkiva, ali dokazano je da i normalna tkiva stvaraju takve supstancije, samo u znatno manjim količinama.

Danas su mapirani geni za faktore rasta. Neki od njih u jednom tkivu stimuliraju, a u drugom koče rast, neki deluju samo na određen tip ćelija, kao npr., ranije pomenuti NGF ili EGF, koji deluje na rast i deobu ćelija različitih tkiva.

U vrlo opsežnim ispitivanjima in vitro i in vivo na modelu mijeloidnih, prekursorskih ćelija (ćelije kostne srži) dokazano je da postoje različiti faktori rasta (FR) i faktori diferencijacije (FD). Tokom embrionalnog razvića najveći deo ovih faktora sintetišu ekstraembrionalna tkiva, ali oni mogu biti deponovani u

ćelijama i međućeijskom matriksu i embriona i adulta.

Dokazano je da tokom mijelogeneze deluje nekoliko FR zavisno od a) tipa ćelije (npr., poseban faktor za makrofage i za granulocite); b) poseban FR deluje na ćelije određenog klona sa različitim ograničenjem razvojnih potencija (znači, ćelije na različitom stupnju diferencijacije) i c) da FR deluju usklađeno sa faktorima diferencijacije. Ovakva složena interakcija obezbeđuje ravnotežu između zrelih i nezrelih obilka krvnih ćelija. Mapiranjem gena za FR i FD ustanovljeno je da sintezu ovih proteina regulatora kontrolišu familije gena.

Delovanje FR i FD, testirano je na životinjama pa se pretpostavlja da bi se oni mogli primenjivati u različitim patološkim stanjima čoveka: u bolesnika sa poremećenom mijelopoezom, u onih tretiranih citostaticima ili imunosupresivnim lekovima, pri transplantaciji kostne srži i dr.

Primenom FR moglo bi da se ubrza umnožavanje ishodnih ćelija. Prvi pokušaji su imali dobar efekat kod bolesnika od side sa izraženom leukopenijom.

Primenom FD dobijeni su povoljni rezultati kod miševa obolelih od jednog oblika leukemije. Faktori diferencijacije su ubrzavali prelaz nezrelih ćelija u zrele oblike, koji prestaju da se dele (ranije je napomenuto da je intenzitet ćelijskih deoba utoliko manji ukoliko je stupanj diferencijacije ćelije viši).

U testisu je otkriven specifičan faktor rasta testisa (SGF) koji deluje u embrionalnoj gonadi ali i tokom života adulta omogućava intenzivno umnožavanje spermatogonija. Ranije smo pomenuli i AP1-protein čoveka, GCN4-protein kvaščevih gljivica, PFGD, faktor rasta krvnih pločica i dr. Neki od njih verovatno deluju direktno na genom ćelije. Za većinu je neophodno da ćelija koja prima informaciju za rast ima na ćelijskoj membrani receptore za faktore rasta. Promene u sintezi faktora rasta, u količini i rasporedu njihovih receptora, mogle bi da budu presudne u regulaciji rasta i diferencijacije.

Treba istaći da su dosadašnja ispitivanja ukazala na sličnost regulatornih molekula u čitavom živom svetu. Ta sličnost se odnosi na određene delove molekula ***homeodomene***. Tako, npr., faktor X, koji sintetišu Sertolijeve ćelije embrionalnog testisa i koji sprečava razviće (inhibira rastenje) Mllerovih kanala u mužjaka, ima deo molekula kao TGF (faktor koji ima ulogu u diferencijaciji mezoderma pri oblikovanju ekstremiteta i srca, u zarašćivanju rana i dr). To bi značilo da su osnovni mehanizmi koji deluju u toku embriogeneze metazoa u osnovi slični. Sa usložnjavanjem organizama tokom evolucije, usložnjavala su se i embrionalna zbivanja i makromolekuli koji kontrolišu razviće, odnosno, morali su da evoluiraju i geni koji kontrolišu biosintezu kontrolnih makromolekula. Smatra se da bi faktori rasta, zapaljenjskih procesa, indukcije, diferencijacije i dr. bili produkti familije / familija gena nastalih tokom evolucije duplikacijom ili prerasporedom nekih *pragena*. Zajedničko poreklo regulatornih molekula može da objasni kako insulin govečeta (sisara) može da prepozna receptore na ćelijama drozofile i da aktivira te ćelije.

POREMĆAJI RAZVIĆA

Razviće svakog organizma odvija se po specifičnom planu koji je upisan u genomu zigota, a to znači da je kontrolisano naslednom osnovom, i zavisi od tačnosti informacija sadržanih u genomu ploda. Informacije se prevode u brojne strukturne i funkcionalne proteine, od čijeg biološkog kvaliteta zavisi uspešnost razvića. Greške u genomu odraziće se u prekidu embriogeneze (smrt ploda) ili će

se roditi nova jedinka sa kongenitalnim anomalijama. Anomalije nastaju zbog: a) pogrešne informacije (mutacije gena), b) pogrešnog prevođenja informacije (posttranskripcione greške), c) nedostatka informacije (hromosomske aberacije) ili zbog izmenjene količine informacije (aneuploidije). Čak i ako su svi navedeni uslovi korektni, ipak može da dođe do greške u razviću pod uticajem različitih činilaca sredine, kao, npr., zbog nedostatka gradivnih molekula u ćeliji (aviteminoze, antimetaboliti i sl).

Poremećaji razvića variraju od mentalne retardacije do teških kongenitalnih anomalija, često inkompatibilnih sa životom. Zavisno od uzroka nastanka, ovi poremećaji su svrstani u četiri grupe i mogu da budu posledica:

a) genskih mutacija (npr., hondrodistrofija, albinizam i dr),

b) hromosomskih aberacija (Downov sindrom, sindrom mačijeg plača i dr),

c) delovanja štetnih faktora sredine (ishrana, lekovi i dr. hemijski, fizički i biološki činioci kao, npr., katarakta izazvana virusom rubeole i slično),

d) multifaktorijalnih činilaca (poligeni i faktori sredine, npr., iščašenje kuka).

Rečeno je da su dva najvažnija procesa razvića, diferencijacija i morfogeneza, pod kontrolom gena. U patuljastih miševa zbog jedne genske mutacije ne diferenciraju se eozinofilni granulociti a zbog mutiranih CAM (ćelijskih adhezivnih molekula) poremećena je organizacija ćelija u malom mozgu. Genske mutacije su dokazane i u ptica sa deformisanim kljunom ili sa polidaktilijom.

Interesantno je da neki hemijski molekuli mogu da izazovu iste greške u organogenezi kao i genske mutacije (fenokopije) ili da nekoliko različitih genskih mutacija rezultira istim fenotipom (genokopije).

U eksperimentima na miševima dokazano je da mutirani *lu*-gen u heterozigotnom stanju uzrokuje polidaktiliju zadnjih ekstremiteta (mali poremećaj) a u homozigotnom stanju dovodi do hemimelije tibije. FUDR (analog baza u DNK 5 fluorouracil) apliciran u maloj dozi takođe izaziva polidaktiliju, dok veće doze izazivaju hemimeliju tibije. Međutim i male doze FUDR-a dovode do hemimelije ukoliko je životinja heterozigotna za lu-gen.

Poznatno je da male doze sintetskog progestina mogu da izazovu maskulinizaciju nekih beba, dok su kod drugih bez ikakvog efekta. Pretpostavlja se da bi maskulinizirane bebe mogle da budu heterozigoti za recesivan gen za adrenogenitalni sindrom. U heterozigotnih jedinki ovaj gen nema fenotipsku ekspresiju, ali dodatni stimulans (egzogeni progestin) omogućava maskulinizaciju.

Jedan od značajnih faktora razvića je i sinhronizovanost morfogenetskih procesa. Da bi se formirao bubreg, ureteri moraju u pravo vreme da dođu u kontakt sa nefrotomom (mezodermalna osnova bubrega). Ako se ne ostvari kontakt, dolazi do ageneze bubrega.

U embriona muškog pola polni odvodi i spoljašnje genitalije diferenciraju se pod delovanjem embrionalnih androgena. Danas se zna da sintezu proteinski nosača za androgene kontrolišu geni na X-hromosomu. Ako je taj gen mutiran, nema nosača i ciljne ćelije ne reaguju na hormone. Genotipski (XY) i gonadni (testis) muški plod imaće ženski fenotip. U čoveka je ovaj sindrom nazvan sindrom testikularne feminizacije (STF).

U genomu postoje i pleiotropni geni. Mutacija pleiotropnog gena ima višestruko delovanje na fenotip. Tako, npr., osobe sa van Hoeveovim sindromom imaju greške u okoštavanju, imaju plavu rožnjaču i nagluve su. Mada se ne zna uzrok ovih poremećaja, pretpostavlja se da bi pleiotropni gen mogao da kon-

troliše sintezu proteina koji je jedna od subjedinica više različitih polimernih enzima. Nedostatak te subjedinice ili mutirana subjedinica dovela bi do greške u diferencijaciji različitih tkiva i organa za koju su enzimi bili potrebni.

Druga pretpostavka je da bi produkt pleiotropnog gena mogao da ima ulogu u ranoj embriogenezi, npr., pri diferencijaciji klicinih listova ili determinaciji polja organa. U tom slučaju, derivati tog klicinog lista ili tog embrionalnog polja, morali bi da budu defektni.

Embrionalno razviće počinje sa oplođenom jajnom ćelijom, zigotom. Kvalitet zigota zavisi od kvaliteta roditeljskih gameta. Aberantni gameti ili nisu sposobni za oplođenje zbog izmenjene morfologije (spermatozoid bez repa, sa dva repa, sa dve glave, bez akrosoma i slično, jajna ćelija sa dva ili više jedara) ili zbog velikog genetičkog disbalansa. Takvi gameti brzo propadaju (gametopatije). Međutim, neki aberantni gameti mogu da učestvuju u oplođenju i tad obrazuju aberantni zigot koji može da ugine ili može da nastavi razviće odnosno počinje da se brazda. Genetičke greške u takvom plodu mogu da se izraze na stupnju blastocita (blastopatije). Opisani su slučajevi blastocista bez embrioblasta, sa pogrešno orijentisanim embrionalnim diskom, sa defektnim trofoblastom itd. Ovakav blastocist ili ugine pre implantacije ili se odbaci neposredno posle implantacije. Trofoblast može i da hipertrofira i obrazuje hidatiformnu molu ili jedan od najagresivnijih tumora, horioepiteliom.

Plodovi odbačeni u ovom ranom periodu embriogeneze vrlo često se eliminišu sa prvom menstruacijom, tako da se ne zna koliko embriona propada. Postoje podaci da se na ovaj način eliminiše preko 50% začetaka.

Ako aberantni plod nastavi da se razvija i preživi preembrionalnu fazu (od zigota do diferencijacije klicinih listova), ulazi u embriogenezu, kad su najizrazitiji procesi diferencijacije i morfogeneze. Kako oba procesa zavise od genoma ploda, genetičke greške dolaze do punog izraza (embriopatije). Plodovi koji se spontano odbacuje do trećeg meseca trudnoće u preko 60% slučajeva imaju greške u broju i strukturi hromosoma. Ovaj period je i najosetljiviji na delovanje činilaca spoljašnje sredine.

U periodu organogeneze različita tkiva i organi na različite načine odgovaraju kako na greške u naslednoj osnovi tako i na faktore sredine. Najveću osetljivost imaju oni organi koji imaju složenu i dugu genezu: srce, oko, ušna školjka, sekundarno nepce, šake, stopala i dr.

Eksperimenti na pacovima pokazuju da je period od 7 do 9 dana kritičan za CNS i srce a urinarni trakt je najosetljiviji od 9 do 11 dana embriogeneze. Talidomid je lek koji je izazvao pravu epidemiju kongenitalnih anomalija. Na osnovu analize novorođene dece i vremena kada su njihove majke uzimale talidomid, utvrđeni su kritični periodi razvoja nekih organa čoveka.

U fetalnom periodu plod je manje osetljiv i na genetičke greške i na faktore sredine. Ipak, oni organi koji u tom periodu sazrevaju, posebno mozak i urogenitalni organi, i dalje ostaju osetljivi (fetopatije).

12

Imunogenetika

U toku evolucije u svih kičmenjaka a posebno sisara razvio se veoma složen sistem odbrane *imuni sistem.* Primarna funkcija imunog sistema je da prepozna i štiti organizam od bilo kog mikroorganizma ili neke druge strane materije koji dospevaju u telo. Strane materije koje pobuđuju imuni odgovor označene su kao *antigeni.* Imuni sistem obuhvata dva odbrambena mehanizma protiv antigena: humoralnu i celularnu odbranu. U humoralnoj odbrani u B-limfocitima ili plazma-ćelijama sintetišu se specifična antitela koja se vezuju za antigene i inaktiviraju ih ili ih razaraju. U celularnoj odbrani učestvuju T-limfociti koji imaju specifične receptore na svojoj površini koji im omogućavaju prepoznavanje, vezivanje i razaranje antigena.

Ovaj sistem odbrane ima i druge važne funkcije: tako, npr. štiti integritet vrste jer sprečava kontakt gameta koji pripadaju različitim vrstama. Isto tako, pomoću ovog sistema organizmi eliminišu i sopstvene ćelije u kojima se obrazuju neuobičajni molekuli, npr. maligne ćelije, odbacuje transplantirana tkiva i organe i dr.

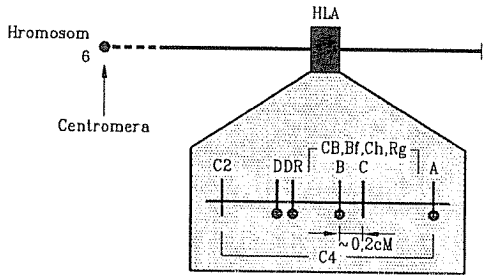
Ulazak antigena u organizam pokreće niz imunoloških zbivanja u oba tipa imunološkog odgovora (humoralnom i celularnom) koji imaju različit udeo u tim reakcijama. Svi ovi procesi su pod kontrolom gena, koji kontrolišu sintezu tkivnih antigena, sposobnost prepoznavanja antigena koji ugrožava organizam, regulaciju sinteze antitela, kao i kontrolu interakcije i saradnje limfoidnih ćelija u toku imunološkog odgovora.

Kompleksni genski lokusi

Jedan kompleksni genski lokus na kratkim kracima hromosoma br.6 čoveka, koji obuhvata niz vezanih gena, kontroliše sve pomenute funkcije osim sinteze antitela.

Ovaj kompleksni genski lokus naziva se HLA-sistem (humani leukocitarni antigen ili glavni sistem histokompatibilnosti – GSH sl. 12.1).

Smatra se da je HLA-sistem jedan od najsloženijih genskih sistema u čoveka, predstavlja kodominantne blisko vezane gene. Oni kontrolišu sintezu tkivnih antigena koji ulaze u sastav ćelijskih membrana. Glavni geni HLA-sistema su HLA-A, HLA-B i HLA-C, čiji se antigeni nalaze na membranama svih ćelija čoveka i čine I klasu antigena HLA-sistema. Antigeni – produkti HLA-D i HLA-DR lokusa se nalaze samo na određenim ćelijama kao što su B-limfociti, monociti, makrofagi, spermatozoidi i epitelne će-



Slika 12.1 – Genetička mapa složenog HLA lokusa na hromosomu 6 čoveka

lije; oni čine II klasu antigena HLA-sistema.

Svi pomenuti geni HLA-sistema imaju više alelomorfnih oblika; drugim rečima, čine sistem multiplih alela i predstavljaju izrazito polimorfan genski sistem. Bez obzira na veliki broj alela, na jednom hromosomu se nalazi samo jedan alelni oblik datog gena. Svi geni HLA-lokusa na jednom hromosomu su označeni kao haplotip i oni se najčešće zajedno nasleđuju na mendelski način. Na primer, osoba koja ima genotip

A1 B8
A3 B17

daće gamete A1 B8 i A3 B17. Međutim, iako su ovi geni blisko vezani, ipak može doći do crossing overa i razdvajanja gena. U tom slučaju se u potomaka može javiti rekombinacija A3 B8 odnosno A1 B17.

Neki aleli HLA-sistema se javljaju u skoro svim humanim populacijama, kao što je, npr., alel A2; drugi međutim, karakterišu samo određene populacije, npr. aleli Aw43 i Bw42 pojavljuju se isključivo u afričkih crnaca.

Ustanovljeno je takođe da su osobe sa specifičnim haplotipom podložnije određenim bolestima od drugih; tako, npr., uočeno je da se Hodgkin-ova bolest javlja češće u osoba koje imaju HLA-Al alel, dok se myasthenia gravis susreće češće u osoba sa HLA-DRw3 alelom.

Familije gena

Pored gena koji se pojavljuju samo jednom u haploidnom genomu eukariota, postoji izvestan broj zančajnih gena koji se javljaju u dve ili više kopija a identični su ili vrlo slični po redosledu nukleotida. Takve grupe gena su označene kao *familije gena.* Veruje se da su familije gene nastale od zajedničkih predačkih sekvenci (ancestralnih gena) procesom duplikacija i naknadnih mutacija. U nekim slučajevima geni koji se ponavljaju ostaju zajedno a u drugim njihova veza je prekinuta i oni mogu biti čak i na posebnim hromosomima. Dobro proučeni primeri familije gena su: geni specifičnih imunoglubulina koji se nalaze u čoveka na hromosomima 2, 14 i 22, geni HLA-sistema (geni histokompatibilnosti) smešteni su na kratkom kraku hromosoma 6, geni za hemoglobine na hromosomima 11 i 16 a ribosomski geni (r-DNK), kako je ranije naglašeno, nalaze se na kratkim kracima akrocentričnih hromosoma D- i G-grupe.

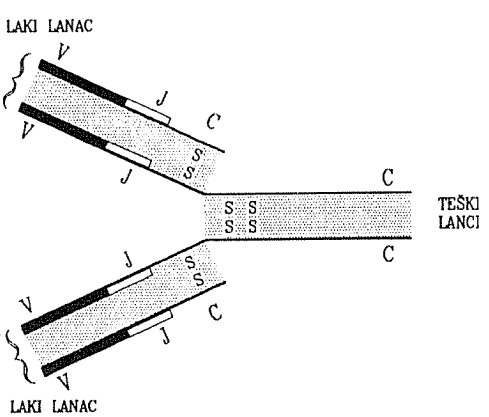
Poznato je da je jedna od značajnih karakteristika genoma viših eukariota njegova postojanost. Metodom hibridizacije DNK je dokazano da je struktura gena u germinativnim ćelijama ili u embrionalnom tkivu identična strukturi ispitivanih gena u diferenciranim ćelijama odnosno da prerasporedi genetičkog materijala nisu značajan činilac u diferencijaciji. Izuzetak predstavlja jedna važna grupa gena u sisara, geni koji sadrže informaciju za polipeptidne lance antitela. Antitela su klasa proteina iz grupe imunoglobulina a produkuju ih B-limfociti, ćelije koje se diferenciraju iz ćelija koštane srži. Ukoliko neki mikroorganizam ili strana materija dospe u organizam, ona deluje kao antigen i izazaiva specifični imuni odgovor koji je ispoljen u stvaranju antitela. Populacija B-ćelija se deli u veliki broj različitih klonova a svaki klon potiče od jedne ili nekoliko

ćelija koje stvaraju jedinstvena antitela. Poznato je da se inicijalni odgovor B-ćelija na antigen odvija posredstvom receptornog proteina koji se nalazi na ćelijskoj membrani; kada receptor B-ćelije dođe u kontakt sa antigenom determinantom (deo antigena koji se direktno vezuje za antitelo), B-ćelija se deli u brojnu populaciju plazma-ćelija. Plazma-ćelije sintetišu i luče slobodne molekule antitela koji su specifični za istu antigenu determinantu. Antitela se vezuju za antigen i na taj način se stvara kompleks koji vrši razaranje ili neutralizaciju antigena. Interesantno je da su antitela identična sa receptorima B-ćelija za koje je antigen prvobitno bio vezan (koji je podstakao imuni odgovor). Razlike su uočene samo u delu lanca aminokiselina kojima se receptorni protein pričvršćuje za membranu B-ćelije; taj deo nije nađen u solubilnom antitelu. Receptori B-ćelija, kao i molekuli antitela, spadaju u imunoglobuline. Klonovi B-ćelija proizvode sve moguće tipove antitela (praktično, ljudski organizam je sposoban da se brani od svih antigena koji ga ugrožavaju), dok svaki individualni klon produkuje samo jedan tip antitela. Smatra se da se odgovor na strani činilac – antigen sastoji u selekciji i diferencijalnom umnožavanju samo onih ćelija koje su sposobne da produkuju odgovarajuća antitela.

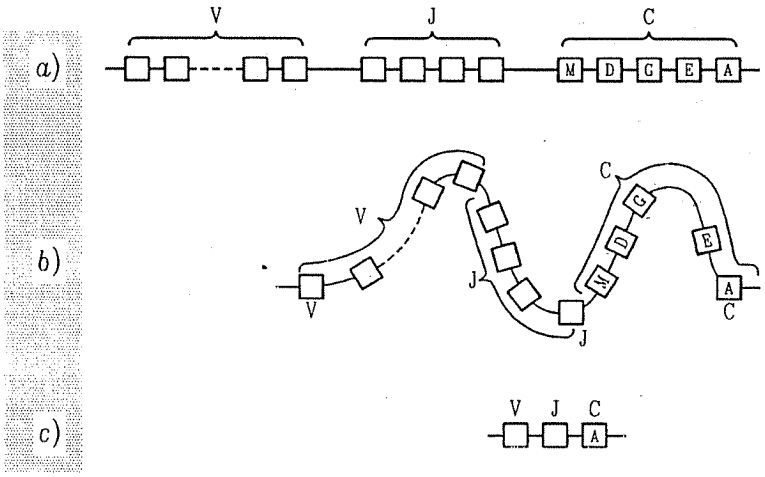
Molekuli imunoglobulina se sastoje od dva identična teška (H) lanca, koji se sastooje od oko 500 ostataka aminokiselina, i dva identična laka (L) lanca, sagrađena od 250 ostataka aminokiselina. Ovi lanci su povezani disulfidnim vezama. Zahvaljujući relativno velikom broju disulfidnih veza, imunoglubilini su postojani molekuli. Svaki imunoglobulin ima tri regiona, varijabilni (V) region koji se kombinuje (vezuje) sa antigenom i konstantni (C) region koji se ne povezuje sa antigenom. Ova dva dela spaja J (junction) region (sl. 12.2).

U čoveka se razlikuje pet glavnih klasa imunoglobulina: IgG, IgM, IgA, IgD, IgE. Klasifikacija imunoglobulina vrši se na osnovu konstantnih regiona njihovih teških lanaca; nekoliko od ovih mogu se dalje deliti u supklase.

U čoveka i drugih sisara postoje dve vrste lakih lanaca označenih sa kapa (K) i lambda (λ) i najmanje sedam vrsti teških lanaca – alfa (d), nekoliko vrsta gama (γ, γ2b, γ2a, γ3), delta (δ) i m (μ) lanci. Na osnovu ispitivanja građe antitela i specifičnosti imunoglobulinskih reakcija pretpostavilo se da svaki polipeptidni lanac imunoglobulina kontrolišu dva različita strukturna gena: gen V i gen C. U čoveka se na hromosomu broj 14 nalazi grupa od desetak gena za konstantni (C) region teškog (H) lanca i brojni geni za varijabilni (V) region. Geni za V-region se nalaze na određenom odstojanju od CH-gena. Na hromosomu br. 22 su lokalizovani geni koji kodiraju konstantni (C) region lambda lakog lanca, a na određenom odstojanju grupa od sto i više gena za variijabilni region (V) lambda lanca. Geni za sintezu konstantnog (C) i varijabilnog (V) dela kapa lanca locirani su na hromosomu br. 2. DNK sekvence varijabilnih regiona lakih lanaca (kapa i lambda) sadrže i treći (J) segment za spajanje a varijabilnli region teških la-



Slika 12.2 – Model strukture antitela čoveka



Slika 12.3 – Geni za imunoglobuline a) nediferencirani limfocit, b) rekombinacija u toku diferenciranja B limfocita c) zreo B limfocit

naca pored J-segmenta sadrže vrlo kratke sekvence označene kao D-sekvence. Pretpostavlja se da geni koji determinišu segment D predstavljaju multiple kopije između VH- i JH-gena u DNK germinativnih ćelija. Ako više od jednog gena daje inforamciju za jedan polipeptidni lanac imunoglobulina, postavlja se pitanje na kom se nivou obavlja spajanje, tj. da li na nivou gena, i-RNK ili gotovih polipeptida.

Na osnovu eksperimentalnih podataka skoro je sigurno da se spajanje gena V i C obavlja na nivou DNK molekula. Tonegawa je prvi pokazao da su geni za varijabilni i konstantni deo imunoglobulina odvojeni u germinativnoj ćelijskoj liniji, dok su kontinuirani u ćelijama koje produkuju antitela odnosno u plazma-ćelijama, što bi značilo da se u toku diferenciranja B-ćelija dešava proces ireverzibilne rekombinacije DNK, odnosno javlja se delecija segmenta između V i C gena (sl. 12.3).

U lakim lancima povezivanje gena V i C se ostvaruje uz pomoć segmenta za spajanje (J) a pri formiranju kontinuiranih gena za teške lance imunoglobulina pored segmenta za spajanje (J) uključuje se i segment D. Na osnovu ovog možemo zaključiti da genetička kontrola sinteze polipeptidnih lanaca imunoglobulina predstavlja izuzetak od opšte koncepcije jedan gen-jedan polipeptidni lanac i da se ostvaruje po principu dva gena – jedan polipeptidni lanac.

Proces stvaranja kontinuiranih gena za imunoglobuline odvija se u dve etape; najpre se povezuje jedan od brojnih gena za varijabilni region (V) sa genom za spajanje (J), koji je lokalizovan blizu C gena na istom hromosomu. Zatim se VJ-sekvence spajaju sa jednim od gena za konstantni (C) deo; na ovaj način dobija se VJC-region DNK na kome se transkribuje jedinstven molekul i-RNK za imunoglobuline.

13

Onkogenetika

Pod *neoplazmom* se podrazumeva tumorska tvorevina koja se odlikuje abnormalnim rastom a može da bude: a) dobroćudna (benigna), koja raste do određene veličine, kada prestaje da raste ili pretrpi regresiju (tumori samoregulatori), i b) zloćudna (maligna) – rak (sa neograničenim rastom). U odsustvu supresorne kontrole susednih, normalnih ćelija i tkiva, rak predstavlja invazivnu tvorevinu koja se širi na račun normalnog tkiva, a preko krvotoka, limfotoka i cerebrospinalne tečnosti maligne ćelije dolaze i u druge delove organizma (metastaze).

Neoplazme se javljaju ne samo u čoveka već i u biljaka, beskičmenjaka i kičmenjaka.

Maligne bolesti (rak), posle kardiovaskularnih bolesti, najčešći su uzrok smrti savremenog čoveka. Primarno, to su bolesti naprednih civilizacija sa produženim životnim vekom. Mada se rak javlja u svim životnim dobima, čak i u novorođene dece, ipak je znatno češći u osoba u poznim godinama. Prema dosadašnjim zapažanjima, čini se da sa produžavanjem životnog veka rastu izgledi za pojavu maligniteta.

Danas postoji dovoljno dokaza da genetička konstitucija jednog organizma može imati značajnu ulogu u pojavi različitih malignih neoplazmi.

Rak je klinički veoma raznovrsno oboljenje. Javlja se u različitim tkivima i zahvata različite organe. Najčešće nastaje malignom transformacijom ćelija koje nisu definitivno diferencirane i koje su sposobne za deobu (npr., germinativne ćelije kože, crvenog epitela, kostne srži i dr.).

Klonalno poreklo tumora

Danas je opšte prihvaćeno mišljenje da tumori imaju klonalno poreklo, tj. da ćelije tumora nastaju od jedne ćelije ili od malog broja normalnih, ancestralnih ćelija. Te ćelije prolaze kroz fazu maligne transformacije i stiču niz novih svojstava, od kojih su najupadljivija brzi rast i nekontrolisana deoba.

U prilog monoklonalnog porekla tumorskih ćelija govori i eksperiment na životinjama pa je tako dokazano da jedna jedina tumorska ćelija (ćelija teratokarcinoma testisa), uneta u trbušnu duplju miša, zadržava maligna svojstva i obrazuje nov tumor. Rezultati ispitivanja tumorskih ćelija žena heterozigotnih za određeni enzim (sa različitim X vezanim alelima) pokazuje da je u svim ćelijama tumora inaktivan isti X-hromosom, od-

nosno da tumor ima monoklonalno poreklo.

Karakteristike malignotransformisane ćelije. Najupadljivije razlike između normalne i maligno-transformisane ćelije su:

a) *Maligna ćelija nenormalno raste,* nepravilno se i neograničeno puta deli. Deobe izmenjene ćelije pokazuju čitav spektar abnormalnosti: mogu da budu multipolarne, česta su anafazna zaostajanja hromosoma, javljaju se anafazni mostovi; česte su endomitoze i endoreduplikacije. Sve to govori da su ozbiljno poremećene replikacija hromosoma i doba ćelije.

b) *Jedra ćelija su izmenjena,* obično sa viškom genetskog materijala. Takva jedra su krupna, džinovska. Jedra mogu da budu mala, može da ih bude više u ćeliji.

c) *Nukleolusi su obično krupni* a broj nukleolusa se poveća. To znači da je biosinteza proteina pojačana.

d) *Metabolizam ćelija je izmenjen.* Neki proteini prestaju da se sintetišu a javljaju se novi proteini. Unošenje glikoze u ćeliju je pojačano. Glikoliza ima prednost nad oksidativnom fosforilacijom i sl.

e) *Na površini ćelije se javljaju novi antigeni,* što znači ili da je u genom ćelije uključen strani genetski aparat (epizom), ili da su aktivirani geni koji do tada nisu funkcionisali, ili su reaktivirani geni koji su prestali da funkcionišu (npr., geni za fetalne proteine).

f) *Ćelija menja oblik i organizaciju.* Dokazano je da se neki strukturni proteini fosforilišu i do 50 puta više nego u normalnoj ćeliji (vinkulin, ćelijski aktin i dr.).

g) *Menja se odnos transformisane ćelije i njene okoline* (nema kontaktne inhibicije, gubi se integritet tkiva, razlažu se bazalne membrane).

h) *Odsustvo tkivne kontrole dovodi do haotičnog rasporeda ćelija,* koji se ispoljava i u uslovima in vitro.

j) *Postepeno se gube specifične karakteristike diferencirane ćelije (ili prestaje diferncijacija).*

Neograničen rast i deobe maligne ćelije čine je potencijalno besmrtnom. Treba reći da bi pojava novih antigena na transformisanoj ćeliji trebalo da alarmira imuni sistem, koji bi morao da preopozna i uništi takvu ćeliju. Postoji mišljenje da se to i dešava, a u momentu kad zakaže imuni sistem razvija se maligni tumor.

Ako maligni tumor nastaje od jedne ćelije, to znači da se malignitet održava, prenosi sa jedne generacije ćelija na drugu, odnosno to znači da je malignitet, u okviru jednog tkiva, nasledan.

Faktori sredine i kancerogeneza

Koji sve činioci određuju da li će se u jedne individue razviti maligni tumor ili neće i u kojoj meri nasledna osnova omogućava malignu transformaciju, jedno je od najznačajnijih pitanja savremene biomedicine.

Svakim danom se povećava broj podataka koji pokazuju da primarna greška u kancerogenezi nastaje u genomu. Genske mutacije su poznate u tzv. prekanceroznim stanjima pa je ustanovljeno da se polipoza debelog creva, koja evoluira u rak debelog creva, prenosi kao autosomno dominantno, mendelsko svojstvo, a xeroderma pigmentosum (u tih bolesnika je rak kože češći nego u opštoj populaciji) kao autosomno recesivno svojstvo.

Primarna mutacija može nastati spontano ili je izazovu različiti spoljašnji činioci: virusi, lekovi, ultravioletno zračenje, jonizujuća zračenja. O delovanju spoljašnjih faktora na povećanu incidenciju raka govorilo se mnogo pre nego što se

znalo da je nasledna osnova DNK i da DNK može da mutira.

Bilo je zapaženo da ljudi koji su tokom većeg dela dana izloženi UV zracima (moreplovci, farmeri) ili jonizujućim zračenju (radiolozi, rudari u rudnicima urana) češće dobijaju rak kože, leukemiju ili druge oblike raka.

Još 1957. god. je analizom hemijskih kancerogena utvrđeno da su to molekuli "koji imaju zapanjujuće slične molekule kao parovi baza povezani H-vezama u DNK a i sličnih su dimenzija". Tako je krajem pedesetih godina bilo prihvaćeno mišljenje da, bar hemijski kancerogeni, izazivaju rak direktnim delovanjem na molekule DNK.

Radford i Hunt su 1964. god. dokazali da se u duvanskom dimu nalazi radioaktivni polonijum u koncentracijama koje mogu da izazovu rak pluća. Sva dalja klinička, eksperimentalna i epidemiološka ispitivanja pokazala su da je rak pluća daleko češći u pušača nego u nepušača a da je povećana frekvencija ovog oboljenja uslovljena i velikim aerozagađenjima životne sredine savremenog čoveka.

Danas se smatra da su hemijske materije najčešći kancerogeni. One deluju na molekule ćelije direktno ili indirektno. U prvom slučaju hemijska materija je elektrofilna (EMS*, MNU**, DMS***), u drugom su neki od njenih metabolita elektrofilni i reaguju sa negativno naelektrisanim centrima RNK, DNK, proteina itd. (aromatični ugljeni hidrati, benzopiren).

Kada je reč o mutagenosti, najinteresantnije je njihovo delovanje na DNK. U bakterija se svaka nova mutacija izrazi u fenotipu (haplonti), pa se u najpopularnijem testu na mutagenost hemijskih materija koristi Salmonella (Amesov test). Pomoću Amesevog testa je dokazano da su skoro svi analizirani kancerogeni i mutageni.

Radijacije. Različite vrste zračenja mogu takođe da dovedu do grešaka u naslednoj osnovi koje bi mogle da budu uzrok maligne alteracije. Kao primarna greška, posle delovanja jonizirajućeg zračenja, nastaje prelom hromosoma. Oštećeni krajevi hromosoma su destabilizovani, spajaju se i dolazi do obrazovanja ring-hromosoma, izohromosoma, translokacije odnosno prerasporeda genetskog materijala. Neki od tih prerasporeda mogu da iniciraju malignu transformacij (sl. 13.1).

Ultravioletni zraci oštećuju samo jednu nit DNK. Te greške se najčešće uspešno poprave zahvaljujući složenim sistemima opravke. Međutim, dokazano je na bakterijama da u postreplikativnoj, rekombinativnoj opravci sistem opravke toleriše greške i pretpostavlja se da bi te greške imale značaja za nastajanje raka. U čoveka je takođe dokazano da neefikasnost sistema opravke (mutacija gena za neki od enzima opravke), znači nasledna mutacija, može da bude predispozicija za razvoj malignog tumora (xeroderma pigmentosum).

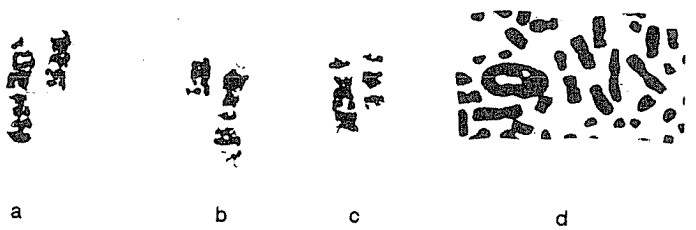
Numeričke aberacije hromosoma u maligno transformisanoj ćeliji

Još od vremena pionirskih radova eminentnog nemačkog biologa Boverija (1914) znalo se da u ćelijama tumora postoje promene hromosomske garniture. Po Boveriju, osnovni uzrok pojave raka su "somacije", mutacije telesnih ćelija. Takva ćelija se brzo i nepravilno deli, poremećen je normalan ćelijski ciklus, genetski materijal se neravnomerno deli na ćelije kćerke, a deobu hromosoma ne prati uvek deoba citoplazme. Deobe su "asimetrične", menjaju se broj i struktura

* EMS – etil-metanosulfonat

** MNU – metil-nitrozoureja

***DMS – dimetil-sulfat



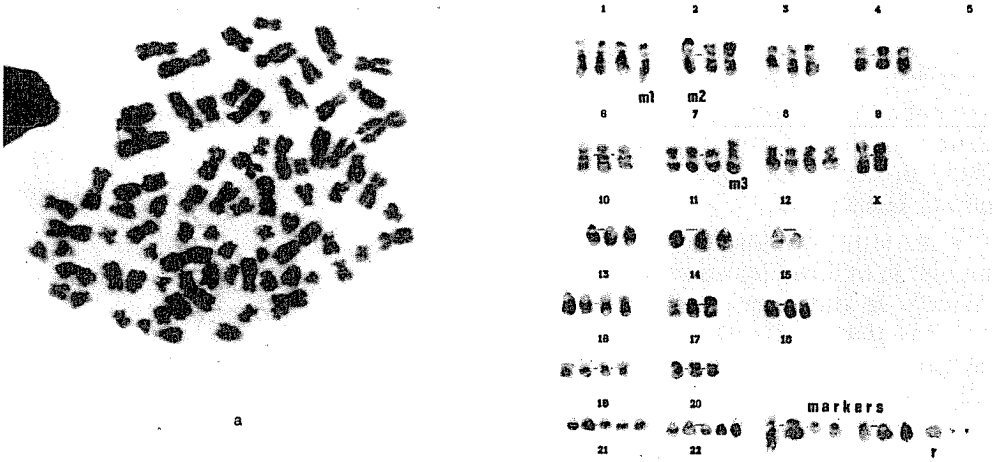
Slika 13.1 – Strukturne aberacije hromozoma u maligno transformisanoj ćeliji: translokacije (a i b), delecija (c), prstenasti, ring, hromozom (d)

hromosoma. Kako se početkom našeg veka nije znao ni tačan broj hromosoma čoveka, nije se mogla dati ni tačna procena značaja promene kariotipa u tumorskim ćelijama.

Od prvih tvrđenja Boverja do danas prošlo je više od 80 godina ali pitanje da li su hromosomske promene u ćeliji uzrok ili posledica maligne transformacije još nije definitivno rešeno. Ispitivanja različitih evolutivnih stupnjeva raka u eksperimentalnim i kliničkim uslovima pokazala su da se kariotip maligne ćelije postupno i na određen način menja. Tako, npr., utvrđeno je da u toku evolucije raka grlića materice u periodu pre nego što tumor probije bazalnu membranu (carcinoma in situ) već ima promena u broju hromosoma, ali preovlađuju ćelije sa normalnim kariotipom. U vreme invazije tumora (proboja) ćelije su poliploidne, javljaju se i neuobičajeni "marker"-hromosomi, a iščezava linija normalnih, 2n-ćelija.

Promene broja hromosoma karakteristične su i za druge oblike raka. Zbog nepravilnih deoba javljaju se triploidne, tetraploidne ili aneuploidne ćelije (sl. 13.2.a,b).

Numeričke aberacije su nađene u solidnim tumorima, metastazama i izlivima. Broj hromosoma ne mora da bude i najčešće nije 3n ili 4n već se kreće oko ovog broja (hiper ili hipotriploidan odnosno tetraploidan).



Slika 13.2 – Poliploidna tumorska ćelija (a) kariogram jedne tumorske ćelije. sa brojnim markerima (b).

Pretpostavlja se da se tokom razvoja tumora javlja više ćelijskih linija (ćelije sa različitim genomom) a da najvitalnija preživljava (najbrojnija je) i čini stemliniju.

Katkad ćelije imaju 2n hromosoma, ali neki od normalnih hromosoma su se izgubili, drugima se broj povećao pa ova zamena (supstitucija) dovodi do *pseudodiplodije,* relativno uobičajene u malignim ćelijama (broj hromosoma je 2n, ali kariotip nije normalan).

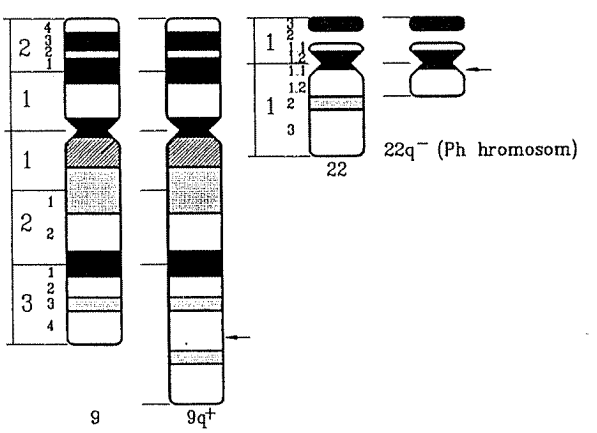
Uporedo sa promenom broja hromosoma menja se i njihova struktura. Gube se delovi hromosoma (delecije), nastaju izohromosomi, vrše se translokacije i dr.

Aberacije hromosoma karakteristične za određen tip maligne ćelije

Sa razvojem preciznih citogenetičkih tehnika u toku poslednje decenije otkrivaju se specifične hromosomske aberacije i hromosomski markeri u ćelijama mnogih tumora. Mora se reći da postoje i tumori sa normalnim kariotipom, što potvrđuje da se u procesu kancerogeneze promene vrše i na nivou gena. Najveće iznenađenje, koje je odmah privuklo pažnju svih onkogenetičara, izazvalo je otkriće da su određene, na izgled balansirane, strukturne aberacije hromosoma specifične za određenu vrstu tumora. Najnovija istraživanja na nivou molekula DNK su otkrila mehanizme koji se nalaze u osnovi ovih poremećaja.

Pokazano je da u procesu strukturnih prerasporeda na hromosomima deluje *pozicioni efekat* zbog promena linearnog rasporeda gena. Isto tako, genetička informacija može da se izmeni usled prekida u samom genu. Izmenjena funkcija gena vrlo verovatno ima uticaja na malignu transformaciju.

Prva korelacija između hromosomske aberacije i malignog oboljenja ustanovljena je 1960. god. U bolesnika sa hroničnom nelimfocitnom leukemijom (HNLL) otkriven je jedan mali hromosom nazvan Filadelfija-hromozom, PH^+ (sl. 13.3). Prema prvim podacima, ovaj hromosom je nastao od hromosoma br. 22 koji je izgubio veći deo q-zraka. Nešto kasnije, kada su citogenetske metode postale preciznije, ustanovljeno je da je Ph^+ hromosom nastao translokacijom između hromosoma 9 i 22 t(9q34/22q11). Ovaj hromosom je karakterističan za HNLL, a danas se smatra da bolesnici koji imaju Ph^+ hromosom imaju bolju prognozu, bolje odgovaraju na terapiju i duže pre-



Slika 13.3 – Filadelfija hromozom nastao traslokacijom hromozoma br. 9 i br. 22

življavaju. Interesantno je da je isti hromosoma nađen u jednog člana porodice koji nije imao kliničkih znakova leukemije, što bi značilo da aberacija prethodi pojavi bolesti.

U bolesnika sa različitim tipovima leukemije sa napredovanjem bolesti kariotip stiče nove aberacije. Što je kariotip više izmenjen i prognoza je lošija.

Na osnovu hromosomskih aberacija danas se vrši klasifikacija leukemija, određuje se terapija bolesnika i sigurnije mogu da se prognoziraju tok i ishod bolesti.

Ispitivanja primarnih tumora u čoveka su skoro neostvarljiva. U trenutku kada se u bolesnika pojave tegobe tumor je već u poodmaklom stadijumu i sekundarne promene kariotipa mogu da maskiraju primarnu promenu.

Na osnovu dosadašnjih ispitivanja, mehanizam maligne transformacije mogao bi se objasniti tako što bi na normalnu ćeliju delovao neki kancerogeni činilac, koji oštećuje naslednu osnovu (dolazi do mutacije). Hromosom sa lezijom (mutacijom) u narednim deobama bi se nenormalno ponašao pa će se u malignoj ćeliji povećati ili smanjiti količina genetskog materijala.

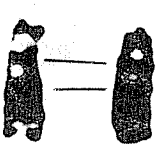
Do povećanja količine genetskog materijala dolazi usled trisomije (npr., +8) ili duplikacije aficiranog segmenta, usled translokacije ili razmene sestrinskih hromatida. Ako je količina genetskog materijala smanjena, oštećeni ili mutirani segment će se fenotipski izraziti u hemizigotnom stanju usled monosomije, delecije ili translokacije.

Delecije kao eventualni uzrok maligne transformacije nisu česte. Ipak, najnovija istraživanja retinoblastoma pokazuju da mala delecija na q13 može da se ustanovi u ćelijama tumora ili, u slučajevima naslednog retinoblastoma, u svim ćelijama bolesnika (sl. 13.4). Interesantno je da ćelije koje maligno alteriraju mogu da izgube normalni hromosom 13 pa se smatra da delecija u hemozigotnom stanju dovodi do pojave raka retine. Pretpostavilo se da bi u tom segmentu mogao da bude gen čiji produkt potiskuje rast ćelije. Ova pretpostavka je potvrđena. Gen za retinoblastom, Rb gen, lociran je na hromosomu 13q14 i spada u antionkogen. Genski produkt antionkogena potiskuje delovanje protoonkogena. Funkcija Rb gena, njegovog produkta proteina od 105 kb, dobro je proučena. Njegova osnovna uloga je da koči replikaciju DNK odnosno, deobu ćelije. Mutacija ovog gena je recesivna, deluje samo ako su oba alela mutirana (u homozigotnom stanju) ili deletirana. Ćelije sa monozomijom deletiranog hromosoma 13 maligno alteriraju zbog hemizigotnog delovanja aberantnog hromosoma. U nedostatku normalnog produkta Rb gena, ćelija se nekontrolisano deli.

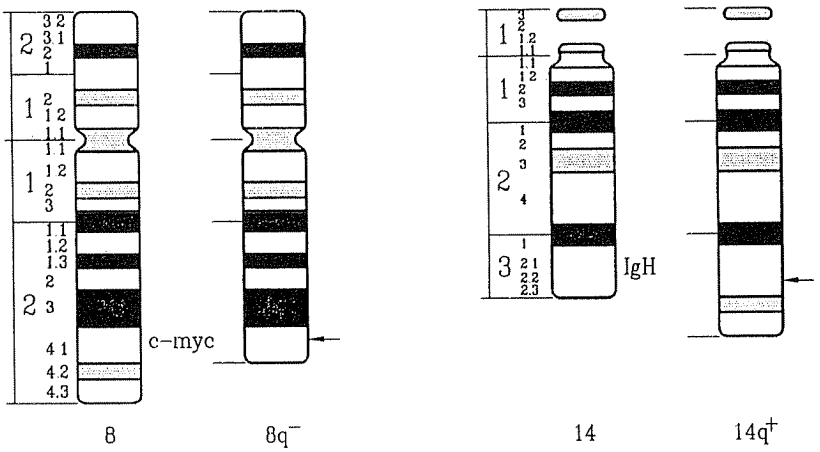
Delecija Rb gena se smatrala specifičnom za retinoblastom ali je kasnije otkrivena i u drugim malignim ćelijama: ćelijama raka mokraćne bešike, raka kostiju, pluća i dojke.

Specifična delecija hromosoma 11, 11p13, karakteristična je za jedan od najčešćih embrionalnih tumora bubrega, za Wilmsov tumor.

Sedamdesetih godina je bračni par Manolov otkrio u ćelijama jednog tipa limfoma (Burkittov tumor B-ćelija) jedan hromosom br. 14 sa produženim dugim kracima. Nešto kasnije je utvrđeno da je



Slika 13.4 – Hromozomski par br. 13 iz ćelija tumora retine (retinoblastom). Delecija drugog kraka hromozoma 13(del 13q14)



Slika 13.5 – Shematski prikaz translokacije u b ćelijama Burkittovog limfoma. Deo hromozoma br. 8 translociran je na hromozom br. 14

taj hromosom nastao pri translokaciji hromosoma br. 8 i br. 14. (sl. 13.5).

Dalja ispitivanja su pokazala da je u ovoj translokaciji bitan hromosom br. 8 (donor) i da u drugih bolesnika sa istim tipom limfoma deo hromosoma br. 8 može biti translociran na hromosom br. 2 ili br. 22. Nije se znalo zašto baš ove translokacije nalazimo u jednom specifičnom limfomu.

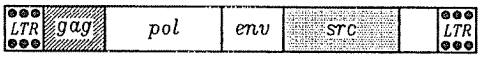
Prema tome, različite strukturne aberacije: recipročne translokacije, delecije i duplikacije, kao i genske amplifikacije, menjaju količinu genetskog materijala u ćeliji ili menjaju ekspresiju gena, što bi mogao da bude jedan od presudnih momenata u procesu maligne transformacije.

Neke aberacije su karakteristične za određeni tip tumora (Ph za HNLL, t8/14 za Burkittov limfom, del 13q za retinoblastom itd.), druge se sreću u različitim tumorima.

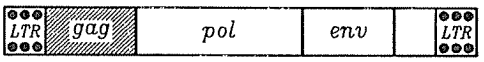
Virusi kao onkogeni činioci

Dosta davno je zapaženo da neke linije miševa imaju veliku učestalost raka dojke i da lako prihvataju transplanat tumora, dok su druge "otporne" na ovaj tip raka. Eksperimentalni radovi na ukrštanju ovih dveju linija su pokazali da će ženke F_1-generacije imati istu osetljivost odnosno otpornost kao majka. Zaključeno je da je reč o nekoj vrsti matroklinog nasleđivanja. Međutim, uskoro su novi eksperimenti pokazali da će osetljivost ženskih potomaka biti onakva kakva je osetljivost mišiće koja ***doji mladunce.*** Ako je, npr., majka otporna na tumor a mladunce doji mišica podložna tumoru, i ženke F_1-generacije biće podložne, kao pomajka. Zaključeno je da se u mleku mišica nalaze "činioci" koji neonatalno, u toku dojenja inficiraju mladunce. Oni, u ženki F_1-generacije, ostaju dugo u latentnom stanju. Slični aktivni činioci, kasnije nazvani virusima, dokazani su i u drugim malignim bolestima (neki oblici leukemija). Tek krajem pedesetih godina prikupljeno je dovoljno dokaza koji će ukazati na ulogu virusa u nastajanju tumora.

Znatno pre navedenih ogleda pojavili su se prvi podaci o "aktivnim činiocima" sposobnim da izazovu rak. Još 1910. god. Peyton Rous filtrira tumore pilića (bio je posredi sarkom, čest u pilića) kroz vrlo guste filtere. Filtrat "sarkomas" ubrizgava zdravim pilićima. Svojim filtratom uspeva da dobije nove tumore. Otkriće Peytona Rousa su očigledno bila preuranjena.



Slika 13.6 – DNK Raus sarkoma virusa (RSV). Ugrađena u hromozom ćelije domaćina ova DNK se prepisuje u iRNK koja predstavlja jednolančani RNK genom virusa. Regulatorne sekvence virusa (LTR), strukturni geni virusa (gag, pol, env), src onkogen



Slika 13. 7 Defektan virus sa delecijom onkogena može da inficira ćeliju i da se umnožava ali ne može da izvrši malignu transformaciju ćelije domaćina

Rousovi "filtrabilni činioci" (danas znamo da su to bili virusi) nisu izazvali stvaranje tumora kod sisara pa su brzo pali u zaborav. Mnogo kasnije sagledano je da je to bilo epohalno otkriće. I. Rousu je 1966. god. dodeljena Nobelova nagrada za rad "na otkriću virusa koji izazivaju tumore".

Virus koji je otkrio Rous nosi danas ime *Rous sarcoma virus,* RSV (sl. 13.6). Koristi se za eksperimentalna istraživanja u mnogim laboratorijama i zauzima posebno mesto u savremenoj onkologiji. Osim RSV otkriveni su i drugi "onkogeni virusi", uglavnom u ćelijama životinja. Ti sićušni, supcelularni organizmi, koji kao naslednu osnovu imaju RNK, omogućili su da se postupno otkrivaju mnoge tajne vezane za onkogenezu.

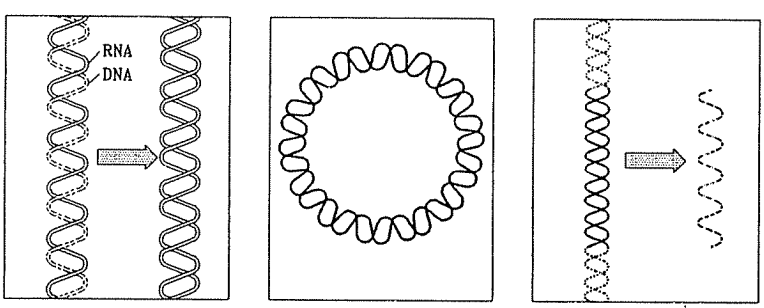
Godine 1959. izolovan je Polioma virus sa DNK kao nalsednom osnovom. Ovaj virus izaziva različite tumore: zaušnih žlezda, vezivnog tkiva, dojke i dr.

Izolovana DNK virusa ubačena u normalnu ćeliju mogla je da izazove malignu transformaciju normalne ćelije. Očekivalo se da dalji radovi pokažu da li nalsedna osnova virusa, bila ona DNK ili RNK, ili samo njen deo, izaziva transformaciju. Uskoro su otkriveni virusi sa mutacijama ili delecijama koji su mogli normalno da inficiraju ćeliju i da se u njoj razmnožavaju, ali nisu mogli da transformišu ćeliju. Zaključeno je da deo nasledne osnove virusa, koji nema vitalni značaj za virus, izaziva transformaciju (sl. 13.7).

Najčešće se u transformisanoj ćeliji ne otkriva sâm virus. Takva ćelija obično ima nove antigene na ćelijskoj membrani pa se pretpostavlja da su oni produkti prisutnog virusa, uključenog u genom ćelije domaćina (provirus ili epizom).

Jednostavno je bilo pretpostaviti da se DNK virusa uključila u genom. Problem je bio kako se RNK virusa uključuje u DNK hromosoma. Ubrzo je i taj problem rešen. Ustanovljeno je da RNK virusi imaju specifičan životni ciklus, jedinstven u živom svetu.

Kada RNK virusa dospe u citoplazmu ćelije domaćina, specifična virusna polimeraza, ***reverzna transkriptaza*** (otkrivena 1970. god.) prepisuje, na RNK virusa,



Slika 13.8 – Obrnuto prepisivanje (reverzna transkripcija):a. na molekulu RNK pomoću enzima reverzne transkriptaze prepisuje se DNK. Jednočlana DNK se replikuje (a). Novoobrazovani dvočlani molekul se zatvara u prsten (b). Prsten se rekombinuje sa DNK ćelije domaćina. Kompletan prepis ugrađene DNK prepisuje se u iRNK ćelije koja predstavlja genom virusa (c)

molekul DNK. Prepisana DNK se zatim replikuje, zatvara u prsten i ugradi u hromosom domaćina (sl. 13.8).

Ovo revolucionarno otkriće bilo je suprotno centralnoj dogmi po kojoj se uvek na DNK prepisuje RNK. Virusi sposobni za reverznu (obrnutu) transkripciju nazvani su ***retrovirusima.***

Detaljna analiza RNK, divljeg virusa koji može da izvrši malignu transformaciju i defektnog virusa, nesposobnog da transformiše ćeliju, pokazala je da se na jednom kraju RNK divljeg virusa nalazi gen odgovoran za tumorogenezu, onkogen. Taj gen je označen kao rsc-gen a mutantan virus kao V-rsc.

Protoonkogeni – onkogeni ćelije

Dalja istraživanja su otkrila da u normalnim ćelijama pilića postoje segmenti DNK komplementarni rsc-genu RSC virusa. Ipak, kada se uporede DNK genoma pilića i DNK prepisane sa gena rsc, zapaža se interesantna razlika: DNK genoma pilića je tipična DNK eukariota sa intronima i egzonima, dok je prepis virusne RNK bez introna. Od 16 ispitanih retrovirusa, 15 je imalo onkogene koji se poklapaju sa jednom ili više sekvenci genoma neinficirane ćelije domaćina. Prema tome, normalne ćelije životinja i čoveka sadrže gene koji se nazivaju ćelijskim onkogenima (c-onkogenima) ili ***protoonkogenima,*** identične ili vrlo slične onkogenima retrovirusa. Produkti protoonkogena, specifični proteini, identični su ili vrlo slični produktima virusnih onkogena. U normalnoj ćeliji protoonkogeni sigurno vrše neku vitalnu funkciju. Pod dejstvom različitih kancerogena protoonkogeni postaju onkogeni. Do danas je u genomu čoveka otkriveno više od 30 protoonkogena, ali se pretpostavlja da ih ima znatno više (čak 50-100).

Interesantno je da su sekvence slične ili identične onkogenima otkrivene u svim eukariotskim ćelijama. Ako se jedan potencijalno tako opasan gen očuvao milionima godina u eukariotskoj ćeliji, to znači da je imao i da ima vrlo značajnu i vitalnu funkciju u normalnoj ćeliji.

Pretpostavlja se da su retrovirusi tokom evolucije uključili u svoj genom gene ćelije domaćina. U novoj sredini, u genomu retrovirusa, onkogeni postaju znatno aktivniji i sposobni da izazovu malignu transformaciju ćelija domaćina. Na taj način "onkogeni" virus sebi obezbeđuje više životnog prostora (ćelije se brže dele, proliferišu).

Onkogeni virusi pri svakoj novoj infekciji prenose ugrađeni onkogen koji može da izvrši transformaciju normalne ćelije u ćeliju raka. Takvi se virusi zato nazivaju "transformišućim virusima".

Ovaj način prenošenja genetskog materijala i rekombinacija prenetog materijala sa hromosomom domaćina poznata je u bakterija kao transdukcija (rekombinacija pomoću vektora) pa se ovi virusi nazivaju i "transdukujući virusi".

Neki od ovih virusa mogu da izazovu malignu transformaiciju vrlo različitih ćelija. Drugi – npr., Abelsonov virus – u kulturi ćelija kostne srži transformište samo B-limfocite.

Transdukujući (transformišući) virusi deluju kao faktor maligne transformacije zajedničkom ekspresijom stečene genetske informacije (onkogen) i genoma virusa, koji omogućava ekspresiju gena i samu transdukciju. Možemo ih smatrati hibridima celularnih genoma i genoma virusa koji zajednički deluju u procesu maligne transformacije.

Neki virusi ne vrše transdukciju (ne nose onkogen) već se ugrade u genom ćelije u blizini protoonkogena. Regulatorni segment virusa; LTR, u kome su gen promotor, gen pojačivač (enhancer), poli A mesto i dr. menja aktivnost, eks-

presiju protoonkogena. Ovaj tip delovanja virusa na malignu transformaciju, ***inserciona aktivacija,*** mnogo je češći jer ima mnogo više takvih virusa nego retrovirusa. Transformacija je u ovom slučaju mnogo sporija i traje nedeljama, mesecima pa i godinama.

Da promotor može da izmeni protoonkogen u onkogen, dokazano je i eksperimentalno kada je u laboratoriji protoonkogen vezan za promotor virusa. Ovaj hibrid je mogao da transformiše normalne ćelije.

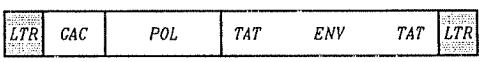
DNK virusi, ugrađeni u DNK ćelije domaćina, dovode do maligne transformacije ćelije tako što aktiviraju svoje „rane gene" čiji produkti potstiču replikaciju virusne DNK. Ovi isti genski produkti imaju sposobnost da se vežu i da inaktiviraju proteine koji koče replikaciju DNK ćelije (produkte antionkogena). Zato ćelija počinje nekontrolisano da se deli.

Humani retrovirusi

Mada nije bilo direktnih dokaza da virusi postoje u transformisanim ćelijama čoveka, pretpostavljalo se da mehanizham onkogeneze mora da bude isti ili sličan u svih organizama.

Kako je u malignim ćelijama čoveka otkriveno prisustvo enzima reverzne transkriptaze, zaključeno je da i genom virusa mora da bude uključen negde u hromosomima ćelije domaćina.

Tokom protekle decenije istraživačima je pošlo za rukom da i u maligno transformisanoj ćeliji čoveka otkriju a zatim iz nje izoluju onkogene viruse. Istorijat te duge i mukotrpne borbe objavljen je decembra 1986. god. Izolovani virusi HTLV (humani virusi koji prouzrokuje leukemiju T-ćelija odraslih) ima dva oblika (I i II) koji stimulišu proliferaciju T-limfocita (leukemija). Posebnu pažnju danas privlači HTLV III, koji uništava Tćelije i koji uzrokuje savremenu "kugu" (SIDA ili AIDS-a) (sl. 13.9). Interesantno je da je efekat ovih virusa drugačiji nego u dosada opisanih virusa. HTLV može da se uključi u bilo koji deo genoma i da deluje na normalne gene ćelije u bilo kom delu genoma *(trans-regulacija).*



Slika 13.9 – HTLV III, virus SIDA-e je jedan od najsloženijih retrovirusa. Na slici su označeni neki od gena virusa: **gag,** za proteine kapsida, **pol,** za reverznu transkriptazu, **env** za spoljni omotač virusa, **LTR** regulatorne sekvence virusa, **tat,** za regulatorni protein.

Zašto protoonkogen postaje onkogen?

Iz svega rečenog može se zaključiti da je osnovna razlika između protoonkogena i onkogena, bar u nekim slučajevima, u intenzitetu transkripcije i ekspresije gena, odnosno da je u pitanju *efekat doze.* Bilo da je ćelijski onkogen (protoonkogen) vezan za genom virusa (transformišući virusi), bilo da je promotor ili drugi regulatorni segment virusa (npr., pojačivač), ugrađen u blizini protoonkogena (cis-regulacija) ili da je usled strukturne aberacije, npr. translokacije protoonkogen došao u region pojačane aktivacije *(pozicioni efekat)* ili da se gen amplificirao, umnožio (dvojni mali fragmenti, DM i HSR homogeno obojeni regioni) povećana je količina genskog produkta. U ćelijama tumora nervnog tkiva amplificirani su geni Nmyc. Često je u tumorskim ćelijama amplificiran gen C-ras, vrlo maligni tumori imaju amplifikaciju gena C-myc. Ako su DM i HSR prisutni, u ćeliji će biti više genskog produkta nego što je normalno. Ako genski produkt učestvuje u nekom vitalnom procesu ćelije, izmenjena aktivnost gena remetila bi i sâm proces. I najnovija ispitivanja (1985. god.) trans-

lokacija 8/14; 2/8; 8/22; u B-limfocitima kod Burkittovog limfoma, o kome je bilo reči, pokazuju da se na mestu preloma hromosoma br. 8 nalazi ćelijski onkogen (protoonkogen) c-myc a na hromosomima br. 14, 22 i 2 vrlo aktivni geni za molekule koji ulaze u sastav antitela. Prema tome, gen, c-myc bezopasan (verovatno čak i neophodan za normalnu funkciju ćelije) u svom prirodnom položaju na hromosomu br. 8 u B-limfocitima, translokacijom biva prebačen u domen vrlo aktivnih gena za teške lance imunoglobulina (br. 14) ili za kapa (br. 2) ili lambda (br. 22) lake lance imunoglobulina. U novom položaju onkogen C-myc biva stimulisan jer je pod kontrolom znatno aktivnijih segmenata. Rečeno je da se ova pojava naziva *pozicionim efektom.*

Mada su rezultati postignuti u laboratorijama širom sveta duboko pronikli u ulogu nasledne osnove u malignoj transformaciji, još uvek nije definitivno rešeno koji tip aberacije i zašto baš taj tip karakteriše određen tip tumora. Ipak, ostaje činjenica da od 23 različita hromosoma čoveka samo 15 učestvuju u promenama genoma. Ostali bivaju uključeni vrlo retko ili nikad.

Fragilna mesta

Kada je otkriveno da na hromosomima postoje regioni podložni prekidima (fragilna mesta – FM), počela su ispitivanja FM u malignim ćelijama pa je ustanovljeno da u ćelijama bolesnika sa leukemijama ili limfomima ima oko 20 fragilnih mesta. Posebno su česta na hromosomima 1q14, 8q22, 9q21, 9q13, 11q13, 16q22.

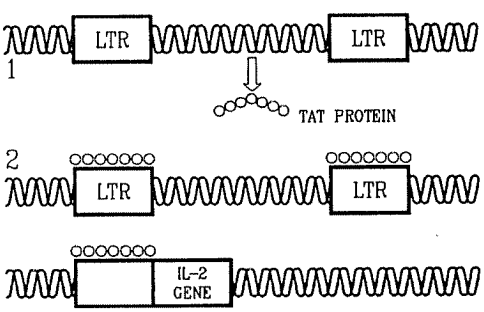
U ćelijama solidnih tumora nađeno je 5 izuzetno čestih fragilnih mesta: 1q, 2q, 3q, 6q. Podaci dobijeni analizom solidnih tumora su još uvek oskudni zbog teškoća pri kultivaciji ćelija i kvaliteta hromosoma. Zato su i navedeni podaci dobijeni analizom 5714 pacijenata sa leukemijom ili limfomima i na samo 916 analiza ćelija solidnih tumora. Na otkrivanju fragilnih mesta se radi vrlo intenzivno. Do 1979. god. bilo je otkriveno 9 a do 1985. god. 17 fragilnih mesta.

Genske mutacije protoonkogena

Drugi mehanizam koji normalni protoonkogen može da izmeni u onkogen je *point-mutacija.*

Iz ćelija tumora mokraćne bešike čoveka izolovana je DNK, isečena je na male fragmente pa su ti fragmenti vezani za "marker" – gene bakterija. Fragmenti su stavljeni u kulturu ćelija fibroblasta miševa. Fragmenti DNK mogu da uđu u ćelije i da u malom broju ćelija izvrše transformaciju. Iz ćelija koje pokazuju znake maligne transformacije izdvoji se DNK, fragmentiše se i njome se inficira nova kultura fibroblasta. Ponovo se izoluje DNK transformisanih ćelija, fragmentiše se i fragmenti se ubace u kapside virusa. Od brojnih virusa samo neki nose gen marker bakterija i uz njega vezan onkogen čoveka.

Virusi se ubacuju u kulturu bakterijskih ćelija. Samo oni virusi koji imaju marker-gen bakterija (znači, i gen čoveka) mogu da stvaraju plakove. Ti fagi



Slika 13.10 – HTLV I i II, virusi koji vrše "transregulaciju". Uključeni u bilo koji deo genoma ćelije, pomoću "tat" proteina kontrolišu aktivnost virusnih gena ali mogu da utiču i na aktivnost gena ćelije.

se dalje analiziraju. Unutar genoma faga ustanovljen je deo DNK od oko 5000 parova baza koji bi odgovarao humanoj DNK odnosno onkogenu (danas je taj gen indentifikovan kao gen H-ras). Daljom analizom ovog segmenta ustanovljeno je da oko 350 parova baza čine "aktivno mesto" onkogena (odgovorno za malignu transformaciju) a da se tih 350 parova baza u onkogenu i protoonkogenu razlikuju samo u jednoj bazi: u protoonkogenu je baza guanin, a u onkogenu adenin. Ova supstitucija menja genetsku šifru za jednu aminokilselinu pa se u produktu protoonkogena nalazi glicin, a u produktu onkogena valin.

Postoje različite tehnike za izolovanje c-onkogena iz genoma i za njihovu analizu. Sve te tehnike pokazuju da vrlo male promene u genetskoj šifri mogu korisni i neophodni protoonkogen da izmene u onkogen.

Da bi se ustanovilo šta se dešava u ćeliji koja prolazi kroz malignu transformaciju, koji genski produkti menjaju ritam deoba i morfološke karakteristike ćelije, trebalo je utvrditi koji genski produkti obezbeđuju normalan ritam i normalnu diferencijaciju. Prema tome, analiza tumorske ćelije podrazumeva proučavanje različitih molekularnih zbivanja u toj ćeliji.

Genski produkti protoonkogena i onkogena

Danas je dokazano da produkti protoonkogena učestvuju u ključnim procesima rasta i diferencijacije ćelija (tab. 13.1.). Produkt gena rsc je jedna proteinkinaza koja fosforiliše proteine na AK-tirozinu (i u normalnoj ćeliji ima ovih enzima, ali u vrlo malim količinama).

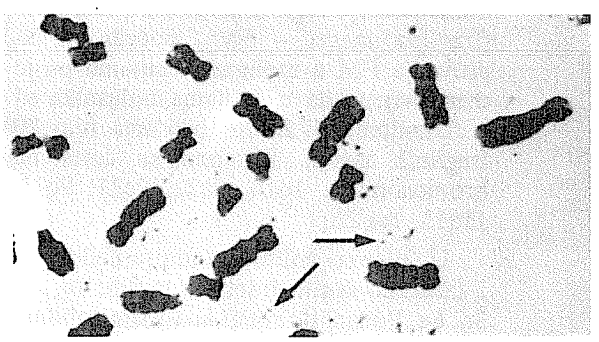
Produkt onkogene erb-B sličan je membranskim receptorima za faktor rasta a produkt sis-gena samom faktoru rasta (PDGF). Produkti ras-gena imaju jaku hidrolitičku aktivnost i koriste GTP kao izvor energije. Time utiču na prenos hormonskih signala.

Produkti navedenih onkogena deluju na membrani ćelije i u citoplazmi. Produkti gena c-myc, c-myb i c-fos deluju u jedru i najverovatnije kontrolišu transkripciju.

Zaključak bi bio:

U normalnoj eukariotskoj ćeliji postoje vrlo stari geni (ćelijski onkogeni ili protoonkogeni) koji kontrolišu vitalne procese u ćeliji, posebno rast i diferencijaciju. Delovanjem različitih činilaca (kancerogena) ovi korisni geni mogu da se izmene i postanu onkogeni. Jedan od mehanizama delovanja onkogena je povećana produkcija specifičnog produkta – onkogena (efekat doze). Količina produkta se poveća ako c-onkogen dođe pod kontrolu aktivnih regulatornih gena, npr., uključivanjem c-onkogena u genom virusa, uključivanjem virusa u genom normalne ćelije, usled pozicionog efekta (pri translokaciji), ako genski produkti virusa inaktiviraju supresore ćelijske deobe (produkte anti onkogena) i sl.

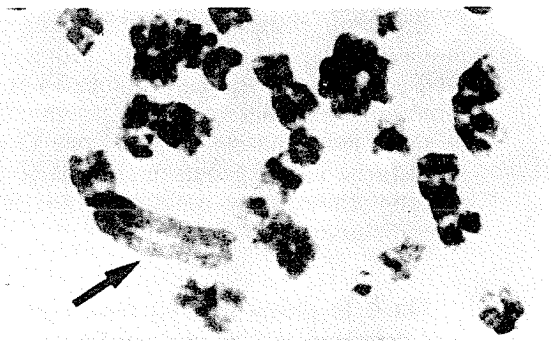
Usled izmenjene regulacije u samoj ćeliji može da dođe do nekontrolisanog umnožavanja (amplifikacije) određenih segmenata hromosoma. Stvaraju se nezavisni mali fragmenti DM (double minutes, dvojni mali segmenti) (sl. 13.11.) ili



Slika 13.11 – Mali dvojni fragmenti (DM). Javljaju se u različitim tumorskim ćelijama a broj DM varira od ćelije do ćelije. Prepostavljaju amlificirane c-onkogene

HSR (homogeno obojeni regioni u okviru hromosoma) (sl. 13.12.). I jedni i drugi predstavljaju veliki broj kopija određenih gena, a javljaju se samo u nekih tumorskih ćelija, u vrlo različitom broju.

Izmenjena regulacija bi mogla da bude i uzrok aktivacije pogrešnih gena, u pogrešno vreme i na pogrešnom mestu (npr., pojava fetalnog hemoglobina kod nekih slučajeva leukemije, ili nekih drugih fetalnih proteina, produkcija hormona u ćelijama raka pluća i dr.).



Slika 13.12 – Homogeno obojeni regioni hromozoma tumorske ćelije, nastali amplifikacijom c-onkogena

Tabela 13.1 – Onkogeni, njihov položaj na hromosomima, genski produkti, njihova lokalizacija u ćeliji, priroda ovih genskih produkata

GEN	HROMOSOM NA KOME JE GEN	LOKALIZACIJA U ĆELIJI	PRIRODA PROTEINA
I KLASA ONKOGENA: protein-kinaze			
src	br. 20	na plazma-membrani	protein-kinaza specifična za tirozin
fes	15q	u citoplazmi	protein-kinaza specifična za tirozin
abl	9q	na plazma-membrani	protein-kinaza specifična za tirozin
erb-B	7	na plazma-membrani	protein-kinaza specifična za tirozin, derivat receptora za EGF
mos	8q	u citoplazmi	protein-kinaza specifična serin i tirozin
II KLASA ONKOGENA: proteini p21			
H-ras	11p	na plazma-membrani	proteini koji se vezuju za GDP, GTP-aze
Ki-ras	12		
N-ras			
III KLASA ONKOGENA: proteini jedra			
c-myc	8q	u jedru	proteini koji se najverovatnije vezuju za DNK u vrše kontrolu transkripcije
myb	6q		
ski	1q		
fos	14q		
p53			protein vrlo sličan regulatornom proteinu eukariota AP1
jun			
IV KLASA ONKOGENA: faktori rasta			
sis	22q	u pericelularnom prostoru	derivat PDGF

Promenu protoonkogena u onkogen mogu da izazovu i vrlo fine promene DNK, point-mutacije (u ćelijama T4 tumora mokraćne bešike čoveka izmenjena je samo jedna baza u genu H-ras. Ova supstitucija menja genetsku šifru pa se u polipeptidnom lancu umesto aminokiseline glicin vezuje valin).

Da li je jedna genska mutacija dovoljna da izazove malignu transformaciju?

Imajući u vidu brojne i drastične promene koje se dešavaju tokom transformacije u ćeliji, teško je pretpostaviti da bi jedna genska mutacija ili izmenjena aktivnost jednog gena mogle da izazovu sve promene. Takav bi gen morao da bude izuzetno plejotropan. Na osnovu analize produkata c-onc i činjenice da su u malignim ćelijama otkriveni tandemi myc-ras gena zaključeno je da bi kombinovano delovanje ras-gena (specifične fosfokinaze) i myc-gena (kontrola transkripcije) moglo da utiče na dva osnovna procesa u ćeliji – rast i diferencijaciju. Neograničen rast ćelija uslovljava potencijalnu besmrtnost i blokira diferencijaciju.

Danas se smatra da najmanje dve mutacije, a verovatno i više njih moraju da budu prisutne da bi normalne ćelije postale ćelije raka. Eksperimentalni radovi na životinjama su pokazali da u evoluciji raka ima nekoliko stadijuma. Prva mutacija trajno menja genom ćelije, ona je ireverzibilna, prenosi se na potomke te ćelije, ali nije dovoljna da injicira transformaciju. *Ova faza se naziva inicijacijom.*

Neki spoljnji činilac (hemikalija, zračenje, možda pad imuniteta) stimuliraju iniciranu ćeliju. Ovaj stupanj se naziva *promocijom,* reverzibilan je i ako se prekine delovanje nocivnog agensa, ćelija se neće transformisati. Promocija zahteva duži period latencije (nedelje, meseci, godine).

U trećem stupnju, *progresiji,* ćelija je definitivno izmenjena, ne može više da se vrati u normalno stanje a vremenom postaje sve više maligna (obrazovan tumor je invanzivan, metastazira).

Prema najnovijim podacima iz literature, inicijatori i promotori su hemijski različite supstancije i na različite načine deluju na ćeliju. U eksperimentalnim uslovima, inicijator deluje primenom jedne doze, dok promotor zahteva višekratnu primenu. Višekratna primena inicijatora može da simulira promociju. Bez delovanja inicijatora promotor ne može da izazove trajnu transformaciju.

Inicijacija-promocija je model koji može da se primeni i za kancerogenezu u čoveka. Na primer, ako u ćeliji plućnog epitela postoji neka promena koja bi odredivala inicijaciju, dugotrajno delovanje duvanskog dima, pušenje (promotor) izazivalo bi rak pluća. To bi bilo i objašnjenje zašto svi pušači ne dobijaju rak pluća. Rečeno je da se rak češće javlja u starijih ljudi a to bi moglo da znači da su starije osobe duže vreme izložene delovanju promotora pa neke inicirane ćelije mogu maligno da alteriraju.

Rak kao multifaktorijalna bolest

Sve više preovlađuje mišljenje da predispoziciju za pojavu maligniteta stvara nekoliko promena u genomu a faktori sredine (kancerogeni) uslovljavaju fenotipsku pojavu raka. Osobe sa aberantnim genomom, trisomijom 21 ili sa nestabilnim genom (Bloomov sindrom, Fanconijeva anemija) češće dobijaju leukemije od osoba iz normalne populacije. Veća incidencija raka dojke zapažena je, npr., u osoba sa Klinefelterovim sindromom, 47, XXY.

Genetska predispozicija mogla bi da bude uslovljena i efikasnošću imunološ-

kog sistema, sistema opravke, prisustvom latentnog virusa i dr.

Da bi se ustanovilo u kojoj meri nasledna osnova a u kojoj faktori sredine doprinose fenotipskoj manifestaciji raka, vrše se ispitivanja blizanaca (jednojajnih, MZ, i dvojajnih, DZ) i populaciono-genetička ispitivanja. Tako je utvrđeno da se u jednojajnih blizanaca leukemija javlja u 1:5 a u DZ 1:720. Rak želuca u MZ blizanaca ima konkordanciju (slaganje) u 30% a u DZ samo u 5% parova. Za karcinom materice je konkordancija 15% za MZ, a nema je (0%) u DZ.

Upoređujući pojavu raka unutar porodica i u opštoj populaciji, brojni autori su dobili vrlo kontradiktorne podatke. Ipak, opšti je utisak da se određeni oblici raka češće javljaju unutar porodica (članovi jedne porodice dele zajednički fond gena, genetski su slični) nego u opštoj populaciji.

Primećeno je da osobe određene krvne grupe češće obolevaju od određenog tipa raka (npr., rak želuca u osoba krvne grupe A). Ova pojava se naziva asocijacijom i još nije objašnjena.

Da li je rak nasledan? Danas se pozitivno može odgovoriti samo za neke oblike prekanceroznih stanja i za retke slučajeve retinoblastoma ili Wilmsovog tumora. Promena nasledne osnove obično zahvata somatsku ćeliju i kod čoveka se ne može preneti na potomstvo.

Da li je rak zarazan? Ako su virusi sposobni da izazovu rak, taj isti virus pri infekciji novog domaćina može da izazove rak. Očigledno je da u trenutku infekcije novi domaćin može da bude podložan infekciji ili otporan na infekciju.

Da li su promene genoma uzrok ili posledica maligne transformacije? Danas je skoro definitivno dokazano da prva promena mora da se odigra u naslednoj osnovi. Promena aktivnosti c-onkogena, i to najverovatnije ne samo jednog, pokreće malignu transformaciju. Primarni poremećaj, koji za većinu tumora čoveka još uvek nije ustanovljen, tokom evolucije tumora biva maskiran sekundarnim promenama genoma. Sekundarne promene su, verovatno, posledica maligne transformacije.

14

Genetika starenja

Demografska eksplozija starih ljudi je realnost druge polovine XX veka i zato je u humanim populacijama nastao niz medicinskih i socijalnih problema.

Pred kraj prošlog veka ljudski život bio je više nego dva puta kraći. Za proteklih 1000 godina dužina života čoveka nije značajno porasla; promenila se samo srednja dužina života (u razvijenim zemljama). Poboljšani uslovi života i savremena dostignuća u medicini, naročito u borbi sa infektivnim bolestima, omogućili su da veći broj ljudi dostigne genetički programiranu dužinu života, koja bi se kretala između 90 i 100 godina. Sigurno je da i ovo nije maksimalni kapacitet, jer postoje primeri izuzetne dugovečnosti u nekim krajevima sveta – preko 100, pa čak i blizu 200 godina. Danas, u znatno povoljnijim uslovima sredine i sa znatno unapređenom zdravstvenom zaštitom, prosečno trajanje života u Evropi iznosi preko 70 godina.

Procesi starenja se ispoljavaju gubitkom vode iz ćelija, što je praćeno zadržavanjem toksičnih materija; metabolički procesi se smanjuju i postepeno se snižavaju biološke funkcije pojedinih organa i sistema, a naročito se smanjuje hormonska aktivnost. U međupršljenskim hrskavicama, usled smanjenog kretanja talože se soli kalcijuma, što smanjuje pokretljivost kičme, pa je stoga starija osoba povijena prema napred. Krvni sudovi se sužavaju usled sklerotičkih procesa, organi se slabije snabdevaju krvlju, što se odražava na njihovu funkciju. U toku starenja se znatno povećava incidencija najčešćih kancera (pluća, dojke, kolona i dr.).

Šta je starenje?

To je univerzalni biološki proces, prirodna etapa u životnom ciklusu svake jedinke, koja se završava smrću.

Evolucija ne favorizuje besmrtnost – eventualna besmrtnost bi dovela do uništenja naše vrste i prestanka evolucije. Smrt je, znači, jedno od oruđa prirodne selekcije. Starenje kao univerzalni proces, predstavlja genetički programirano otkazivanje homeostaznih mehanizama. Pojavu homeostaze organizma možemo posmatrati kao deo fenotipa, koji se, kao i fenotip u celini, nalazi pod genetičkom kontrolom.

Organizam reaguje na izmene uslova sredine na potpuno određen način u sklopu genetički određene norme reakcije.

Pojava široke plastičnosti dozvoljava organizmu postojanost unutrašnje sredine, tj. održavanje homeostaze, bez obzira na neizbežne razlike uslova u okol-

noj sredini. Homeostaza je, znači, produkt realizacije nasledne informacije u određenim uslovima sredine, to je norma reakcije genotipa na izmenjene uslove sredine. Što je šira nasledna norma reakcije, to je veća mogućnost organizma da održi homeostazu. Snižena norma reakcije u toku starenja uslovljava veliku osetljivost organizma na faktore spoljašnje sredine (infektivne, termičke, stresne).

Za održavanje homeostaze ljudskog organizma veliki značaj imaju odnosi u genotipu. Suštinsku ulogu mogu imati interakcije i koordinacija gena koji kontrolišu pojedine etape složenih ontogenetskih procesa.

Genotip obezbeđuje strogu i postojanu stabilnost životnih procesa. Ovo svojstvo se može obezbediti pri uslovima još strože stabilnosti funkcionisanja samog genotipa.

Genotip odlikuje nekoliko karakteristika organizacije koje obezbeđuju njegovo funkcionisanje:

- matrični princip replikacije DNK,
- procesi transkripcije i translacije makromolekula DNK,
- mogućnost reparacije DNK,
- diploidnost broja gena – pojava dva genoma u jednom genotipu (poreklom od majke i oca), koja nema samo evolutivno značenje u smislu rekombinacije genetičkog materijala već i povećava mogućnost funkcionisanja genotipa. Mutacija bilo kog genetičkog lokusa (ili nekoliko lokusa) u jednom genomu može biti kompenzovana produktom homologog lokusa iz genoma drugog roditelja.

Stabilizacija funkcionisanja genotipa kao celine određena je "specijalizacijom" gena, koji kontrolišu vreme i mesto uključivanja pojedinih lokusa, kao i pojava gena modifikatora, koji menjaju ekspresiju "glavnih" gena.

Diferencijalna i koordinirana aktivnost gena u različitim ćelijama u različito vreme nalazi se u osnovi ne samo homeostaze samog genotipa već i toka ontogeneze u celini.

Sve izloženo nam govori da ne postoje nasledno neuslovljene ili od sredine nezavisne pojave homeostaze, i da za održavanje homeostaze organizma prvorazredan značaj imaju genetski i hromosomski balans.

Već dugo istraživače interesuje da li se javljaju promene u inače stabilnom genetičkom materijalu u toku ontogeneze, naročito u toku starenja. Sva dosadašnja ispitivanja ukazuju da je promena genetičkog materijala značajan činilac u procesu starenja.

Dugo je ozbiljnu prepreku u ovim ispitivanjima predstavljalo odsustvo objektivnih bioloških kriterijuma starenja na osnovu kojih bi bilo moguće izraditi kvantitativne kriterijume.

Prvobitni aspekti razmatranja mehanizama starenja povezani su sa Weismennovim shvatanjima od pre sto godina. On o prirodi starenja kaže: "Besmrtnost bi bila nekorisna za vrstu; prirodni procesi starenja i smrti se ogledaju u ograničenom potencijalu deoba somatskih ćelija".

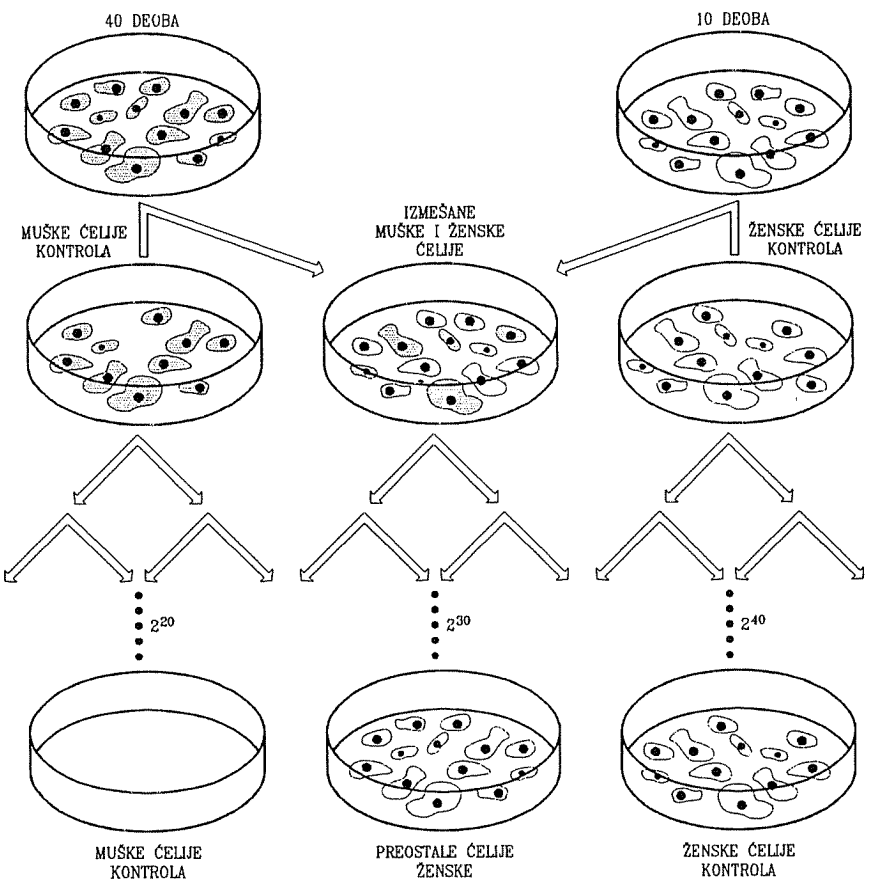
Znatno kasnije, sa Hayflickovim eksperimentima (1965), počela je nova, savremena etapa u razviću ideje da je starenje uslovljeno unutrašnjim mehanizmima, koji ograničavaju dužinu života somatskih ćelija. Ćelije čoveka, kao i drugih organizama, imaju strogo ograničenu sposobnost razmnožavanja (za čoveka 50-60 deoba u kulturi ćelija). Kada se ovaj potencijal iscrpi, dolazi do izumiranja kulture diploidnih ćelija, tj. do "starenja" in vitro. Ova pojava se verovatno nalazi i u osnovi prirodnog starenja organizma. Ograničenu sposobnost reprodukcije ćelije u kulturi ilustruje sledeći Hayflickov eksperiment: kada su će-

lije fetusa muškog i ženskog pola koje su bile različite starosti u kulturi (muške ćelije su imale 40 deoba a ženske 10 deoba) pomešane, posle 30 deoba u mešovitoj kulturi ostale su samo ćelije ženskog pola, kao i u čistoj ženskoj kulturi. Ćelije muškog pola su iscrple svoj reproduktivni potencijal (sl. 14.1).

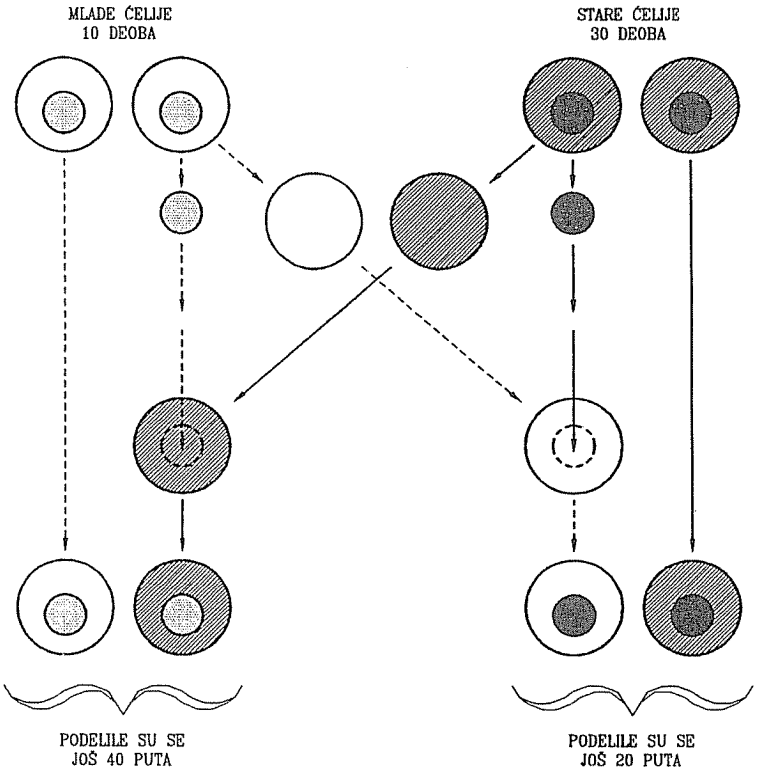
Dokaz da kontrolu procesa starenja ćelije vrši jedro potkrepljuje eksperiment sa izdvajanjem jedara iz mladih ćelija i prenošenjem u citoplast (citoplazma bez jedra) starih ćelija, i obrnuto. Pokazalo se da mlada jedra u staroj citoplasti obezbeđuju duži reproduktivni potencijal nego kada se jedra iz starijih ćelija stave u mlad citoplast (sl. 14.2).

Sada znamo da se samo heteroploidne, transformisane ćelije umnožavaju neograničeno u kulturi. Do sada je poznato oko 600 takvih kultura besmrtnih ili transformisanih ćelijskih linija; mnoge su nastale spontano u kulturama ćelija. Najpoznatija ćelijska linija čoveka je Hela (Helen Lain), nastala 1952. god. u kulturi tkiva poreklom iz karcinoma grlića materice ove bolesnice. Od tada se ova linija neprekidno kultiviše. Transformisane ćelije se razlikuju od normalnih po broju i strukturi hromosoma i hemijskim svojstvima ćelije.

Većina transformisanih ćelija unetih u eksperimentalni organizam začinje tumor. Ovi podaci su doveli do paradok-



Slika 14.1



Slika 14.2

salnog zaključka: da bi životinjske ćelije stekle sposobnost za neograničenu deobu, one treba da poprime neka ili sva svojstva ćelija raka.

Sa izuzetkom nekih tipova ćelija (nervnih i mišićnih), organizam se stalno obnavlja, ćelije se zamenjuju, jedne izumiru, javljaju se nove, ali to organizam ne čini mlađim.

Već decenijama pažnju privlače teorije koje proces starenja povezuju sa nakupljanjem grešaka u DNK u somatskim ćelijama, koje su označene kao *somatske mutacije.* Ova teorija je postavljena na osnovu eksperimenata sa jonizujućim zračenjem. Pokazalo se da jonizujuće radijacije, kao snažni mutageni, mogu skratiti dužinu života eksperimentalnih organizama. Ispitivanjem dužine života fibroblasta čoveka in vitro došlo se do pretpostavke, da su ciljna mesta mutacija pojedinačni geni, i da u genotipu postoji 10^3-10^4 nezavisnih gena, koji su neophodni za održavanje života ćelije. Najveći broj (95%) ovih gena se nalazi na autosomima, dok se 5% nalazi na X-hromosomima. Pretpostavlja se da su mutacije koje se nakupljaju u genotipu recesivne po svojoj prirodi. Nakupljene mutacije u toku života ćelija u kulturi prouzrokovale bi izumiranje kulture. Dalja objektivizacija ove pretpostavke o nakupljanju recesivnih somatskih mutacija i njihovom uticaju na dužinu života ćelije bazirana su na ponašanju diploidnih i poliploidnih ćelija u kulturi. Ako su mutacije recesivne, tada bi povećana ploidija (3n,4n), što znači veći broj kopija istog gena, obezbedila duži život poliploidnim

ćelijama u kulturi, jer je potreban duži vremenski period da sve kopije gena u jednom lokusu budu zahvaćene mutacijom. Pokazalo se da je dužina života diploidne i tetraploidne kulture fibroblasta čoveka približno ista, što govori da je problem nakupljanja recesivnih mutacija kao uzroka starenja mnogo složeniji.

Postoji pretpostavka da sa povećanjem broja mutacija u ćelijama dolazi do njihove interakcije, koja progresivno oštećuje fenotip.

Drugi autori zastupaju mišljenje da starenje može biti prouzrokovano dominantnim ili kodominantnim mutacijama i da dominantna ili recesivna priroda mutacije delimično zavisi i od provocirajućih homeostaznih mehanizama ćelije.

Moguće je pretpostaviti da nije u pitanju samo ukupno povećanje broja mutacija, nego se i ekspresivnost mutacija, koje su se ranije pojavile, povećava u starijem životnom dobu, tj. da mutacije postaju sve dominantnije tokom života.

Danas se sve više obraća pažnja na jedan vid specifičnih povreda, a to su unakrsne veze između makromolekula – veze između molekula DNK, između DNK i proteina ili između samih molekula proteina u sastavu hromatina.

Ove unakrsne veze se sa starošću nakupljaju i sprečavaju normalnu funkciju makromolekula. One mogu biti uzrok somatskih mutacija i dovesti do poremećaja replikacije DNK.

Epimutacije

Poznato je da je metilacija DNK vrlo značajan proces za njenu funkciju. Postoji tkivna specifičnost metilacije DNK. Ova specifičnost se izražava različitom količinom minornih baza 5-metil-citozina u DNK. Svaki tip ćelija u jednom organizmu sintetiše specifične RNK, što govori da se u različitim ćelijama i tkivima prepisuju različiti delovi DNK. Metilacija ima važnu ulogu u regulaciji ekspresije gena, jer održava pojedine delove genoma u neaktivnom stanju u određenim ćelijama. Postavlja se pitanje da li se u toku starenja odigravaju neke promene u transkripcionoj aktivnosti DNK. Prvi primer koji je ukazao na pojavu demetilacije DNK u toku starenja zapažen je u riba 1967. god., a kasnije je ova pojava potvrđena i kod sisara i čoveka. Gajenjem fibroblasta čoveka i drugih sisara in vitro utvrđeno je da je stopa modifikacije metilacije DNK u obrnutoj korelaciji sa dužinom života vrste. Moguće je da "epimutacije" kao nasledne promene, koje se baziraju na modifikaciji metilacije DNK (naročito gubitku 5-metil-citozina), mogu imati značaja kao dodatni deo promena genoma koje se odigravaju u procesu starenja. Fenotipski efekti epimutacije izražavali bi se kroz poremećaj genske regulacije.

Sistemi popravki DNK (repair-sistemi) u toku starenja ćelije

Sve više preovlađuje mišljenje da mehanizmi popravke oštećenja DNK (repair-sistemi) gube sposobnost u toku starenja, bilo da su u pitanju genske i hromosomske mutacije ili već pomenute unakrsne veze između makromolekula hromatina, i zato se ove greške akumuliraju u toku ontogeneze. Još uvek nije jasno da li je u pitanju linearno nakupljanje grešaka u ontogenezi ili su greške u genetičkom materijalu učestalije u toku starenja. Ideja o važnoj ulozi poremećaja popravki DNK u procesu starenja pojavila se prvi put 1966. god. Kasnije je razrađen jedan model koji govori o diferencijalnoj reparaciji. Po ovom modelu, popravka se može vršiti samo u aktivnim segmentima DNK, koji sadrže informacije za sintezu polipeptidnih lanaca i gene za regulaciju njihove aktivnosti i zato su ovi segmenti dostupni

enzimima pa i enzimima popravki. Veliki deo genoma čoveka je neaktivan u transkripciji i može nakupljati povrede, jer je izložen enzimima popravki samo u momentu replikacije. Ako u nekim ćelijama postoji dug vremenski period između replikacije i deoba ćelija, tada se nakupljaju oštećenja DNK koja ostaju do sledeće replikacije.Akumulacija grešaka u DNK dovodi do poremećaja replikacije, što uslovljava poremećaj deobe ćelije i produžavanje ćelijskog ciklusa, a takođe i pojavu hromosomskih aberacija. Da se aktivnost enzima popravki DNK smanjuje u procesu starenja, pokazano je i na ćelijama u kulturi. Sa starošću kulture diploidnih ćelija čoveka smanjuje se sposobnost isecanja timinskih dimera, posle izlaganja kulture UV-zracima. Neki eksperimentalni podaci jasno ukazuju da je efikasnost sistema opravki DNK u vezi sa dužinom života vrste i zato se može prihvatiti gledište da je genetička nestabilnost kao posledica poremećene popravke grešaka DNK jedan od uzroka starenja organizma.

Neke nasledne bolesti čoveka su posledica poremećaja sistema popravki DNK, kao što je, npr., pigmentna kserodermija i dr. U bolesnika sa kserodermijom zapaža se prevremeno starenje. Njihove fibroblasti u kulturi kraće žive nego normalne ćelije. U njih je smanjena brzina reparacije DNK u poređenju sa normalnim ljudima, posle ozračivanja UV-zracima (za reparaciju DNK normalnih ćelija je potrebno 6 časova, a za ćelije pacijenata do 30 časova i kod njih se ne postiže nivo normalne reparativne sinteze). Neefikasnost i nedostatak enzima popravki dovodi do promene aktivnosti enzima replikacije, a poremećaj replikacije DNK na kraju dovodi do ograničenja ćelijskih deoba i obnavljanja tkiva, na što ukazuju ćelije gajene u kulturi.

Ovi akumulirani, nepopravljeni poremećaji u naslednoj informaciji imaju za posledicu pojavu niza degenerativnih oboljenja, povećanu učestalost malignih oboljenja, autoimunih bolesti, a i funkcije imunološkog sistema se smanjuju u procesu starenja.

Ako genetička nestabilnost igra ulogu u procesu starenja, postavlja se pitanje da li su germinativne ćelije pošteđene promena genetičkog materijala. Danas je dobro poznato da se genetičke abnormalnosti javljaju znatno češće u reproduktivnim ćelijama starijih osoba, naročito majki, a ređe postoje i u starijih očeva. Većinu ovih mutacija selekcija eliminiše vrlo rano, u preimplantacionom ili implantacionom stadijumu embriogeneze, u prvom trimestru trudnoće spontanim pobačajima ili kroz fenotipsku selekciju oštećenog potomstva. Postoji mogućnost da se neka oštećenja DNK otklanjaju u toku mejoze, uz pomoć enzima popravki DNK (npr., mogle bi se otkloniti epimutacije), naročito ako je sistem popravki grešaka u toku mejoze efikasniji nego u somatskim ćelijama.

Aberacije hromosoma u procesu starenja

Ranije je naglašeno da se u starijih žena, posle 35. godine života, broj aneuploidija u germinativnim ćelijama naglo povećava. Sva dosadašnja ispitivanja kariotipa somatskih ćelija čoveka u toku starenja su pokazala da se proporcija aneuploidija povećava sa starošću i da je, za razliku od germinativnih ćelija, učestalost hipoploidija (monosomija) veća od hiperploidija (trisomija).

Prva ispitivanja su već pokazala da se aneuploidija najčešće sreće u grupi hromosoma C i da je učestalija u žena nego u muškaraca. Primenom novih tehnika za identifikaciju hromosoma utvrđeno je da u starijih žena uglavnom nedostaje hromosom X (tab. 14.1.) mada se monosomije sreću sa različitom učestalošću i

Tabela 14.1

HROMOSOM	ŽENE		MUŠKARCI	
	2n – 1	2n + 1	2n – 1	2n + 1
1	4		1	
2	1		1	
3	7		0	
4	4	1	2	1
5	1		2	
6	3	1	1	
7	5	1	1	1
8	13	2	5	
9	9	2	2	1
10	3		9	1
11	6		3	
12	5		2	
X	84	27	0	
13	6		3	
14	2	1	2	1
15	4		3	
16	8	1	3	
17	11	1	3	
18	6	1	7	
19	11	1	5	
20	7	2	6	1
21	19	3	11	
22	12	1	4	
Y			14	
UKUPNO	231	45	90	7

u svim parovima autosoma. Među autosomima najčešća je monosomija hromosoma 21 (tab. 14.1.).

Koji mehanizmi dovode do gubitka hromosoma iz hromosomskog seta somatskih ćelija?

Na osnovu detaljnih analiza procesa mitoze, pretpostavljena su dva mehanizma, različita za X-hromosome i autosome.

Aneuploidija X-hromosoma se objašnjava poremećenom funkcijom centromere, koja dovodi do preranog razdvajanja hromatida, ili je u pitanju neki drugi tip disfunkcije centromere, što može dovesti do gubitka X-hromosoma u nekim ćelijama i povećanja broja X-hromosoma u drugim ćelijama. U kulturi limfocita se može zapaziti da se u nekim ćelijama u metafazi javljaju štapićasti

hromosomi, paralelno postavljene hromatide, bez centromerne konstrikcije. Ovaj fenomen je označen kao prevremena deoba centromere i karakteriše X-hromosome u inače normalnoj metafazi. Prevremena deoba centromere X-hromosoma je četiri puta češća u ćelijama žena od 60 i više godina nego u žena mlađih od 40 godina.

Postavlja se pitanje: koji se od dva X-hromosoma gubi?

Dosadašnja iskustva ukazuju da se mnogo češće gubi kasno replikativni (inaktivni) X-hromosom. Moguće je da se inaktivni X-hromosom gubi zbog toga što ne završi u potpunosti sintezu DNK i kondenzaciju u vreme koje je karakteristično za normalnu mitozu. Ne može se isključiti ni mogućnost slučajnog gubitka hromosoma,pa ćelije koje gube inaktivni X-hromosom bolje preživljavaju nego one koje gube aktivan X-hromosom, na kome se izražavaju brojni geni sa esencijalnim funkcijama u metabolizmu ćelije.

Novija istraživanja su pokazala da drugi mehanizam, koji verovatno dovodi do aneuploidije autosoma, može biti "izmeštanje hromosoma". Ovo bi predstavljalo prvu fazu u pogrešnom razdvajanju hromosoma. Izmeštanje hromosoma je fenomen koji se zapaža u metafazama ćelija koje nisu prethodno izlagane kolcemidu ili prefiksacionom tretmanu hipotoničnim rastvorom. U tom slučaju deobno vreteno se zadržava i sa njim povezani hromosomi. U takvim metafazama se može zapaziti da neki hromosomi zbog disfunkcije deobnog vretena nisu obuhvaćeni mikrotubulima vretena, već se nalaze u njegovom "praznom" središnjem delu (sl. 14.3.). Takvi hromosomi se mogu izgubiti ili može doći do njihove slučajne segregacije, što odgovara klasičnom nerazdvajanju hromosoma. U prvom slučaju nastaju dve monosomične ćelije, a u drugom bi jedna ćelija bila monosomična, a druga trisomična za određeni hromosom.

Slika 14.3

Kada je vršena analiza kariotipa osoba različite starosti, utvrđeno je da se relativno učešće pojedinačnih parova autosoma u aneuploidijama ne razlikuje u različitim uzrasnim grupama,ali se učestalost aneuploidija povećava sa starošću.

Oni hromosomi, koji su bili "izmešteni", nađeni su uvek u aneuploidnom stanju. U mlađih žena češće dolazi do eliminacije, a u starijih žena do slučajne segregacije hromosoma, pa se izrazito povećava učestalost hipo- i hiperploidije autosoma. Ovo je naročito karakteristično za žene starije od 60 godina.

Strukturne aberacije hromosoma se takođe nalaze u somatskim ćelijama starih osoba, jer se povećava stopa prekida na hromosomima. Verovatno se najčešće prekida jedan lanac DNK unutar hromatida. Strukturne aberacije koje se javljaju i progresivno akumuliraju verovatno su posledica dejstva mutagena kojima je čovek izložen tokom života. Pokazalo se da distribucija prekida hromosoma nije slučajna, i da je učestalost strukturnih aberacija četiri puta veća u starih nego u mladih osoba. Prekidi na hromosomima se javljaju na dobro poznatim fragilnim mestima – najčešće su uključene trake 3p 14.3; 3p 21.1; 16q 23, a u nešto manjem stepenu i Xp 22.32.

Pored aneuploidija i strukturnih lezija hromosoma, u somatskim ćelijama starih osoba se povećava i učestalost poliploidija. Poliploidizacija je značajan proces koji povećava stabilnost ćelije pod dejstvom mutagena i predstavlja kompenzatornu reakciju ćelije na poremećaj genetičke konstitucije.

Prema našim podacima, kod muškaraca starih u proseku 71,2 godine zapažene su promene u ponašanju hromosoma u mejozi. Izrazito je smanjena učestalost hijazmi,koja odražava smanjen broj crossing overa. Za sada je teško izvoditi pouzdane zaključke o značaju ove pojave, jer nisu zapaženi univalenti, kao i veća separacija malih bivalenata, što bi se očekivalo, jer je broj hijazmi smanjen.

Akumulacija promena hromosoma je očigledna u procesu starenja, ali treba odgovoriti na ključno pitanje; da li su promene hromosoma uzrok ili posledica procesa starenja?

Postoji niz fizioloških promena koje se moraju uzeti u obzir pri donošenju definitivnih zaključaka. Na primer, povećanje aneuploidije u žena moglo bi se eventualno povezati sa hormonalnim promenama, karakterističnim za menopauzu, sa autoimunošću tiroideje ili čak sa povišenjem krvnog pritiska.

U rezimeu o genetičkoj kontroli starenja treba naglasiti da postoji već dosta eksperimentalnih dokaza koji ukazuju na postojanje veze između genetičke nestabilnosti i starenja. Nakupljanje promena u hromatinu, kao što su somatske genske i hromosomske mutacije, prekidi lanaca DNK i dr. verovatno su posledica poremećaja popravki oštećenja DNK u hromosomima.

Kapacitet sistema popravki lezija DNK je u pozitivnoj korelaciji sa dužinom života; mutacije su mnogo češće u ćelijama starih osoba, a ćelije u kulturi uzete od pacijenata sa različitim poremećajima sistema popravki grešaka DNK, kao što su Bloomov sindrom, Cockaineov sindrom, Fanconijeva anemija, ataxia telangiectasia, imaju smanjen potencijal rasta u poređenju sa kontrolnim kulturama.

Nužno je ipak napomenuti da je problem starenja ćelija i organizma mnogo složeniji i da genetička nestabilnost verovatno nije jedini uzrok procesa starenja, već da postoji interakcija između genetičkih i drugih činilaca koji upravljaju procesom starenja.

15

Populaciona genetika

Svaka živa vrsta po pravilu obuhvata više populacija, grupa jedinki koje naseljavaju određeno stanište. Unutar populacije jedinke se slobodno ukrštaju i daju plodno potomstvo. Ako je vrsta po broju jedinki mala i ograničena na određeno stanište, a jedinke se međusobno slobodno ukrštaju, vrsta bi odgovarala populaciji.

Organizovanje jedinki u populacije je jedan od načina prilagođavanja sredini za uspešnije preživljavanje i reprodukciju.

Ukoliko vrsta zauzima veća prostranstva i naseljava različita staništa, kao što je slučaj sa vrstom Homo sapiens, onda je vrsta sastavljena od većeg broja populacija. Vrsta je diskontinuirano raspoređena, jer su uslovi sredine na različitim staništima različiti. Pod uslovima sredine se podrazumevaju svi biotički i abiotički faktori staništa koje naseljava populacija.

Udaljene populacije su podložne promenama, pa se populacije razlikuju između sebe u prostoru i vremenu. Tokom vremena, promene se akumuliraju i mogu da dovedu do divergencije unutar vrste.

Granice populacije su obično određene, ali mogu i da se menjaju. Unutar određenog staništa, brojnost populacije može da varira: na malom prostoru može da živi veliki broj jedinki, ili ih na velikom prostoru može biti vrlo malo. Promena brojnosti populacije je pod direktnim uticajem sredine, a regulisana je stopom nataliteta i mortaliteta. Natalitet povećava brojnost jedinki, a mortalitet je negativan činilac i smanjuje brojnost jedinki u populaciji.

Humane populacije, kao i sve druge, imaju određene karakteristike:

1. U određenom vremenu imaju svoju genetičku strukturu.
2. Polimorfne su.
3. U neprekidnom su kretanju (imaju svoju dinamiku).
4. U neprekidnom su uzajamnom delovanju sa sredinom koju populacija naseljava.

Kao što svaka jedinka ima svoje genetičke karakteristike, tako i populacija u jednom određenom trenutku ima svoju *genetičku strukturu,* određenu učestalost (frekvenciju) genskih alela i njihovih kombinacija. Pod ***fondom gena*** jedne populacije podrazumeva se ukupna suma svih gena svih individua koje čine populaciju, ili ukupna suma svih gena svih gameta. U užem smislu, fond gena bio bi suma gena jednog određenog genskog lokusa. Fond gena za jedno monogensko svojstvo, npr. za oblik ušne resice (srasla ili odvojena), za populaciju od hiljadu

ljudi bio bi 1000 x 2 (kod diploidnih organizama jedno monogensko svojstvo određuje par alela).

Ukoliko unutar populacije deluju samo genetički mehanizmi, frekvencije određenih gena (alela) se ne menjaju. Takva populacija je u ravnoteži, u stanju genske i genotipske nepromenljivosti. Takva populacija ne evoluira.

Evolucioni faktori, mutacije, selekcija, zatim migracije, odabrano (asortativno) parenje i dr. povećavaju učestalost jednih, a smanjuju učestalost drugih alela, remete ravnotežu populacije. Dve populacije mogu da se između sebe razlikuju po frekvenciji određenih alela i te razlike, koje se povećavaju tokom vremena, dovode do evolucije.

Genetička istraživanja mogu da se vrše kod pojedinaca, u porodicama i u populacijama. Grana nauke o nasleđivanju, koja proučava genetičke probleme grupe jedinki, genetički sastav populacije i činioce koji taj sastav menjaju u prostoru i vremenu naziva se populacionom genetikom. Populaciona genetika je kvantitativna nauka koja se služi matematičkim modelima i statističkim metodama rada. Te metode su zasnovane na proučavanju varijabiliteta članova populacije.

Svaka prirodna populacija se odlikuje raznolikošću. Raznolikost se prvenstveno zapaža na spoljnim karakteristikama (na pr., u čoveka – oblik nosa, usta, boja očiju i sl.), ali raznolikost postoji i u čitavom nizu drugih svojstava (krvne grupe, enzimi, hemoglobini i dr.). Istovremeno postojanje dva ili više oblika jednog svojstva u okviru jedne grupe jedinki (jedne populacije) naziva se ***polimorfizmom.*** U osnovi fenotipskog polimorfizma je ***genetički polimorfizam.*** Genetički polimorfizam je poseban vid varijabiliteta pri kome jedinke sa različitim karakteristikama žive zajedno, slobodno se ukrštaju i daju plodno potomstvo. Različiti oblici jednog svojstva moraju da imaju takvu učestalost da i najređi tip ima veću učestalost od one koja nastaje usled rekurentnih mutacija.

Humane populacije. Vrsta Homo sapiens, kao i druge biljne i životinjske vrste, naseljava skoro sve prostore naše planete. Kada govorimo o humanim populacijama, onda možemo da mislimo na stanovnike jednog sela, jednog grada, jedne ulice, na jednu generaciju studenata i sl.

Današnji čovek potiče od male grupe ljudi koja se još pre 1-2 miliona godina pojavila negde na afričkom tlu. Zbog velikog fertiliteta proširila se u različite oblasti Zemlje. Savlađujući prirodne neprijatelje, prilagođavajući se na različite uslove sredine i postepeno prilagođavajući uslove sredine svojim potrebama, humana populacija je doživela eksplozivan razvoj u poslednja tri veka (broj jedinki se enormno povećao).

U toku svoje istorije čovek je zavisio od okolne sredine, koja i danas reguliše brojnost većine populacija. Tokom vremena čovek koji je zavisio od količine hrane koju je nalazio u svojoj okolini, od visoke ili niske temperature, od grabljivica i bolesti, prerasta u čoveka koji sâm oblikuje svet prema svojim potrebama. Aktivno, čovek utiče i na populacije drugih vrsta: povećava brojnost jednih, smanjuje ili čak potpuno uništava druge. Menjajući odnose u prirodi, čovek postepeno ugrožava i svoj sopstveni opstanak.

Vrsta Homo sapiens je izdeljena u veliki broj prirodnih populacija. Danas se najvećim populacionim grupama smatraju rase čoveka. Po mišljenju nekih antropologa, postoji 12 rasa čoveka. Rasa bi bila grupa istorijski vezanih ljudi sa zajedničkim fondom gena. Svaka rasa obuhvata manji ili veći broj lokalnih populacija. Mada se rase međusobno razlikuju, sve grupe ljudi su u osnovi genet-

ski slične, mada mogu da se razlikuju po frekvenciji alela na različitim genskim lokusima.

Pretpostavlja se da su rase nastale prvenstveno zbog geografske izolacije, održavane su asortativnim parenjem, a na njih su delovali i drugi činioci: selekcija, genetski drift, fondatorstvo i dr. Danas, kada su komunikacije između ljudi koji pripadaju različitim rasama veoma intenzivne, sklapanje mešovitih brakova i rađanje plodnog potomstva pokazuje da svi ljudi pripadaju jednoj vrsti.

Ako bismo želeli da ispitamo sličnost ili razliku između dve humane populacije, mada se one razlikuju po genetičkoj strukturi i po frekvenciji alela za mnoga genska mesta, obično se odlučujemo za manji broj alela (jedan ili dva para alela za monogenska svojstva i sl.). Procena frekvencije alela radi se na uzorku koji treba da odražava stvarnu frekvenciju alela u populaciji, da je uzorak dovoljno veliki i da nije odabran (kriterijum konzistentnosti).

Rezultati dobijeni na uzorku ne bi smeli da odstupaju od parametara populacije (kriterijum efikasnosti).

Ako unutar jedne populacije posmatramo jedno monogensko svojstvo koje se javlja u dva alternativna oblika, npr. odvojena ušna resica i srasla ušna resica, onda to svojstvo određuju aleli *A* i *a*. Svi genski lokusi za dato svojstvo unutar populacije sadržaće, ili gen A, ili a, a svi gameti će nositi gen *A*, ili gen *a*. Koliki će biti broj genskih lokusa sa alelom *A* ili *a*, odnosno koliko će biti gameta sa *A* ili *a* alelom zavisi od učestalosti alela *A*(p) i alela *a*(q) u datoj populaciji. Prema tome, ukupan fond gena za taj genski lokus biće p + q 100% gena tog genskog lokusa.

Genski fond tog genskog lokusa nasleđen je od roditelja (prethodne generacije). Ako pretpostavimo da su roditelji bili homozigoti za date alele, *AA* i *aa*, njihovi gameti su se slobodno sparivali i dali F_1-generaciju *Aa*, koja je heterozigotna. Već u sledećoj generaciji potomci heterozigota biće AA-homozigoti, Aa-heterozigoti, ili aa-homozigoti. Ukoliko je reč o porodici, prema Mendelu, odnos potomaka bio bi 1/4 *AA* : 1/2 *Aa* : 1/4 *aa*. U populaciji takav odnos ne mora da se dobije i najčešće se ne dobija. Odnos potomaka zavisiće od frekvencije alela *A* i *a* u roditeljskoj generaciji (odnosno od toga koliko je bilo jajnih ćelija i spermatozoida koji su nosili alele *a* ili *A*). Verovatnoća da će jajnu ćeliju A oploditi spermatozoid *A* zavisiće od frekvencije alela *A*(p). Homozigoti za alele *AA* će nastati kao rezultat oplođenja između gameta A i A ili $p \times p = p^2$. Učestalost homozigota aa zavisi od učestalosti alela *a*(q), odnosno od toga koliko često će jajna ćelija *a* i spermatozoid *a* da se sretnu, $q \times q = q^2$. Jajnu ćeliju *A* može da oplodi spermatozoid *a*,ili jajnu ćeliju *a* može da oplodi spermatozoid *A* (pq ili qp). Prema tome, učestalost heterozigota biće pq + pq = 2pq.

U populaciji će odnos genotipova biti: $p^2 + 2pq + q^2$. Ti genotipovi obuhvataju sve moguće genotipove (genske kombinacije za alele A i a), ili $p^2 + 2pq + q^2 = 100\%$.

Odnos genotipova sledeće generacije zavisi od broja jajnih ćelija A i a i spermatozoida prethodne generacije, pa prema tome, ako nikakvi činioci ne menjaju p i q, frekvencije alela i genotipova bi i u sledećoj generaciji ostale iste. Za jednu populaciju u kojoj se frekvencija alela ne menja kroz generacije kažemo da je u ravnoteži. Ovu činjenicu su nezavisno jedan od drugog ustanovili engleski matematičar Hardy i nemački lekar Weinberg i formulisali je 1908. god. kao Hardy-Weinbergovo pravilo. Ovo pravilo je osnov populacione genetike. Primenom Hardy-Weinbergovog pravila možemo da ustanovimo da li je za neko

određeno svojstvo populacija u ravnoteži, da li je sparivanje slučajno ili asortativno, da li neki nepoznati ili poznati činilac remeti ravnotežu populacije i sl. U medicinskoj genetici ono može da nam pomogne pri analizi multifaktorijalnih bolesti ili anomalija, ili pri određivanju broja heterozigota za neki štetni alel (heterozigoti su prenosioci recesivnih štetnih gena za čitav niz bolesti: enzimopatije, hemoglobinopatije i dr.). Prema Hardyju i Weinbergu, ovo pravilo se može primeniti na idealnu populaciju (mendelsku populaciju), koja ima dve osnovne odlike: a) svaka individua se slobodno pari sa individuom drugog pola i b) populacija se u celini ne menja, statična je. Drugim rečima, svaka fiziološki sposobna individua se pari sa svakom fiziološki sposobnom individuom suprotnog pola i nikakve sile ne remete ravnotežu populacije, odnosno frekvenciju gena. Idealna populacija (mendelska populacija) ima određene karakteristike:

- dovoljno je velika (nekoliko stotina jedinki),
- sparivanje jedinki je slučajno (panmiksija),
- jedinke imaju ujednačen fertilitet i vijabilitet i
- unutar populacije nema migracije, selekcije, mutacije i drugih činilaca koji bi remetili ravnotežu populacije.

Izračunavanje frekvencije gena

Pri proučavanju humanih populacija moramo imati u vidu da čovek ne sklapa brakove slučajno, već da čitav niz faktora, ukus, socijalno-ekonomski status, religija i dr. utiču na sklapanje brakova i stvaranje potomstva. Pa ipak, ima svojstava za koja možemo da smatramo da važi panmiksija. Tako, npr., kod sklapanja brakova niko ne postavlja pitanje za M i N krvnu grupu i većina ljudi i ne zna da li pripada M, N ili MN krvnoj grupi. Osobe M krvne grupe su homozigoti za alel M (MM), osobe N grupe su homozigoti za alel N (NN), a heterozigoti MN su MN krvne grupe (kodominacija). Prema tome, ako unutar jedne grupe ljudi izračunamo da: 29,16% ima krvnu grupu M, 21,3% krvnu grupu N, a 49,6% krvnu grupu MN, onda je u toj populaciji fenotipski odnos (a on je identičan genotipskom odnosu, jer svaki genotip ima odgovarajući fenotip):

$$p^2 : 2pq : q^2 = 100\%$$

$$29{,}16 : 49{,}6 : 21{,}3 = 100$$

Alele M imaju svi homozigoti MM, i to u oba genska lokusa, a heterozigoti MN na jednom genskom lokusu. Prema tome, kada znamo broj homozigota i heterozigota, možemo izračunati frekvenciju alela M:

$$p = p^2 + \frac{1}{2}(2pq)$$

$$p^2 + 29{,}16 \text{ a } 2pq = 49{,}6$$

$$p = 29{,}16 + \frac{1}{2}(49{,}6)$$

$$p = 29{,}16 + 24{,}8$$

$$p = 53{,}96 \text{ ili } 54.$$

Od sto genskih mesta 54 zauzima gen M. Ako je ukupni fond 100%, onda će q biti:

$$1 - 0{,}54 = 0{,}46.$$

U različitim populacijama frekvencija alela M i N može da bude vrlo različita: (tab. 15.1.).

Ispitujući učestalost gena M i N u generaciji roditelja i dece, Berberović i saradnici su dokazali da je frekvencija gena u dve uzastopne generacije vrlo slična: (tab. 15.2.).

Ukoliko dominantni homozigot i heterozigot imaju isti fenotip, onda se frekvencija gena može izračunati na osnovu broja recesivnih homozigota. Recesivni

Tabela 15.1

BROJ JEDINKI	POPULACIJA		% M	MN	N	p	q
6.129	Belo stanovništvo	reg. izr.	29,1 29,1	49,6 49,7	21,3 21,3	0,54 –	0,46 –
16.000	Nemačka	reg. izr.	30,6 30,6	49,1 49,5	20,3 20,1	0,55 –	0,45 –
739	Eskimi	reg. izr.	87,4 87,4	12,2 12,1	0,4 0,4	0,93 –	0,06 –
730	Urođenici Australije	reg. izr.	3.00 3,17	29,6 29,3	67,4 67,46	0,18 –	0,88 –

Tabela 15.2

RODITELJI	M	MN	N	BROJ
Majke	18,51	66,07	15,42	616
Očevi	22,89	63,15	13,92	616
UKUPNO	20,70	64,61	14,69	1232
Potomci sinovi	20,54	64,65	14,81	331
kćeri	20,05	67,37	11,58	285
UKUPNO	20,78	65,91	13,31	616

homozigoti nastaju spajanjem gameta koji nose recesivan gen (a x a), odnosno njihov broj zavisi od učestalosti gena a($q \times q = q^2$).

Ako u jednoj populaciji (npr. u generaciji studenata) 4,88% ima sraslu ušnu resicu, a 95,12 odvojenu ušnu resicu, onda će q biti $\sqrt{4,88} = 0,22$; a $p = 1 - 0,22 = 0,78$.

Čak i kada je frekvencija nekog gena vrlo mala u populaciji, broj heterozigota (prenosilaca) može da bude relativno veliki (tab. 15.3.).

Tako npr. gen za retko recesivno svojstvo alkaptonuriju nađe se u homozigotnom stanju jedanput na milion individua. Odnos aficiranih (obolelih) individua i fenotipski zdravih prenosilaca je 1:200, a na 500 jedinki u populaciji jedna nosi recesivan gen.

Gen za recesivni poremećaj albinizam u našoj populaciji ima relativno nisku frekvenciju 10% . U nekim populacijama frekvencija mu je 10%. Ako znamo da je $q = 0,10$, onda p mora da bude $1 - 0,10 = 0,90$.

$$p^2 + 2pq + q^2 = 100$$

$$0,81 + 0,18 + 0,01 = 1$$

Ukoliko je učestalost recesivnog gena za albinizam 10%, na 100 ljudi 18 će biti

Tabela 15.3

RECESIVNO SVOJSTVO	UČESTALOST OBOLELIH (q^2)	UČESTALOST PRENOSILACA (2pq)
Albinizam	1 : 20.000	1 : 71,9
Cistička fibroza	1 : 2.000	1 : 22
Feniketonurija	1 : 25.000	1 : 80
Alkaptonurija	1 : 1 milion	1 : 502

Tabela 15.4

JAJNE ĆELIJE	0,90 (A)	0,10 (a)	SPERMATOZOIDI
0,90 (A)	0,81 (AA) p^2	0,09 (pq)	
0,10 (a)	0,09 (Aa) pq	0,01 (aa) p^2	

JAJNE ĆELIJE	0,90 (A)	0,10 (a)	SPERMATOZOIDI
(A) 0,99	0,9801 (p^2)	0,0099 (pq)	
(a) 0,01	0,099 (pq)	0,0001 (q^2)	

fenotipski zdravi heterozigoti i prenosioci recesivnog gena, a 1 od 100 biće fenotipski albino. (Tab. 15.4)

Ukoliko je učestalost gena za albinizam 10‰, Na deset hiljada jedinki jedna će biti albino a na hiljadu jedinki biće oko 20 prenosilaca recesivnog gena.

Ukoliko je recesivni gen lociran na X-hromosomu, odnos genotipova ženskog pola je isti kao i u slučajevima kada je gen na autosomu. Odnos zdravih i obolelih muškaraca u populaciji odražava frekvenciju dominantnog i recesivnog alela (tab. 15.5).

Krvne grupe čoveka. Jedan od izuzetno značajnih polimorfnih sistema u čoveka je sistem krvnih grupa. Neke od njih imaju mali klinički značaj (vrlo su retka antitela) ali imaju određenu vrednost za etnologiju i genetiku. Tu spadaju Duffy, Kell, Kidd, Lutheran i drugi sistemi.

Najveći klinički značaj ima ABO i Rh (rezus)-sistem.

Krvne grupe ABO određuje serija multiplih alela u genskom lokusu na hromosomu br. 9. U jednom genskom lokusu nalazi se jedan od alela: A, B ili O.

Ako u populaciji postoje tri različita alela za krvne grupe, onda će genski fond tog genskog lokusa biti:

$$p \text{ (frekvencija A-gena)} + q \text{ (frekvencija B-gena)} + r \text{ (frekvencija O-gena)}$$

$$p + q + r = 1.$$

Pri ukrštanju (slobodnom oplođenju) gameta odnos potomaka zavisiće od frekvencije ovih alela u roditeljskoj generaciji (tab. 15.6).

Prema tome, u populaciji će odnos genotipova biti:

$$p^2 + q^2 + r^2 + 2pq + 2pr + 2qr$$

odnosno $(p + q + r)^2$.

Hardy-Weinbergov princip primenjen na humane populacije je verovatno samo aproksimacija zato što je ovaj princip apsolutno tačan samo pod vrlo specifičnim uslovima i verovatno da su za

Tabela 15.5

	0,90 X	0,10 X	Y	SPERMATOZOIDI
0,90 X	0,81 X	0,9801 ($p^{2)}$	0,9 Y	
Jajne ćelije 0,10 X	0,09 X	0,01 XX	0,10 XY	
Ukupno: 0,81 XX : 0,18 XX- : 0,01 XX- 0,90 XY : 0,10 XY				

Tabela 15.6

KRVNA GRUPA	GENOTIP	UČESTALOST GENOTIPOVA	KRVNE GRUPE (UČESTALOST)
O	OO	r^2	r^2
A	AA AO	p^2 $2pr$	$2pr + p^2$
B	BB BO	q^2 $2qr$	$2qr + q^2$
AB	AB	$2pq$	$2pq$

mnoga svojstva čoveka svi neophodni uslovi za ravnotežu teško ostvarljivi. Ovaj princip je primenljiv samo u velikim populacijama gde ne deluju činioci koji bi remetili njenu genetsku strukturu.

Mehanizmi koji određuju genetsku strukturu populacije svrstavaju se u dve grupe 1) oni koji održavaju njenu ravnotežu, 2) oni koji remete ravnotežu. Dijalektička interakcija ovih mehanizama određuje stabilnost populacije.

Kada bi populacija uvek bila u ravnoteži i kada se učestalost gena ne bi menjala, evolucija bi bila nemoguća, populacija bi bila statična.

Ranije je naglašeno da je panmiksija jedan od osnovnih preduslova za održavanje genetičke ravnoteže populacije. Odustvo panmiksije se javlja u različitim vidovima i dovodi do nepredvidivih promena u učestalosti pojedinih alela, što je dovoljno da se promeni do tada postojeća ravnoteža. Poznato je nekoliko činilaca koji menjaju učestalost alela i genotipova u populaciji. Jedni uvode nove gene (alele) u populaciju, to su mutacije i imigracije.

Imigracija je mehanizam pri kome aleli već prisutni u nekim populacijama ulaze u drugu populaciju. Ovo može dovesti do novih genetskih kombinacija. Nove alele, međutim, obezbeđuju samo mutacije.

Drugi činioci menjaju odnos različitih genotipova a samim tim i učestalost gena u populaciji. To su: inbriding, autbriding, genetički drift, emigracija i selekcija.

MUTACIJE

Bilo kakva evolutivna promena podrazumeva određeni stepen zamene jednih gena drugim i prisustvo različitih genotipova u populaciji. Ovo zavisi od postojanja različitih alela u različitim lokusima. Pojava različitih alela u jednom genskom lokusu je rezultat promene jednog gena u drugi alelni oblik, pa mutacija može biti definisana kao promena genetske konstitucije iz jednog stabilnog stanja u drugo stabilno stanje.

Mutacije se mogu pojaviti u reproduktivnim (germinativnim) ćelijama i tada se prenose na potomstvo iz generacije u generaciju. Somatske mutacije se javljaju samo u određenim delovima tela, zavisno od stadijuma ontogeneze u kome se mutacija pojavila. Somatske mutacije se ne prenose na potomstvo.

Mutacije mogu biti *spontane* i *indukovane* i pozitivna su pojava, jer obezbeđuju genetsku varijabilnost. S druge strane, mutacije su uglavnom štetne, jer su to slučajne promene u sistemu koji je već ugradio većinu od mogućih pozitivnih promena. Mada su spontane mutacije retke, većina predstavlja ponovljiv proces u toku života vrste – ***rekurentne mutacije*** – to su promene nekog gena uvek u isti alelni oblik. Uticaj rekurentnih mutacija na učestalost određenog alela u popu-

laciji može biti veliki i označen je kao *mutacioni pritisak.*

Mutacioni proces u čoveka teče neprekidno. Iako su mutacije retke, spontana stopa mutacije je dovoljno visoka da bi mogla biti prenebregnuta.

Naša saznanja o spontanoj stopi mutacija čoveka još uvek su nedovoljna. Ne samo da različiti genski lokusi mutiraju sa različitom učestalošću već i aleli istog lokusa ne mutiraju istim intenzitetom. Stopa mutacija se obično izražava brojem promenjenih gena po lokusu, po generaciji. Na primer, ako kažemo da se jedna dominantna mutacija (dominantni fenotip) javlja sa učestalošću 10:100.000 rođenih, to je broj lokusa u broju gameta koji daju 100.000 porođaja. Pošto svaki zigot nastaje spajanjem dva gameta, a svaki gamet sadrži po jedan genski lokus, tada 100.000 novorođenčadi ima 200.000 lokusa. Deset mutantnih fenotipova na 100.000 novorođenčadi označava mutacionu stopu od 10 : 200.000 lokusa ili 5 : 100.000 lokusa, odnosno 5×10^{-5}.

Indukovane mutacije nastale pod dejstvom različitih mutagena povećavaju spontanu stopu mutiranja pojedinih gena i predstavljaju opasnost, naročito za velike populacije izložene mutagenim činiocima. Povećanje stope mutacije za samo 0,001 može imati velikog značaja na populacionom planu, jer to znači rađanje više hiljada oštećene dece u datoj populaciji. Doza mutagena koja prouzrokuje stopu mutacije ekvivalentnu spontanoj stopi naziva se "duplirajuća doza"

Klasifikacija mutacija na osnovu izmene genotipa, međutim, proističe iz tri nivoa promena naslednog materijala, pa razlikujemo pored ***genskih*** i ***hromosomske*** i ***genomske mutacije.*** Ova klasifikacija ima poseban značaj za populacionu genetiku čoveka.

Metod procene učestalosti hromosomskih mutacija (aberacija) sličan je, prethodnom. Učestalost se određuje prema broju mutanata u populaciji. Hromosomske bolesti uglavnom predstavljaju nove mutacije (ne nasleđuju se), sa izuzetkom balansiranih translokacija i inverzija, koje se nasleđuju i pojavljuju u više generacija fenotipski zdravih nosilaca jedne porodice.

Učestalost hromosomskih i genomskih mutacija se može izraziti sledećim obrascem:

$$U = \frac{M}{N}$$

U = učestalost pojave hromosomskih mutacija,
M = broj mutantnih fenotipova,
N = broj ispitanih individua.

Osnovna teškoća u proceni učestalosti pojave hromosomskih bolesti sastoji se u tome što se pri mnogim hromosomskim anomalijama razviće prekida na ranim stadijumima ontogeneze, ili se mutanti koncentrišu u određenim grupama individua. Zato se objektivni podaci mogu dobiti samo na osnovu procene učestalosti hromosomskih mutacija u različitim grupama (npr., spontani abortusi, mrtvorođeni, novorođenčad).

SELEKCIJA

Posebno je značajno da se sagleda na koji način mutacija gena i selekcija njihovih alela zajedno utiču na održavanje ili poremećaj genetičke ravnoteže populacije. Mutacije i selekcija mogu da dovedu do niza složenih interakcija.

Prirodna selekcija u genetičkom smislu označava povećanje ili smanjenje učestalosti gena ili genotipova, kao rezultat diferencijalnog fertiliteta ili diferencijalnog preživljavanja nosilaca određenog gena. Prirodna selekcija znači, podrazumeva faktore koji putem eliminacije određenih genotipova narušavaju Hardy-Weinberg-ovu ravnotežu populacije.

Adaptivna vrednost genotipova – Ovaj pojam označava relativnu reproduktivnu sposobnost organizma. Ako je plodnost i

sposobnost preživljavanja svih genotipova u populaciji jednaka svaka individua daje isti doprinos sledećoj generaciji. U takvoj populaciji adaptivna vrednost (W) svakog genotipa je ista. Ako genotipovi u populaciji različito preživljavaju i nisu podjednako plodni, oni daju i različiti doprinos sledećoj generaciji pa se njihova adaptivna vrednost razlikuje. *Selekcioni koeficijent* (S) označava stepen smanjenja adaptivne vrednosti genotipa. Veličina adaptivne vrednosti (W) i selekcionog koeficijenta (S) se dopunjuju do 100% ili W + S = 1. Genotip sa najvećim reproduktivnim potencijalom ima maksimalnu adaptivnu vrednost (W = 1.0, S = 0.0). Genotipovi sa smanjenom sposobnošću za reprodukciju imaju smanjenu adaptivnu vrednost (W-S).

Ustvari, adaptivna ili selektivna vrednost jedinke predstavlja njen proporcionalni doprinos gametima jedinki sledeće generacije.

Postavlja se pitanje kako prirodna selekcija deluje na današnjeg civilizovanog čoveka? Savremena dostignuća u medicini smanjuju pritisak selekcije. Ipak selekcija se pojavljuje u svim stadijumima životnog ciklusa individue od formiranja gameta, zigota, tokom razvića embriona i fetusa, u postnatalnom periodu, sve do reproduktivnog perioda. Neki geni su i kasnije u toku života izloženi selekciji, kada jedinka već ostavi potomstvo.

Primer selekcije u gametogenezi može se ilustrovati u životinjskih organizama kada se u potomstvu heterozigota uočava markantno odstupanje od očekivanog odnosa 1:1 u korist jednog alela. Ova interakcija alela u toku mejoze naziva se *mejotski drift*. U poslednje vreme ova pojava se izučava i kod sisara, a neki rezultati ukazuju na ovaj fenomen i u čoveka. Čak i kada se obrazuju zreli gameti, ne moraju svi biti podjednako sposobni za oplođenje. Ovo se najbolje ogleda u gametskoj ili prezigotnoj selekciji spermatozoida. Spermatozoidi čoveka sadrže antigene karakteristične za ABO krvne grupe. Ako muškarac ima antigen koji nije prisutan u žene (bračnog partnera), žena može formirati antitela, koja preko cervikalne sekrecije deluju na spermatozoide, pri čemu se smanjuje fertilitet ovog bračnog para, nepovoljne genetičke kombinacije.

Mutacije hromozoma i gena sprečavaju razviće zigota ili embriona. Oko 15-20% svih začeća spontano abortira, a oko 60% ranih spontanih pobačaja je uzrokovano hromosomskim aberacijama. Među spontanim pobačajima sa normalnim kariotipom, verovatno postoji visok procenat onih koji su uzrokovani mutacijama gena; 2% dece je mrtvorođeno, a 2-3% umire u detinjstvu. Drugi vid selekcije se izražava poremećajem reprodukcije. Dobro je poznato da je deo brakova neplodan zbog genetskih poremećaja.

Selekcija štetnih dominantnih gena

Eliminacija dominantnih gena protiče brže nego recesivnih gena. Ovo se objašnjava dejstvom selekcije i na dominantne heterozigote. U slučaju retkih dominantnih gena, praktično sve osobe nosioci ovih gena su heterozigoti.

Ako je dominantni gen potpuno penetrantan i sprečava reprodukciju, nastupiće njegova potpuna eliminacija u istoj generaciji u kojoj se pojavio. U narednoj generaciji ovaj gen će se pojaviti kao nova mutacija. Ako selekcija sprečava reprodukciju samo dela individua nosilaca dominantnog gena, ili je dati gen nepotpuno penetrantan, deo ovih genotipova će se pojaviti i u sledećoj generaciji. To znači, da su mnogi mutirani geni iako štetni, ipak kompatibilni sa delimičnim fertilitetom. Ovaj fenomen je označen kao parcijalna selekcija.

Problem predstavljaju nosioci štetnog dominantnog gena u kojih se oboljenje

javlja kasnije u životu, pa mogu ostaviti potomstvo pre pojave bolesti i tako održavati štetni gen u populaciji.

Selekcija štetnih recesivnih gena

Štetni recesivni geni se odstranjuju iz populacije, ali proces eliminacije je mnogo manje efikasan zato što se samo deo recesivnih gena nalazi u homozigotnoj kombinaciji, kada na njih deluje selekcija.

Za retke recesivne gene, kada postoji mala mogućnost uspostavljanja homozigotnog stanja, mali broj gena će biti eliminisan selekcijom; čak i za češće gene selekcija nije dovoljno efikasna. Na primer, ako se homozigotni genotip (neko nasledno oboljenje) javlja sa učestalošću 1:10.000 i ako u toku 25 generacija homozigoti ne ostavljaju potomstvo, učestalost datog gena smanjiće se za samo 20%. Razlozi za neefikasnost selekcije protiv retkih recesivniih gena proističu iz činjenice da se većina ovih gena nalazi u heterozigotnom stanju, kada su zaštićeni od selekcije. Na primer, ako je učestalost jednog recesivnog alela (q) = 0,01, učestalost homozigota (q^2) samo je 0,0001, dok je učestalost heterozigota 2pq = 0,02.

Rasprostranjene oblike selekcije u humanim populacijama predstavljaju selekcije (1) protiv homozigota u korist heteroziigota i (2) protiv heterozigota u korist homozigota. Prvi vid selekcije je doveo do pojave ***balansnog polimorfizma*** stabilne ravnoteže alela održavane putem selekcije. Ako je određena mutacija rasprostranjena u populaciji češće nego što bi se očekivalo na osnovu spontanog mutacionog procesa, tj. ako učestalost retkog alela nije manja od 1%, to nam govori da postoji nasledni balansni polimorfizam. Ova pojava je široko zastupljena u populacijama čoveka. Visoka učestalost oboljenja kao što su mukoviscidoza, razne forme hemoglobinopatija (srpasta anemija, talasemija i dr.) mogu takođe biti objašnjene sa stanovišta balansiranog polimorfizma.

Srpasta anemija je oboljenje prouzrokovano recesivnim genom. Homozigoti umesto normalnog hemoglobina imaju hemoglobin S. Heterozigotne jedinke imaju veću adaptivnu vrednost u poređenju sa oba homozitoga u oblastima u kojima vlada malarija. Recesivne homozigote selekcija odstranjuje zbog naslednо uslovljenog patološkog stanja, jake anemije i njenih sekundarnih efekata, dok normalni homozigoti umiru od malarije. Plasmodium malariae jedan deo svog životnog ciklusa provodi u eritrocitima čoveka. Heterozigoti, koji pored normalnog hemoglobina sadrže i hemoglobin S u svojim eritrocitima, rezistentni su na malariju jer je hemoglobin S nepovoljan za razviće parazita. Tako se održavanjem i reprodukcijom heterozigota u populaciji održava štetni gen sa relativno velikom učestalošću, bez dodatnog mutacionog pritiska (pojave novih mutacija), iako je u homozigotnom stanju izložen oštroj selekciji.

Snižen nivo enzima G6PD (dehidrogenaza glukozo-heksofosfata). Dominantni gen koji prouzrokuje ovo stanje takođe je zastupljen sa velikom učestalošću u oblastima u kojima se endemično javlja malarija. Gen se nalazi na X-hromosomu. Žene heterozigoti imaju selektivnu prednost, jer nedostatak G6PD dovodi do smanjenja glutationa, krajnjeg produkta metaboličkog lanca koji katalizuje ovaj enzim. Glutation je neophodan za rast Plasmodiuma malariae, pa su ćelije sa nedostatkom ove supstancije pošteđene napada parazita.

***Recesivno oboljenje β* talasemija** u prošlosti je bilo široko zastupljeno u mediteranskim oblastima, gde je vladala malarija zbog selektivne prednosti heterozigota. U nekim oblastima Italije bolest

je bila prisutna u više od 10% populacije. Od II svetskog rata malarija je uglavnom eliminisana u ovim oblastima, tako da možemo očekivati da učestalost ovog gena postupno padne do nove ravnoteže na nižem nivou.

Veća reproduktivna sposobnost heterozigota je karakteristična i za nosioce gena koji prouzrokuju Tay-Sachsovu bolest, Huntingtonovu bolest i dr. Preimućstvo heterozigota može biti i neznatno, pa da se održava visoka učestalost heterozigota u populaciji. Na primer, ako heterozigot ima samo 1% više dece od normalnog homozigota koji dostižu polnu zrelost, to je već značajna prednost.

Nestabilni polimorfizam – Nisu svi polimorfizmi balansni, stabilni ili u stalnoj ravnoteži. Polimorfizam može biti i "nestabilan" ako bilo koji poremećaj ravnoteže dovodi do fiksacije jednog alela. Jedan od mogućih tipova nestabilnog polimorfizma je kada selekcija deluje protiv heterozigota. Ako oba homozigota imaju istu adaptivnu vrednost, a heterozigoti imaju manju adaptivnu vrednost, ravnoteža će biti uspostavljena samo kada je učestalost oba alela ista.

Jedan od jasnih dokaza dejstva oštre selekcije protiv heterozigota u čoveka je povezan sa alelima za Rh krvnu grupu. Deca heterozigoti Rr do nedavno su umirala od hemolize. Ova deca su rođena od Rh- majki i Rh+ oca. Svaki hemolitički fetus Rh gubi oba alela *R* i *r*. Ova selekcija protiv heterozigota ima značajne posledice. Ako jedna populacija ima istu učestalost ova dva alela (pR = qr = 0,5), nema promena u strukturi populacije, pošto istovremena eliminacija oba alela *R* i *r* neće narušiti njihovu ravnotežu.

Međutim, ista učestalost ova dva alela još nije utvrđena ni u jednoj humanoj populaciji, pa i kad bi postojala u određeno vreme, ona bi brzo bila narušena malim slučajnim odstupanjima. Bilo kakva razlika u učestalosti automatski će dovesti do pojave da će u svakoj narednoj generaciji debalans učestalosti ova dva alela postajati sve veći, dok na kraju ređi alel potpuno ne iščezne iz populacije. U većini populacija učestalost alela *R* je znatno veća od učestalosti alela *r*, pa se može očekivati da će u ovim populacijama alel *r* na kraju iščeznuti. U nekim rasama takvo postizanje alelnog šifta je ostvareno npr. Mongoli nemaju alel *r*. Nije poznata ni jedna rasa čoveka u kojoj je eliminisan alel *R*, ali odsustvo ovog alela u šimpanze možda predstavlja krajnji rezultat selekcije protiv heterozigota u ove vrste. U kavkazoida i nekih drugih rasa čoveka prisutna su oba alela *R* i *r*.

Može se pretpostaviti da su u davnoj prošlosti čoveka postojale neke populacije sa više alela *R*, i druge sa više alela *r*. Selekcija ili, možda, slučajno odstupanje, doveli du do iščezavanja ređeg alela, tako da su nastale nepolimorfne rase, jedne izogene za alel *R*, a druge izogene za alel *r*. Kasnije u toku migracije, hibridizacijom između *RR*- i *rr*-osoba, pojavile su se polimorfne grupe koje su danas prisutne u Evropi. Haldane je procenio da je za selekciju protiv heterozigota u Evropi bilo potrebno oko 600 generacija ili 15.000 godina da se smanji frekvencija Rh– individua od prvobitnih 14% na 1%.

Poznato je da Baski u Španiji imaju veću učestalost alela *r* nego alela *R*. Ovi ljudi se smatraju ostacima neke vrlo rane evropske rase. Moguće je da je ishodna evropska populacija bila izogena za rr alel, dok su imigranti pripadali rasi *RR*.

Rh-sistem ilustruje i drugu mogućnost dejstva selekcije. Adaptivna vrednost heterozigota može da varira zavisno od učestalosti alela *r* u populaciji. Na primer, ako je učestalost recesivnog gena *(qr)* velika u populaciji, može se očekivati da će selekcioni koeficijent protiv heterozigota biti visok, pošto će tada veliki

procenat majki biti Rh- (rr). S druge strane ako je gen r redak u populaciji, malo će biti i Rh- *(rr)*-majki, pa će selekcioni koeficijent protiv heterozigota biti manji.

Tranzitni polimorfizam nastaje kada jedan alel zamenjuje drugi alel koji ima manju adaptivnu vrednost. U tranzitni polimorfizam možemo uvrstiti i one slučajeve u kojima štetni gen dostiže polimorfnu učestalost putem genetičkog drifta ili drugim slučajnim procesima povezanim sa malim populacijama. Na primer, pomenuti gen za srpastu anemiju (hemoglobin S) danas nema selektivnu prednost u heterozigotnom stanju u američkiih crnaca, pošto ove populacije nisu više izložene malariji, pa je učestalost ovog gena pod dejstvom selekcije postupno opadala. Znači, ovaj polimorfizam u američkih crnaca je tranzitni, pošto se u skladu sa promenom sredine učestalost štetnog gena smanjivala u svakoj narednoj generaciji.

Neutralni polimorfizam označava stanje pri kome dva ili više alela imaju istu adaptivnu vrednost i slučajno se održavaju zajedno u populaciji. Ne može se lako utvrditi da li neki od alela ipak ima selektivnu prednost i zato se ovaj polimorfizam naziva neutralnim. Međutim, verovatno ni jedan od gena čoveka nije u potpunosti neutralan. Na primer, dominantni gen za PTC ima oko 70% kavkazoida. Nedavno je utvrđeno da postoji asocijacija između sposobnosti osećanja ukusa PTC i metabolizma tiroksina i sličnih supstancija i da ovo može biti značajno za dejstvo selekcije.

Geni za slepilo za boje (daltonizam) i ABO-sistem takođe se smatraju neutralnim u odnosu na selekciju. Ali, određene krvne grupe ABO-sistema su povezane sa pojavom čira u želucu i kancerom želuca, što ukazuje da geni za krvne grupe nisu u potpunosti neutralni.

U slučaju daltonizma situacija je više spekulativna. Poznato je nekoliko hipoteza koje ukazuju da je daltonizam imao izvesne prednosti u primitivnog čoveka. Bilo koji mehanizam da je delovao u prošlosti, daltonisti su po svoj prilici imali selektivnu prednost u određenom periodu evolucije čoveka.

Migracija

Migracija članova populacije sa jedne teritorije na drugu dovodi do razmene gena između populacija. Ovaj fenomen je označen kao *protok gena.*

Ako dve populacije imaju istu učestalost alela u određenom lokusu ova neće biti izmenjena, kada individue iz jedne populacije prelaze u drugu. Ako se učestalost alela razlikuje u određenom lokusu, slučajnom migracijom jedinki njegova učestalost će se menjati. Na primer, učestalost gena za krvnu grupu B je vrlo velika u Aziji (preko 25%) i postupno se smanjuje na ispod 10% preko Zapadne Evrope do Velike Britanije, Francuske i Skandinavije. Ovaj gradijent je objašnjen invazijom Mongola koji su se kretali prema Zapadu. Hibridizacija između Mongola i nativne populacije u kojoj gen za krvnu grupu B verovatno nije postojao, dovela je do difuzije ovog gena od Azije do Zapadne i Severne Evrope.

Znajući učestalost gena za krvne grupe u Crnaca Zapadne Afrike, Kavkazoida i Crnaca u SAD, moguće je proceniti količinu protoka gena između Crnaca i Kavkazoida u SAD. Izračunato je da je oko 26% ukupnog genskog pula Crnaca iz Detroita poreklom od Kavkazoida. Iz dobro poznatih istorijskih razloga genski protok ima isključivo jednosmeran karakter, iz populacije Kavkazoida u populaciju Crnaca.

Slično imigraciji, emigracija utiče na učestalost alela u populaciji individua koje ostaju posle emigracije.

Genetički drift

Genetička slučajnost predstavlja faktor koji može da dovede do izmene postojeće strukture populacije, tj. do poremećaja njene genetičke ravnoteže. Naime, ako se od jedne veće populacije izdvoji manji broj jedinki, genetička struktura ovako nastale nove populacije ne mora biti ista, čak se može veoma razlikovati od veće populacije od koje vodi poreklo.

Većina populacija čoveka je sastavljena od podgrupa koje ne dozvoljavaju slučajno sparivanje u striktnom smislu. Postojanje izolata je pre pravilo nego izuzetak u humanim populacijama. Takvi izolati mogu biti celo selo ili mali gradovi, gde postoji vrlo malo imigracije u toku nekoliko generacija. Izolati mogu biti posledica različite socioekonomske i rasne podvojenosti u većim gradovima ili čak celim zemljama.

Ukoliko neka grupa individua, kao deo veće populacije, ima tendenciju da međusobno stupa u brak kroz nekoliko generacija i tako ograničava razmenu alela sa ostalim delom populacije, distribucija alela unutar te populacije biće neravnomerna.

Izolati, bilo veliki ili mali, u stvari su relativno inbred asocijacije i mnogi retki geni, prisutni u takvoj grupi, mogu biti odsutni u drugoj. Iz ovih razloga, proporcije dominantnih homozigota, heterozigota i recesivnih homozigota mogu biti potpuno različite u dva izolata, a takođe drugačije u populaciji koja predstavlja sumu ovih izolata. Na primer, u SAD postoje veliki izolati stanovništva koje je poreklom iz Italije. Kod njih je nađeno da se talasemija (recesivna bolest rašireна u mediteranskim oblastima) kreće oko 1/2400, a učestalost heterozigota je 1/25. U američkoj opštoj populaciji učestalost homozigota za talasemiju je 11 /100.000, a heterozigota 1:50. Slična situacija je i sa akumulacijom štetnog dominantnog gena za metaboličko oboljenje porfiriju u potomaka jednog bračnog para poreklom iz Holandije koji se u XIX veku doselio u Južnu Afriku. Ova pojava je poznata kao efekat *rodonačelnika,* jer je verovatno jedan od roditelja doseljenika bio nosilac ovog gena (bolovao od porfirije).

Ilustrativan primer je i distribucija krvnih grupa u religioznim izolatima u Pensilvaniji, gde su nađene male grupe imigranata iz Nemačke. Preci ove izolovane grupe su 27 porodica koje su u XVIII veku došle iz Nemačke u Severnu Ameriku. U najstarijoj grupi stanovnika ovih izolata iznad 56 god. krvna grupa M je zastupljena u 55% osoba. U srednjoj generaciji od 22-55 god. ista krvna grupa je zastupljena u 68% dok se u najmlađoj uzrastnoj grupi učestalost krvne grupe M kreće oko 73%. Ova promena učestalosti alela M je očigledno rezultat genetičkog drifta, a ne mutacionog pritiska. Detaljnija analiza njihovih krvnih grupa je pokazala da po učestalosti određenih krvnih grupa odstupaju i od opšte populacije u Pensilvaniji, kao i od ishodne populacije u Nemačkoj.

Većina Indijanaca u Severnoj Americi -ima krvnu grupu O, ali jedna izolovana grupa usled slučajnog genetičkog drifta ima kao najučestaliju krvnu grupu A. Ova učestalost je veća ne samo u poređenju sa ostalim Inidjancima Severne Amerike nego je veća i od učestalosti u bilo kojoj populaciji.

Inbriding i autbriding

Odstupanje od slučajnog sparivanja (stupanja u brak) može se kretati u dva pravca. Ljudi koji su u srodstvu mogu stupati u brak češće ili ređe nego što bi se očekivalo po principu slučajnosti. Tako razlikujemo ***inbriding*** i ***autbriding.***

Sistem sličan inbridingu je ***pozitivno asortativno parenje*** kada ljudi koji su

fenotipski slični i zbog toga i genetički slični stupaju u brak mnogo češće nego što bi se očekivalo, npr. osobe slične inteligencije ili rasta, gluvoneme osobe, slepe osobe i sl.

Kada u brak preferencijalno stupaju osobe koje se međusobno razlikuju, to se označava kao ***negativno asortativno parenje.*** Na primer, crvenokosi ljudi međusobno ređe stupaju u brak nego što bi se očekivalo pri slučajnom sparivanju. Efekti negativnog asortativnog parenja su u opštem smislu slični autbridingu, ali asortativno parenje, i pozitivno i negativno, odnosi se na pojedinačna svojstva, dok inbriding i autbriding podrazumevaju odnos prema pretku (ancestoru) i utiču na ceo genotip.

Brak između srodnika označen je kao ***konsangvinitet*** i izuzetno je značajan za medicinu.

U evolutivnom smislu, svi ljudi koji danas nastanjuju našu planetu su srodni, što znači da su u određenom periodu njihove istorije imali zajedničke pretke.

Na učestalost srodničkih brakova utiče struktura populacije i shvatanje konsangviniteta zavisno od određene kulture. U nekim kulturama, kao što je slučaj sa Japanom, smatralo se da srodnički brakovi imaju izvesnu prednost nad nesrodničkim.

U populacijama sa ograničenim staništem, a naročito u onim koje su izdvojene u male socijalne grupe, srodnički brakovi su česti. Na primer, u predelima severne Švedske, u alpskim selima u Švajcarskoj, kao i jevrejskim zajednicama u mnogim gradovima, procenat brakova u srodstvu je znatno veći nego u zapadnoevropskim populacijama, gde iznosi oko 1%. Urbanizacija i povećanje pokretljivosti populacije smanjuje proporciju konsangviniteta.

Jedinke koje se nalaze u bliskom genetičkom srodstvu sadrže manji ili veći broj istih gena koje su nasledili od zajedničkih predaka. Ukoliko je stepen srodstva veći, utoliko je i veći deo genoma zajednički za dve osobe, pa bi trebalo da i stepen fenotipskih sličnosti među njima bude takođe veći.

Stupanjem u brak međusobno srodnih osoba nastaje potomstvo kod koga se veći broj zajedničkih gena može naći u homozigotnom stanju nego što se može očekivati u opštoj populaciji.

Ispitivanja u jednoj maloj izolovanoj religioznoj grupi srednjeg zapada u SAD su pokazala, da je u toku jednog veka na svakih pet brakova jedan bio u srodstvu. Učestalost jednog autosomnog recesivnog oboljenja, muskularne distrofije, bila je veća u ovim porodicama nego u opštoj populaciji, gde je incidencija ovog oboljenja 38:1,000.000 individua.

Procenjuje se da je u evropskim populacijama oko 20% roditelja osoba sa albinizmom u srodstvu, kao i 40% roditelja Kavkazoida sa Tay-Sachsovom bolešću (infantilna amaurotička idiotija). Među Japancima incidencija srodničkih brakova u kojima se javljaju ova oboljenja je još veća i iznosi 37-54% za albinizam i 55-85% za Tay-Sachsovu bolest.

Mnoge inbred-populacije se odlikuju visokom incidencijom recesivnih poremećaja tamo gde je ovo slučaj, autbriding će bez sumnje smanjiti učestalost ovih bolesti. Tako, smanjena učestalost brakova između Aškenazi Jevreja znatno će smanjiti incidenciju Tay-Sachove bolesti, koja je u ovoj grupaciji izuzetno česta. Jasno je da frekvencija ovog štetnog gena neće biti smanjena, ali će veća proporcija gena biti u heterozigotnom stanju.

Brakovi u srodstvu povećavaju stopu homozigotnosti, što je izuzetno značajno za retke recesivne gene. Kada vršimo procenu srodnosti, želimo da znamo kolika je verovatnoća da dve osobe u srod-

stvu prenesu na svoje potomstvo određene gene nasleđene od zajedničkog pretka. Na ovo dobijamo odgovor izračunavanjem koeficijenta ukrštanja u srodstvu (F), koji nam govori o verovatnoći da će dete biti homozigot za dati gen poreklom od zajedničkog pretka. Za izračunavanje koeficijenta (F) koristi se sledeći obrazac:

$$F = \frac{1}{2}\, n$$

(1/2) = svaki potomak sadrži polovinu gena jednog od roditelja,
n = stepen srodstva između jedinki koje stupaju u brak.

Svaki dalji stepen srodstva smanjuje proporciju zajedničkih gena i verovatnoću pojave homozigota. (Tab. 15.7).

Teorijski najjednostavniji, mada i najređi primer je brak između brata i sestre -- *incest.* Ako se u ovakvom braku rodi dete sa recesivnim oboljenjem, znači da su oba roditelja nasledila štetni gen od jednog od njihovih roditelja. Pretpostavimo da su deda i baba deteta imali genotip A1A2 i A3A4. Mi želimo da znamo verovatnoću, da će se jedan od ova četiri alela naći u homozigotnom stanju kod unuka. Verovatnoća da otac deteta ima alel A1 je 1/2, kao i da majka ima isti alel je 1/2, a verovatnoća da će njihovo dete dobiti alel A1 od oca i od majke je ista 1/2 pa je verovatnoća za pojavu homozigotnog stanja u deteta (1/2 – 1/2) = 1/4.

Drugi tip incesta, brak između roditelja i deteta, takođe ima koeficijent inbridinga (F) = 1/4. Procenjeno je da se u SAD (Mičigen) javlja oko 20 trudnoća godišnje kao rezultat incesta, brat-sestra, otac-kći i da potomstvo iz ovih brakova pokazuje za 30% veću smrtnost i pojavu urođenih anomalija u dece u poređenju sa opštom populacijom.

Najčešći brakovi u srodstvu su između prvih rođaka, gde je proporcija zajedničkih gena 1/8. Verovatnoća da će dete prvih rođaka biti homozigot je F = 1/16. U mnogim zemljama sveta zakon zabranjuje ovakav brak između osoba koje imaju zajedničke babu i dedu.

Inbriding, međutim, može biti i pozitivan, što zavisi od prirode homozigota. Poznati su mnogi primeri talentovanih osoba čiji su roditelji bili u srodstvu.

Tabela 15.7

STEPEN SRODSTVA	PROPORCIJE ZAJEDNIČKIH GENA	VEROVATNOĆA POJAVE HOMOZIGOTA
Srodnici I stepena Roditelji – deca Braća – sestre Dizigotni blizanci	1/2	1/4
Srodnici II stepena Stričevi, ujaci, tetke Nećaci Polubraća Polusestre	1/4	1/8
Srodnici III stepena Prvi rođaci Braća i sestre od stričeva, ujaka, tetaka	1/8	1/16

Literatura

Berberović, Lj., Hadžiselimović, R. i Sofradžija, A. 1979, Populaciona genetika sposobnosti osećanja ukusa blagog rastvora feniltiokarbamida (PTC) u stanovništvu Bosne i Hercegovine. Genetika 29-39.

Bočkov, N.P., A.F. Zaharov, V. I. Ivanov, 1984. Medicinskaja genetika. #Medicina", Moskva.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Rass, M., Roberts, K., Watson, J.D. 1983. Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing, Inc., New York - London.

Clarke, C. A. 1977. Human Genetics and Medicine. 2nd ed. The Camelot Press Ltd, Southampton.

Connor, J. M., Ferguson - Smith, M.A. 1985. Essential Medical Genetics, Blackwell Scientific Publication, Oxford - London - Edinburgh.

Davis, Y. R., Rogers, B. B., Hegeman, R. M., Thes, C.A. and Veomett, J. C. 1985. Balanced reciprocal translocations : risk factors for aneuploid segregant viability. Clin. Genet. 27:1-19.

Diklić, V., Kosanović, M., Tešić, P., Devečerski, M., Mićić, J., Mijin, K., Dukić, S., Begović, O., Marković, S. 1973. Citogenetska ispitivanja osoba sa nekim anomalijama pola. Med. istraž. Supl. 1: 45-53.

Diklić, V., Mijin, K., Tešić, P., Dukić, S., Devečerski, M., Likar, M., Kosanović, M., Marković, S. i Begović, O. 1975. Primarna amenoreja - odnos fenotipa i kariotipa. Srpski Arhiv za celokupno lekarstvo 103:/1/25.

Diklić, V., Kosanović, M., Šulović, V., Garzičić, Lj., Nikoliš, J., Ljuba, Lj., Dukić, S. 1981. The variant Y-chromosome in individuals with reproductive failures. Clin. Genet. Vol. 19, No. 6:499-500.

Diklić, V., i Kosanović, M. 1988. Odabrana poglavlja : Humana genetika, Dečje Novine, Beograd

Dukić, S., Jovanović, M., Diklić, V. and Kosanović, M. 1984. A and B Postaxial Polydactyly and Syndactyly in the some person. Acta. Med. Yug. Vol. 38, No. 4, 281-296.

Emery, A. E. H. 1978. Elements of Medical Genetics. Sh. Livingstone Edinburg.

Fincham, R. S. J. 1983. Genetics, Wright PSG, Bristol, London Boston.

Fitzgerald, P. H., Donald, R. A. and Cormick, P. Mc. 1984. Reduced fertility in women with X chromosome abnormality. Clin. Genet. 25:301-309.

Flejter, W. L., Van Dyke, D. L. and Weiss, L. 1986. Location of the inactivation center in primates and other mammals. Hum. Genet. 74:63-66.

Ford, E. B. 1973. Genetics for Medical Students. Shampan and Hall, London.

Fraser, F. C. and Nora, J. J. 1975. Genetics of Man. Lea and Febiger, Philadelphia.

Fryns, J. P., Bulcke, J., Hens, L. and Van den Berghe H. 1980. Balanced Transmission of Centromeric Fission Products in Man. Hum. Genet. 54, 127-128.

Fryns, J. P., Kleczkowska, A., Van den Berghe, H. 1986. Paracentric inversions in man. Hum. Genet. 73: 205-213,

Gelloway, S. M. and Buckton, K. E. 1978. Aneuploidy and ageing : chromosome studies on a random sample of the population using G-banding. Cytogenet. Cell. Genet. 20. 78-95.

Robert, C. Galo. 1987. The AIDS virus, Scent. Am. V 256 No. 1, 38-62

Goldman, B., Polani, P. E., Daker, M. G. and Angell, R. R. 1982. Clinical and Cytogenetic aspects of X chromosome deletions Clin. Genet. 21:36-52.

Goodfellow, P. N., Craig, J. W., Smith, J. C. and Wolfe, J. 1987. The mammalion Y chromosome : Molecular search for the sex determining factor. Vol. 101 Suppl. Cembridge.

Emery, A. E. H. 1986. Osnovi medicinske genetike. Savremena administracija, Beograd.

Hartl, D. L. 1983. Human Genetics, Narper and Row, Publishers, New York.

Hartl, D.L., Freifelder, D., Snyder, L. A., 1988. Basic Genetics. Jones and Barlett Publishers, Boston.

Hassold, T. and Chin, D. 1985. Maternal age-specific rates of numerical chromosome abnormalities with special reference to trisomy. Hum. Genet. 70:11-17.

Hepflik, L. 1982. Kletočnie osnovi starenie čeloveka; u knjizi Molekuli i kletki (prevod sa engleskog). Moskva #Mir" 134-148.

Heslop, B. F., Bradley, M. P. and Baird, M. A. 1989. A proposed growth regulatory function for the serologically detectable sex-specific antigen H-Y,s. Hum. Genet. 81:99-104.

Hofman, Lj., Klepac, R., Levak-Švajger, B., Škreb, N. i Švajger, A. 1986. Biološke osnove suvremene medicine, III dio. Školska knjiga, Zagreb.

Hunter, T. 1984. The proteins of oncogenes, Scient. am. V. 251, No 2, 60-70.

Kaiser, P., 1984. Pericentric inversions, Problems and significance for clinical genetics. Hum. Genet. 68 : 1-47.

Kirkwood, T. B. L. 1988. DNA, mutation and aging. Mut. research, Pilot issue, 7-13.

Kleczkowska, A., Fryns, J. P. and Van den Berghe, H. 1988. X-chromosome polysomy in the male. Hum. Genet. 80:16-22.

Kosanović, M., Nikoliš, J., Diklić, V., Mijin, K., Marković, S., Stolević, E., Živanović, Ž. 1979. Infreqent Structural Chromosome Aberrations im Women with primary Amenorrhoea. 24 (1) : 68-70.

Kosanović, M., Lopičić, Lj., Diklić, V., and Nikoliš, J. 1983. Partial Trisomy 16q in the Son resulting from Paterna 16/21 Translocation. Acta Med. Yug. 37:335-340.

Kosanović, M. i Diklić, V., 1986. Odabrana poglavlja iz humane genetike. Dečje Novine, Beograd.

Kosztolanyi, G. 1987. Does "ring syndrome" exist? An analysis of 207 case reports of patients with a ring autosome. Hum. Genet. 75: 174-179.

Krajinović, M., Rumenić-Garzičić, Lj., Diklić, V., Petković, S., Radunović, N. 1986. Prenatalna dijagnoza naslednih oboljenja u prvom trimestru graviditeta. Med. Istraž. Vol. 19 (Suppl.) 1-2, 31-35.

Krajinović, M., Rumenić-Garzičić, Lj., Diklić, V. 1988. The solid tumour karyotyping technique applied to chorionic villi. Genetika, Vol. 20, No 1, 79-85.

Kuhn, E. M., Sarto, G. E., Bates, B. G., Therman, E. 1987. Gene-rich chromosome regions and autosomal trisomy. Hum. Genet. 77: 214-220.

Langman, L. 1972. Embriologie Medicale, Masson, Paris and Cie.

Lazarević, M. 1986. Ogledi iz medicinske genetike, Beograd.

Levitan, M., 1977. Textbook of Human Genetics. 2nd edn. New York, Oxford University press.

Maclean, N. S. P., Gregory, R. A. Flavell. 1983. Eukariotic Genes, Their Structure, Activity and Regulation. Butterworths, London.

Marlhens, F. et al. 1986. The rate of chromosome breakage is age dependent in lymphocytes of adult controls. Hum. Genet. 73:290-297.

Mićić, M., Mićić, S., Diklić, V. 1987. Spermatogenesis and miotic chromosomal behavour in aged men. Hum. Reprod. Vol. 2 No 3, 197-199.

Mićić, M., Mićić, S., Diklić, V. 1982. Low Chiasma Frequency as an Aetiological Factor in Male Infertility. Clin. Genet. 22:266-269.

Mićić, M., Mićić, S., Diklić, V. 1984. Chromosomal Constitution of Infertile Men. Clin. Genet. 25:33-36.

Milašin, J., Mićić, M., Mićić, S., Diklić, V. 1987. Ring chromosome in Bladder Cancer. Cancer Genet. Cytogenet. 28: 183-184.

Milašin, J., Mićić, M., Mićić, S., Diklić, V. 1989. Distribution of Marker chromosomes in Relation to Histologic Grade in Bladder Cancer. Cancer. Genet. Cytogenet. 43:135-142.

Miller, O. 1985. Dosage compensation in mammals: Why does a gene on the inactive X yield less product than one on the active X? Hum. Genet. 69: 97-101.

Nielsen, J. et al. 1982. Incidence of Chromosome Abnormalities in Newborn Children. Comparison Between Incidences in 1969-1974 and 1980-1982 in the Some Area. Hum. Genet. 61: 98-101.

Nikoliš, J., Stolević, E. 1978. Recombinant Chromosome as a Result of Pericentric Inversion of X Chromosome. Hum. Genet. 45: 115-122.

Nikoliš, J., Ivanović, K. and Kosanović, M. 1983. Tandem duplication of chromosome 14(q24-q32) in male newborn with congenital malformations. Clin. Genet. 23: 375-378.

Nikoliš, J. and Kekić, V. 1986. De novo 21/21 translocation Down syndrome. Hum. Genet. 73:127-129.