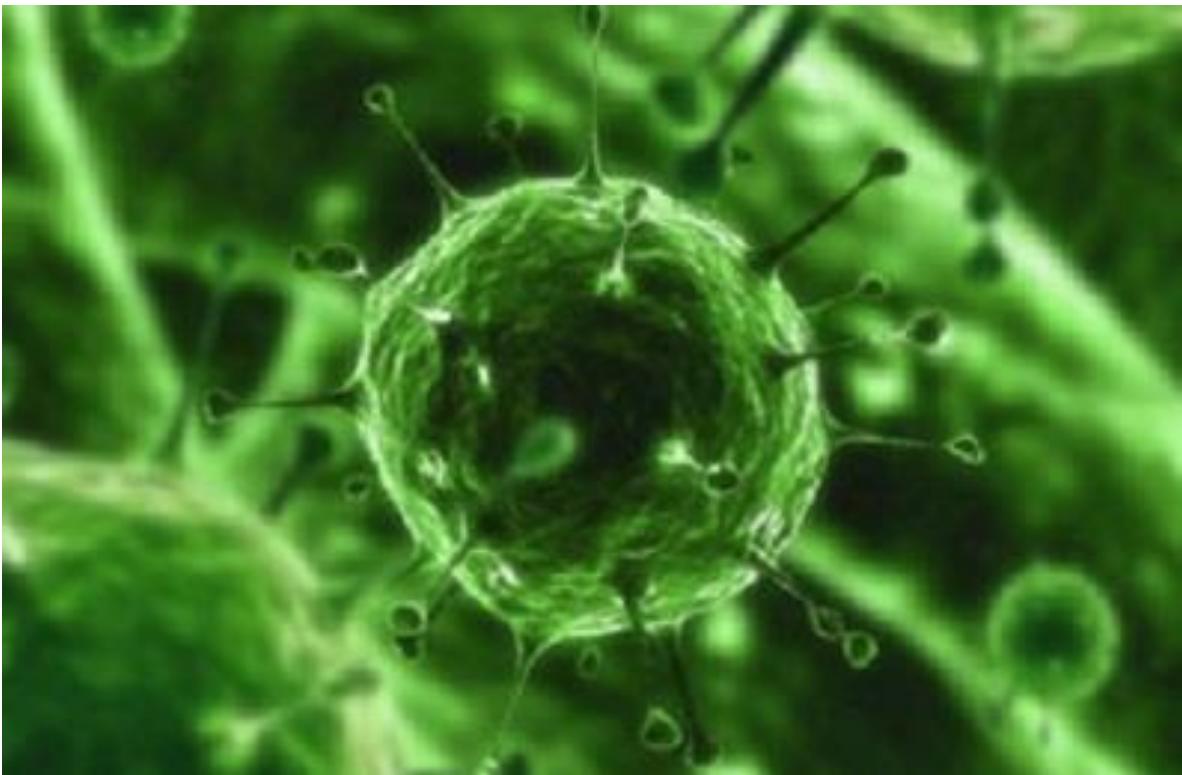


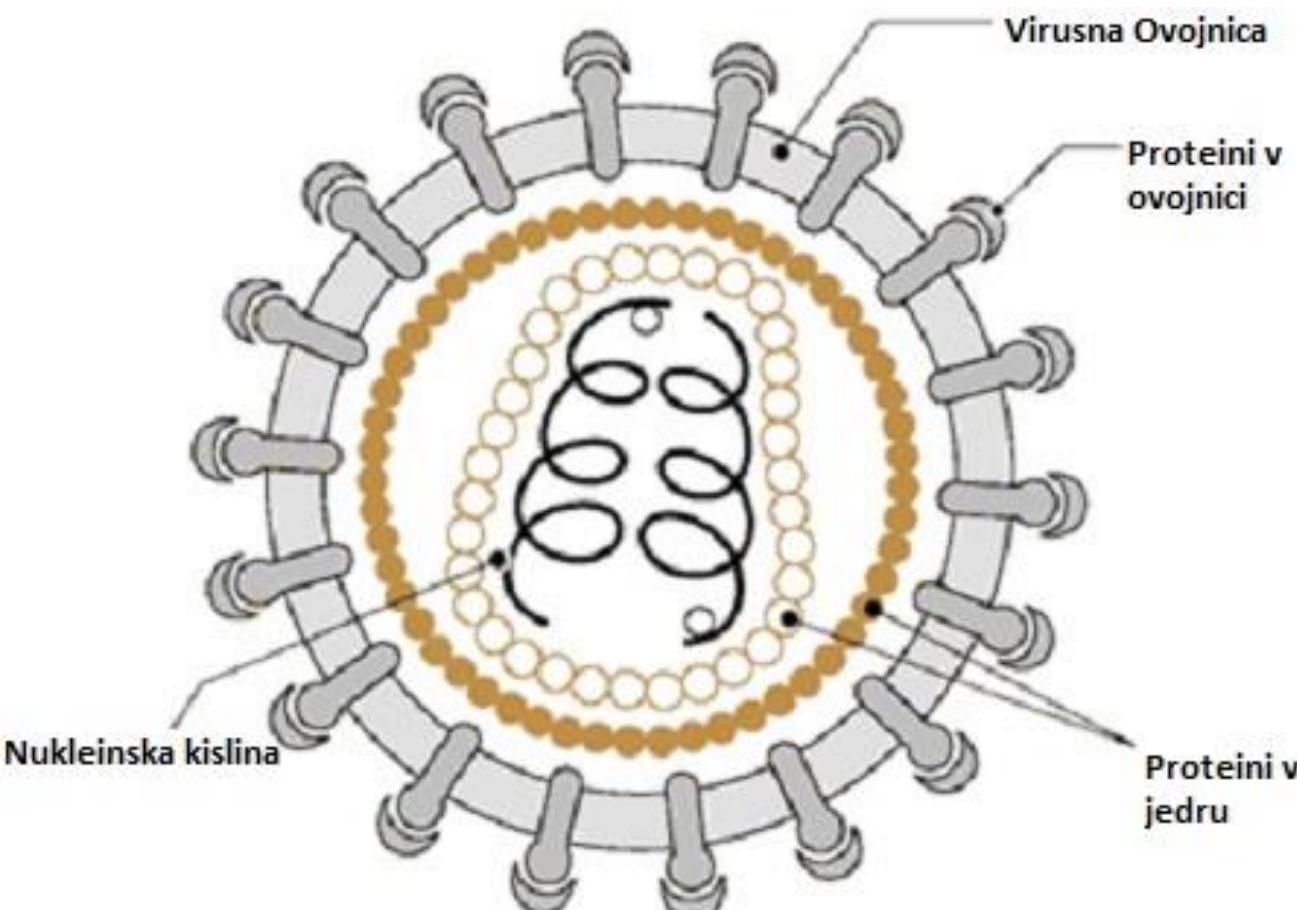
Virusi in bakterije

Virusi



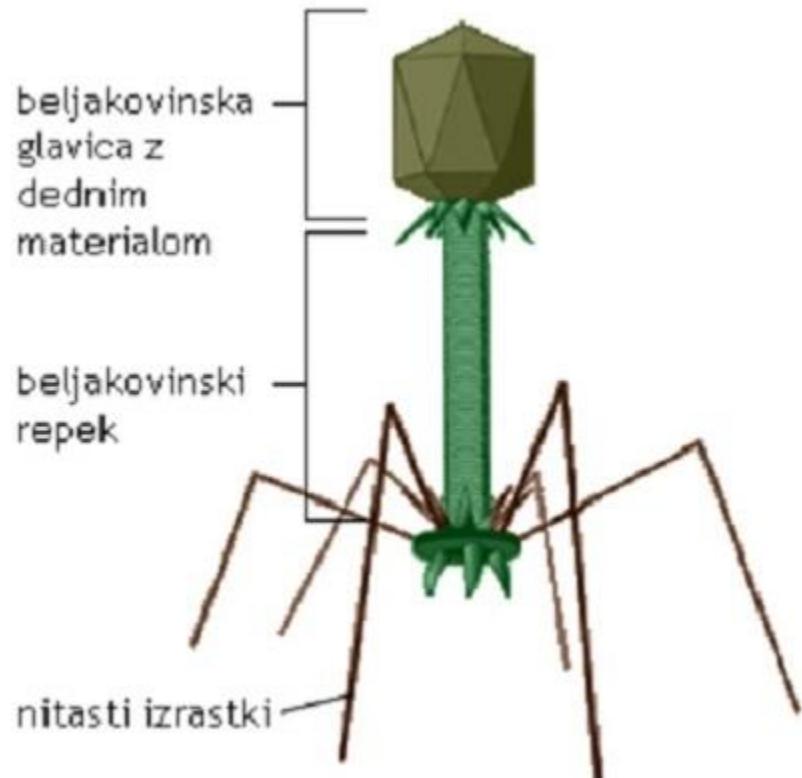
- Virusov **ne** uvrščamo med **živa bitja**, ker
 - nimajo lastne presnove,
 - ne premikajo se aktivno,
 - ne morejo se samostojno razmnoževati.
- Viruse delimo glede na nukleinsko kislino (**DNA** ali **RNA**) in glede na gostiteljske celice.
- **Virusi iste vrste** namreč napadajo le **eno vrsto organizmov**.
- So **manjši od bakterij**.

Zgradba virusov



- Virus je zgrajen iz **nukleinske kisline** (DNA ali RNA) in **kapside** (iz beljakovin), ki obdaja nukleinsko kislino.
- Nekateri virusi imajo še **dodaten membranski ovoj**, ki izvira iz gostiteljske celice.
- Lahko so **kroglasti, paličasti ali poliedrični**.
- **Bolj zapleteno zgradbo** imajo večinoma virusi, ki zajedajo bakterije.
- Imenujemo jih **bakteriofagi** ali **fagi**.

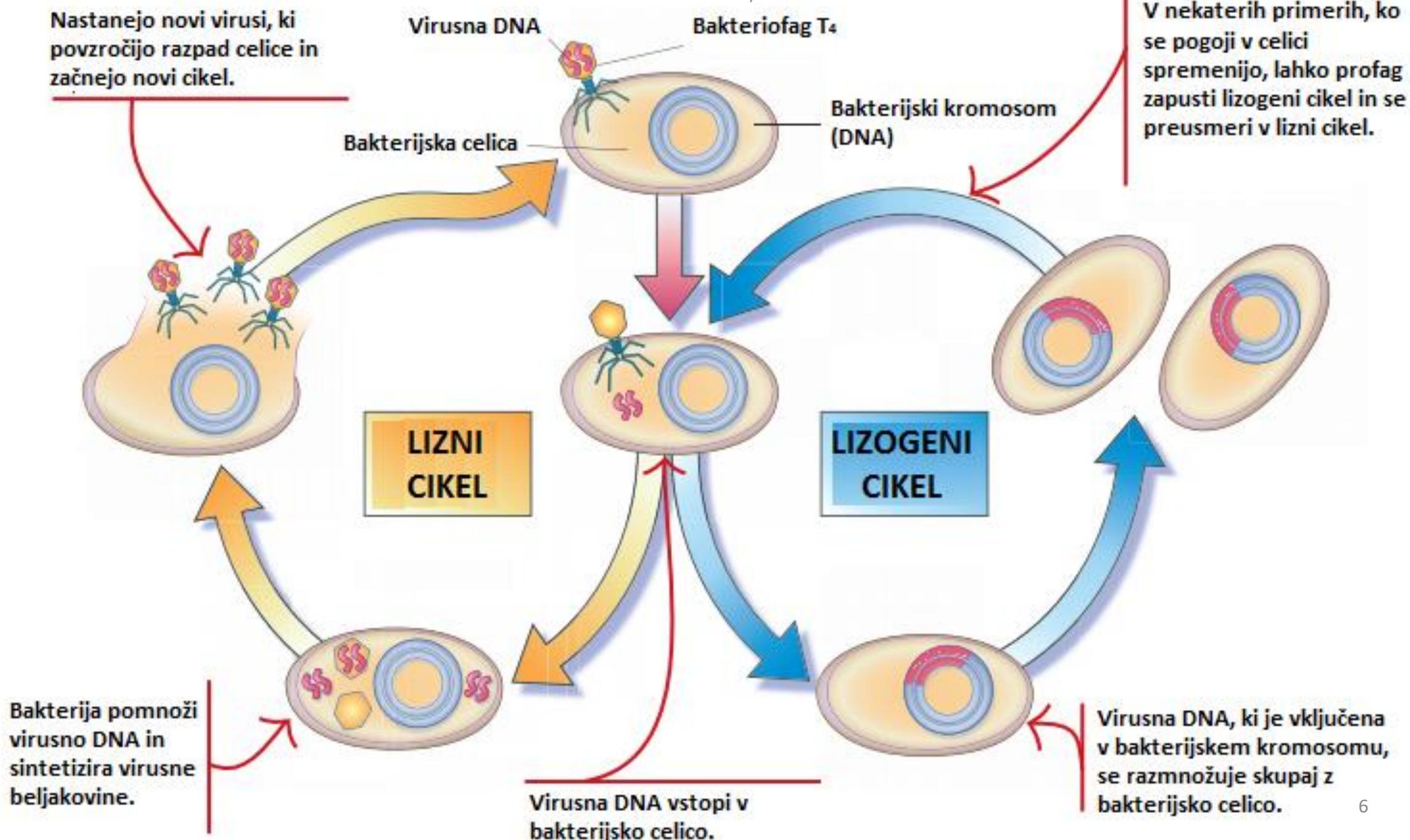
Bakteriofagi



- V **poliedrično oblikovani glavici (kapsidi)** bakteriofaga je nukleinska kislina.
- V večini primerov je **DNA**.
- Na glavico je pritrjen votel **beljakovinski repek**.
- **Nitasti izrastki** na koncu repka omogočajo, da fag **prepozna** ustrezno **gostiteljsko celico** in se **nanjo veže**.
- Kapsido gradijo beljakovinske podenote, **kapsomere**, ki so **vse enake**.

Razmnoževanje virusov

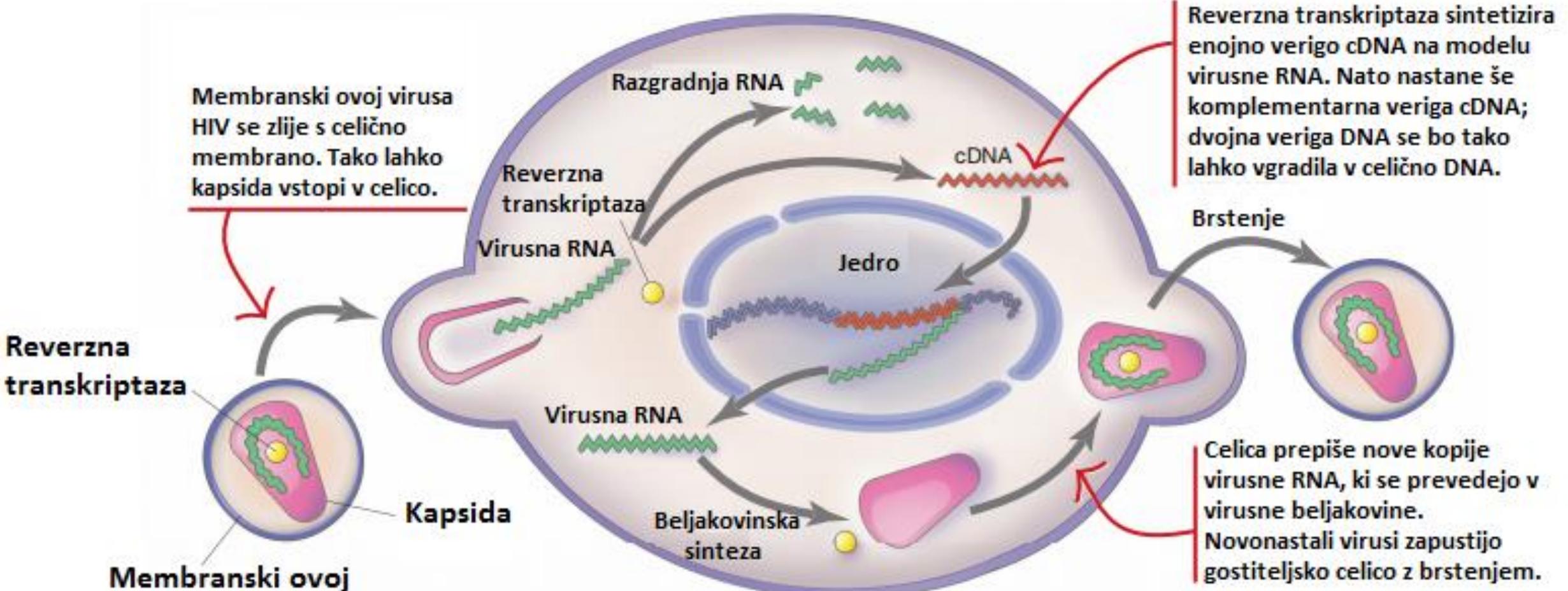
- Virus se pritrdi na membrano celice.
- Temu sledi **vstop nukleinske kisline** v celico, medtem ko **kapsida** večinoma **ostane zunaj nje**.
- **Lizni cikel** (hiter razpad gostiteljske celice) - **virulentni virusi**:
 - Virusna nukleinska kislina preusmeri presnovo gostiteljske celice v izdelovanje novih virusov.
 - Sintetizirajo se **nove virusne nukleinske kisline**, ki sprožijo **sintezo beljakovon** virusne kapside.
 - Novonastale molekule se združijo v **nove viruse**, ki **se sprostijo**.
 - Sprostitev je pogosto povezana z **razpadom** gostiteljske celice.
 - Novi virusi lahko vstopijo v nove celice.
- **Lizogeni cikel** (gostiteljska celica ne razpade) – **temperirani virusi**:
 - Pri nekaterih virusih se **nukleinska kislina vgradi v DNA** gostiteljske celice in se skupaj z njo podvojuje.
 - Vgrajen virusni dedni zapis celici **ne škoduje**, pač pa **se prenaša na hčerinske celice**.
 - **Vgrajen dedni zapis** ni več v celoti virus; imenujemo ga **provirus**, pri bakteriofagih pa **profag**.



RNA virusi, retrovirusi in prioni

- V **RNA virusih** (npr. **virus gripe**) je poleg molekule **RNA** prisoten še encim **RNA replikaza**, ki omogoči nastanek mRNA na modelu RNA.
- V **retrovirusih** (npr. **virus HIV**) je poleg molekule **RNA** prisoten še encim **reverzna transkriptaza**, ki prepiše virusni RNA v DNA, tako da se lahko virusni genski zapis vključi v DNA gostiteljske celice.
- Prioni so **infekcijske beljakovine**, ki povzročajo hude bolezni.
- Prioni imajo **enako primarno strukturo** kot **beljakovina gostiteljske celice**, ampak **nенormalно tridimenzionalno strukturo**.

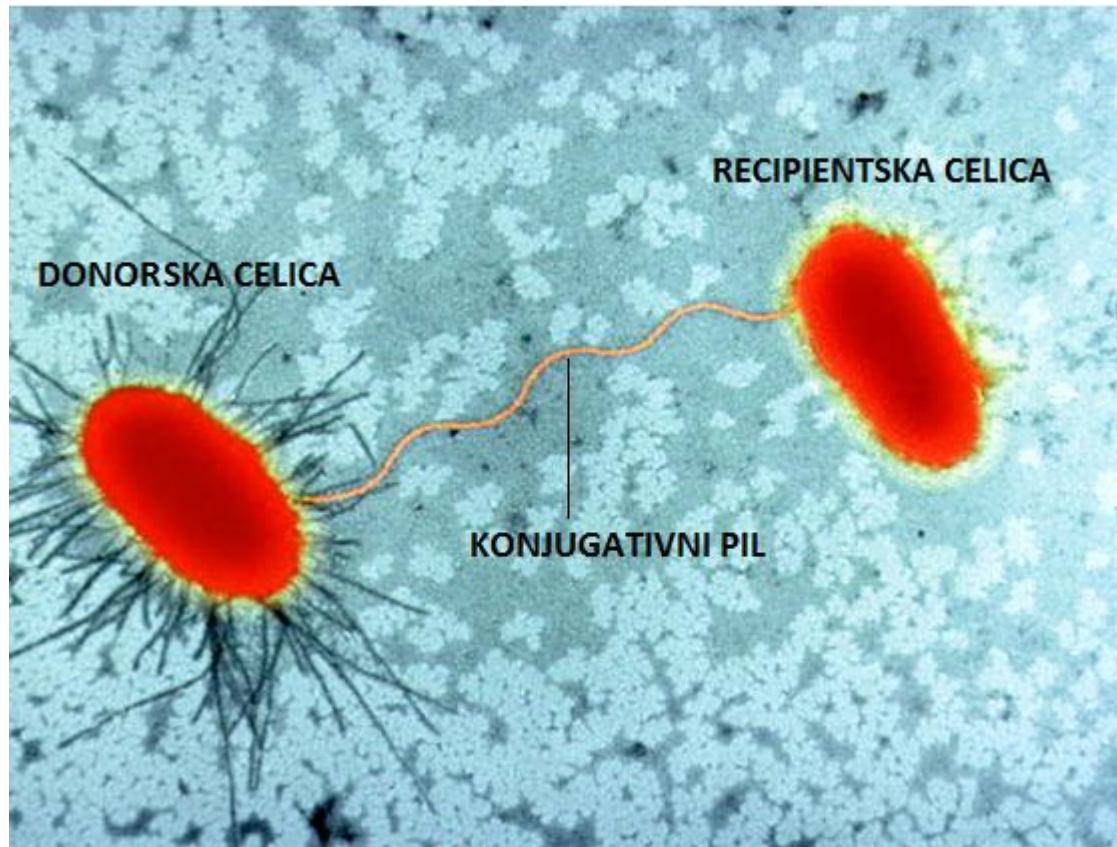
RAZMNOŽEVANJE VIRUSA HIV



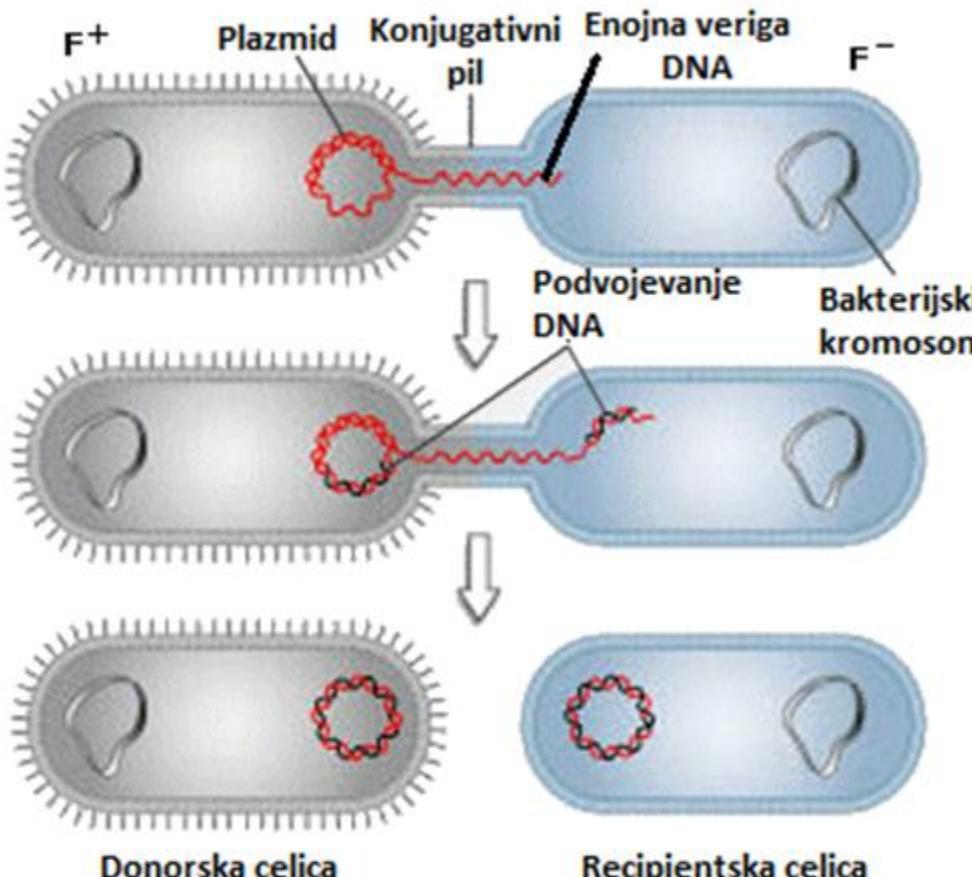
Bakterije

- Bakterije so **prokariontski enoceličarji** : nimajo jedra, njihov **genetski material je prost** v citosolu.
- Prokarionti se **razmnožujejo nespolno**: vsaka celica se razcepi na dve celici, ki sta **genetsko identični** njej sami (takim celicam pravimo **kloni**).
- Poleg razmnoževanja poznamo pri bakterijah še tri mehanizme prenosa genetske informacije:
 - **konjugacija**,
 - **transformacija**,
 - **transdukcija**.

Konjugacija



Konjugacija



F⁺ = celica, ki je sposobna konjugacije.

F⁻ = celica, ki ni sposobna konjugacije.

- Najpomembnejši prenos bakterijskih genetskih informacij je konjugacija.
- Med konjugacijo prideta v stik **donorska in recipientska celica**.
- **Donor sintetizira konjugativni pil**, s katerim se pritrdi na recipientsko celico.
- Preko konjugativnega pila **ena veriga plazmidne* DNA** preide iz donorske v recipientsko celico.
- Po prenosu DNA pride do **sinteze komplementarne verige DNA**.
- Tudi celica **F⁻** postane **F⁺**.

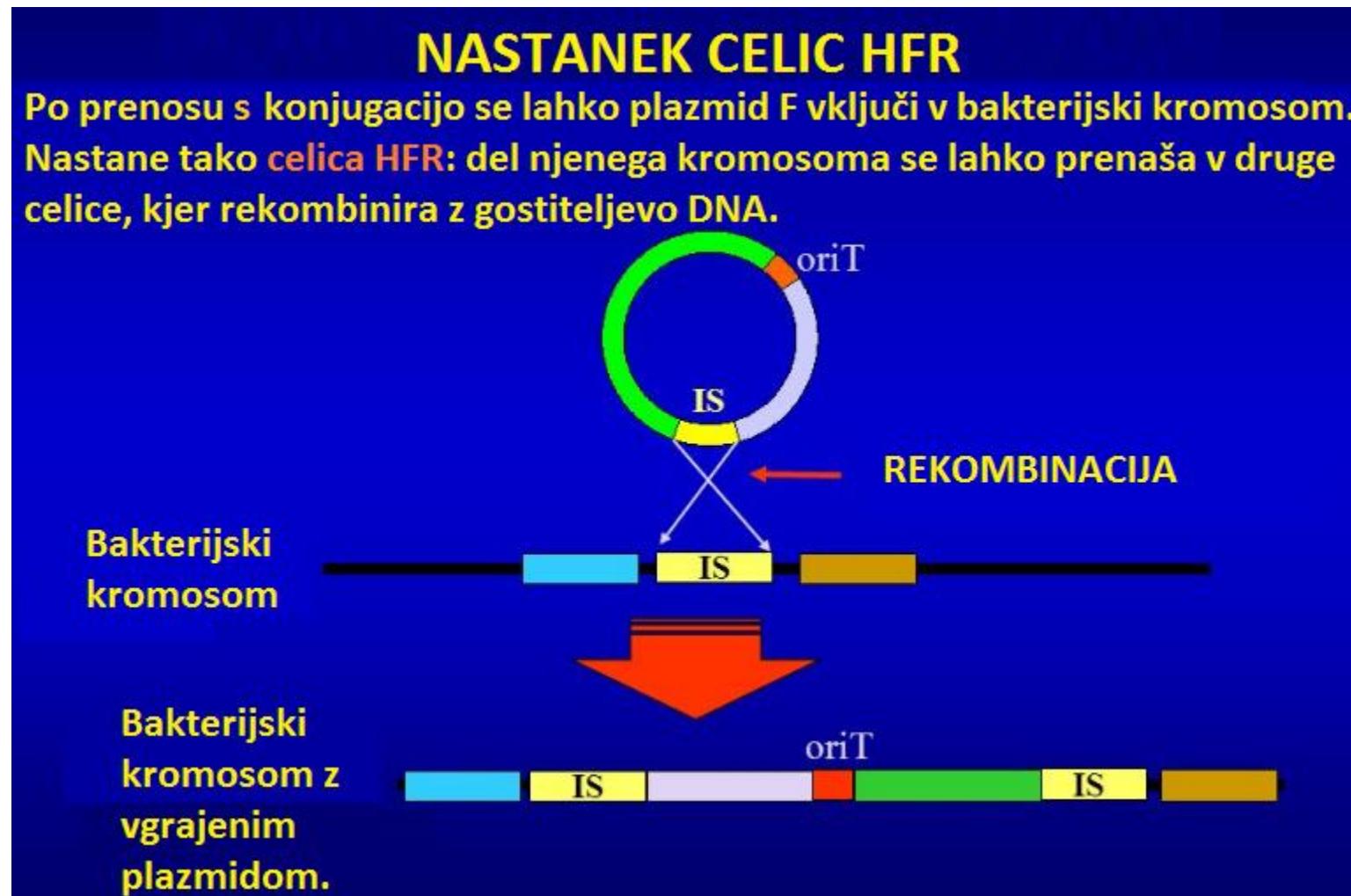
Plazmidi



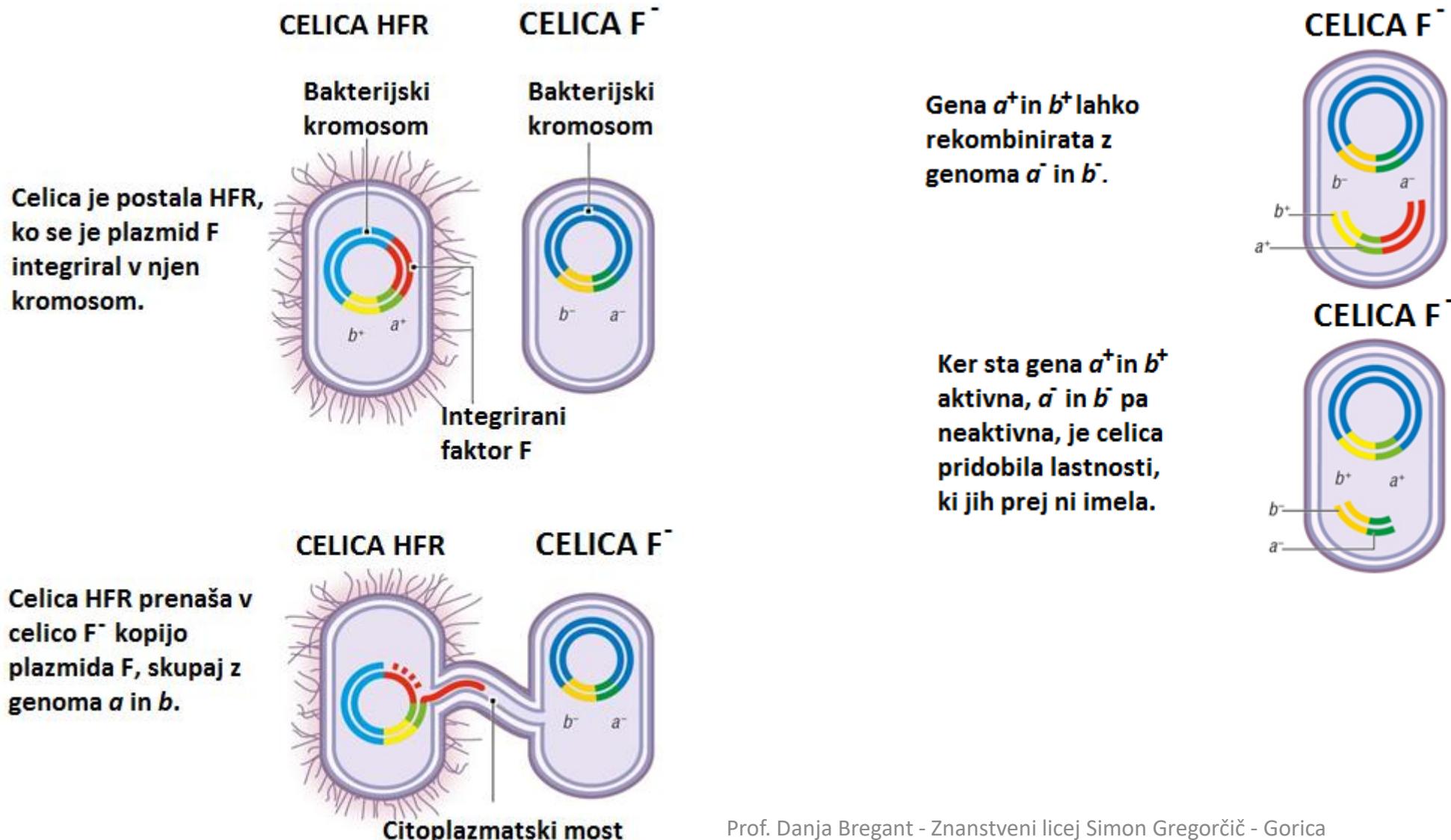
Plazmid pod elektronskim
mikroskopom

- *Plazmid je kratka (vsebuje le nekaj desetin genov), krožna molekula DNA v bakterijski celici, ki se samostojno podvojuje po modelu odvijajočega se kroga.
- Bakterija lahko ima več plazmidov.
- **Plazmidi F (Fertility)** vsebujejo informacije za nastanek pilusov in torej za konjugacijo.
- **Plazmidi R (Resistance)** vsebujejo gene za odpornost proti antibiotikom.
 - V populaciji neodpornih celic postanejo, ob prisotnosti odporne celice, v kratkem času vse celice odporne.

- Včasih se plazmid **vklojuči v gostiteljev kromosom** podobno kot profag in nastane tip celice imenovan **HFR** (*High frequency of recombination*), velika pogostost rekombinacij.



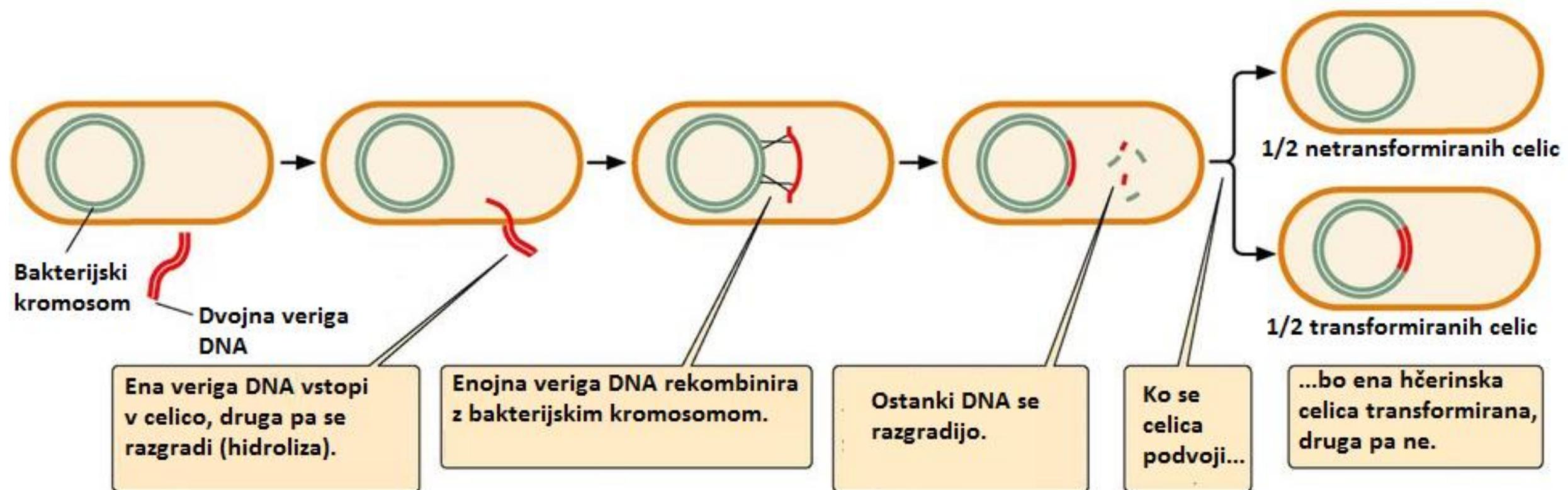
Konjugacija celic HFR



Transformacija

- Transformacija je vključitev enojne verige DNA v bakterijsko celico in njeni rekombinacija z bakterijskim kromosomom.
- V naravi se proste DNA pojavijo ob razpadu celic.
- Celice, ki so zmožne transformacije, imenujemo **kompetentne celice**.
- Transformacija je osnova vseh modernih tehnik genske manipulacije.

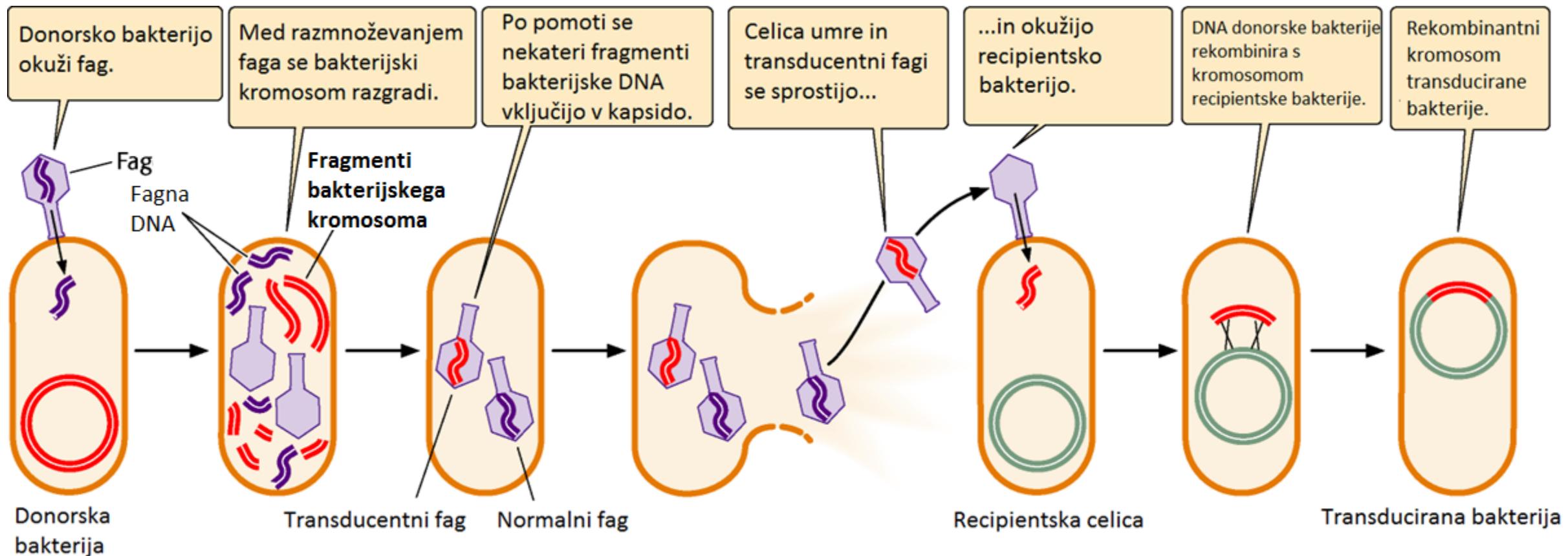
Transformacija



Transdukcija

- Do transdukcije pride, ko donorsko bakterijo okuži fag.
- Po pomoti se nekateri fragmenti bakterijske DNA vključijo v kapsido.
- Nastane transducentni fag, ki po smrti celice, okuži recipientsko bakterijo.
- Tako DNA donorske bakterije rekombinira s kromosomom recipientske bakterije.

Transdukcija



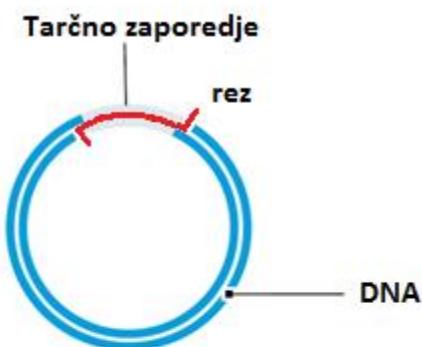
Transponibilni elementi

Transpozoni

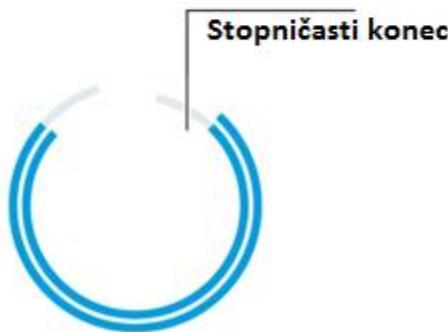
- so fragmenti DNA, ki **se premeščajo** z enega na drugo mesto istega kromosoma ali pa na drug kromosom;
 - odkrila jih je **Barbara McClintock (1950)**;
 - prisotni so bodisi v **evkariontih** kot v **prokariontih**;
 - lahko povzročajo mutacije.
-
- **Transpozaza** je encim, ki katalizira njihovo premeščanje;
 - pred premeščanjem se **transpozon podvoji**, tako da ne izgine z izvornega mesta.

Transponibilni elementi

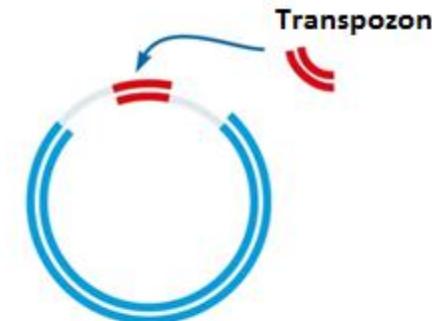
A Transpozaza prepozna zaporedje nukleotidov, ki mu pravimo TARČNO ZAPOREDJE.



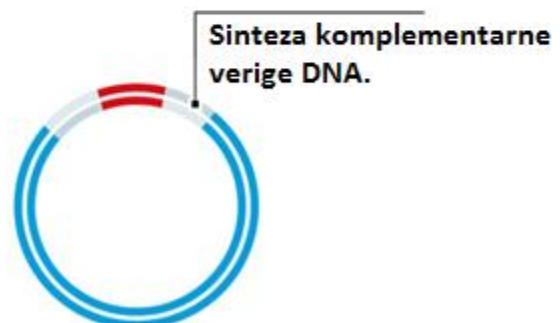
B Transpozaza prereže tarčno zaporedje tako, da nastaneta dva "stopničasta konca" enojne verige DNA.



C Transpozon se veže na stopničasta konca.



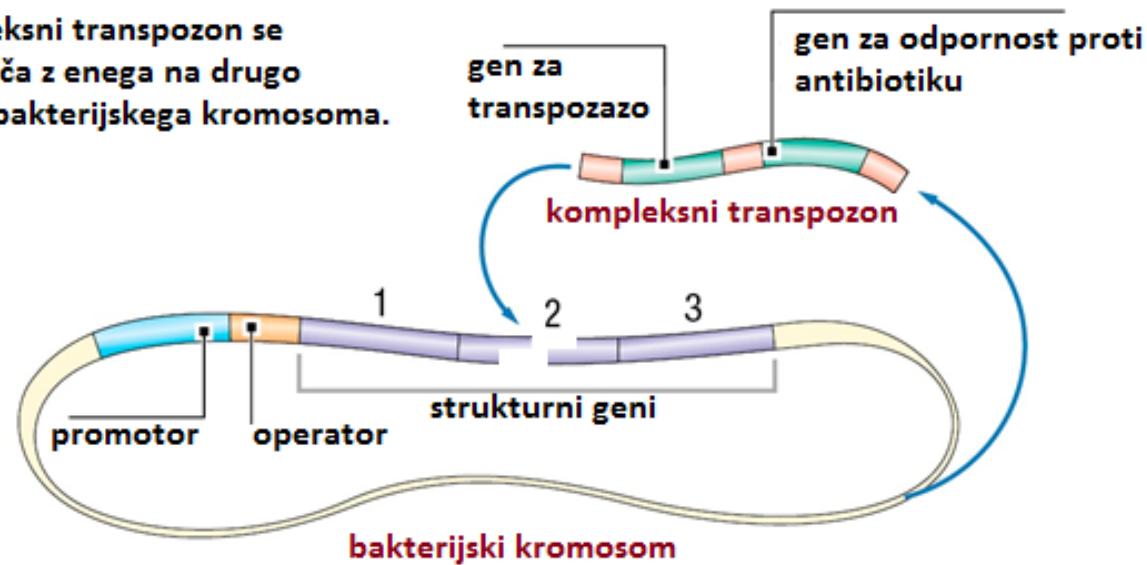
D Ob straneh transpozona nastaneta enaki tarčni zaporedji.



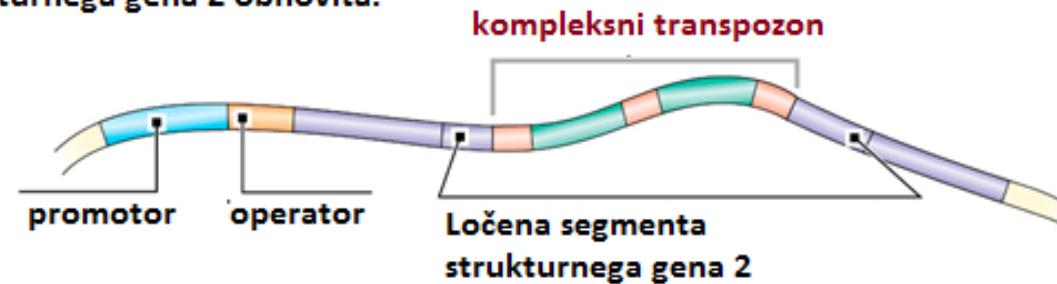
Transponibilni elementi

Kompleksni transpozoni
vsebujejo gene, ki
kodificirajo druge
beljakovine.

A Kompleksni transpozon se premešča z enega na drugo mesto bakterijskega kromosoma.



B Ob vključitvi transpozona se sintetizira komplementarna DNA, tako da se segmenta strukturnega gena 2 obnovita.



Transponibilni elementi

- V rastlinah in sesalcih, vključeno s človekom, so **v veliki meri** prisotni **retrotranspozoni** ali **retroelementi**;
- To so **fragmenti DNA**, ki **se prepišejo v RNA** in nato, s pomočjo **reverzne transkriptaze**, ponovno v **DNA**, ki se vključi na drugo mesto v kromosomu.

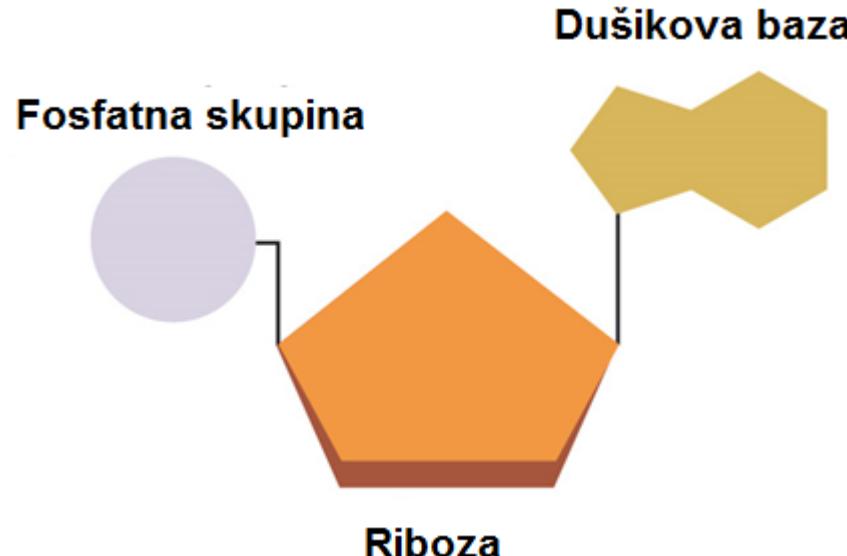
Genski kod in beljakovinska sinteza

Struktura molekule RNA

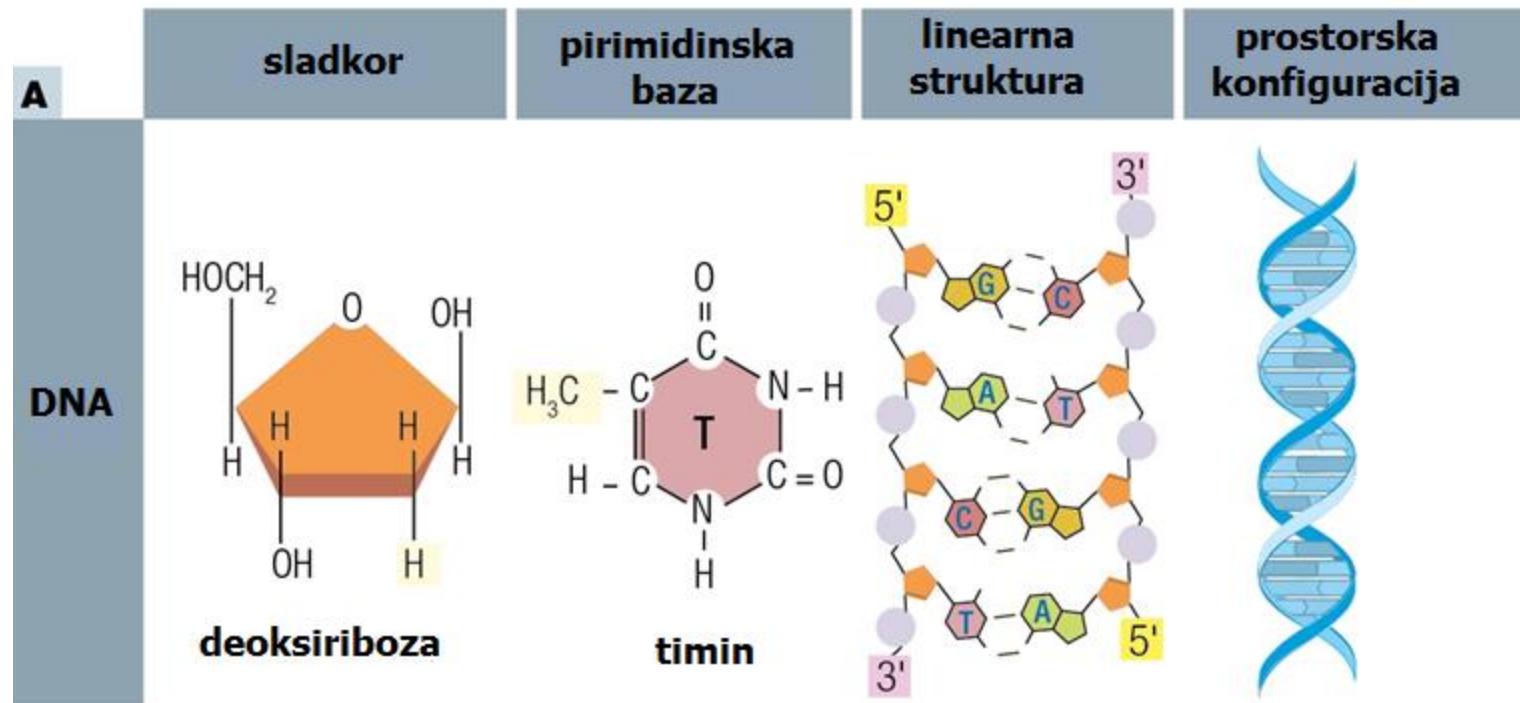
Molekula RNA vsebuje nukleotide, ki so sestavljeni iz sladkorja (riboze), dušikove baze in fosfatne skupine.

Dušikove baze so:

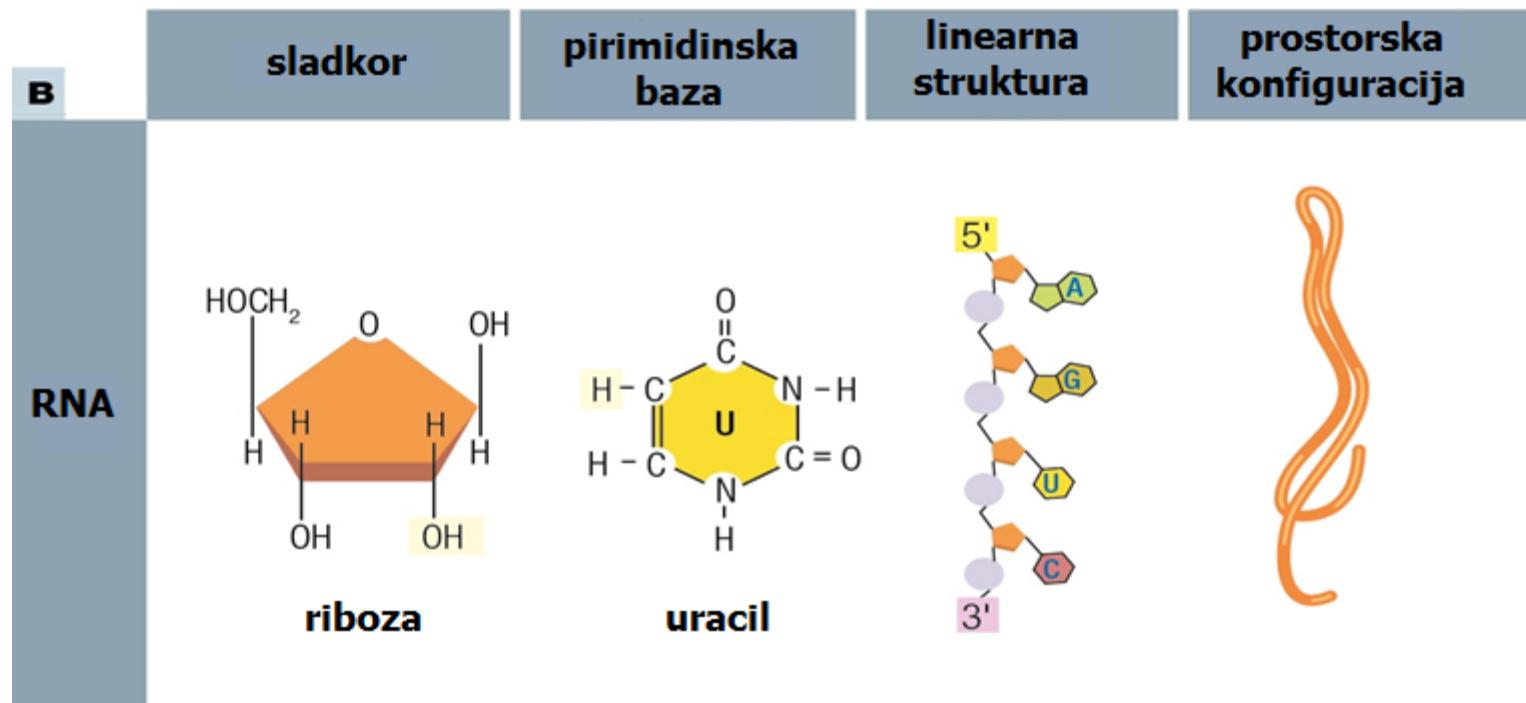
- gvanin
- adenin
- citozin
- uracil



Struktura molekule DNA



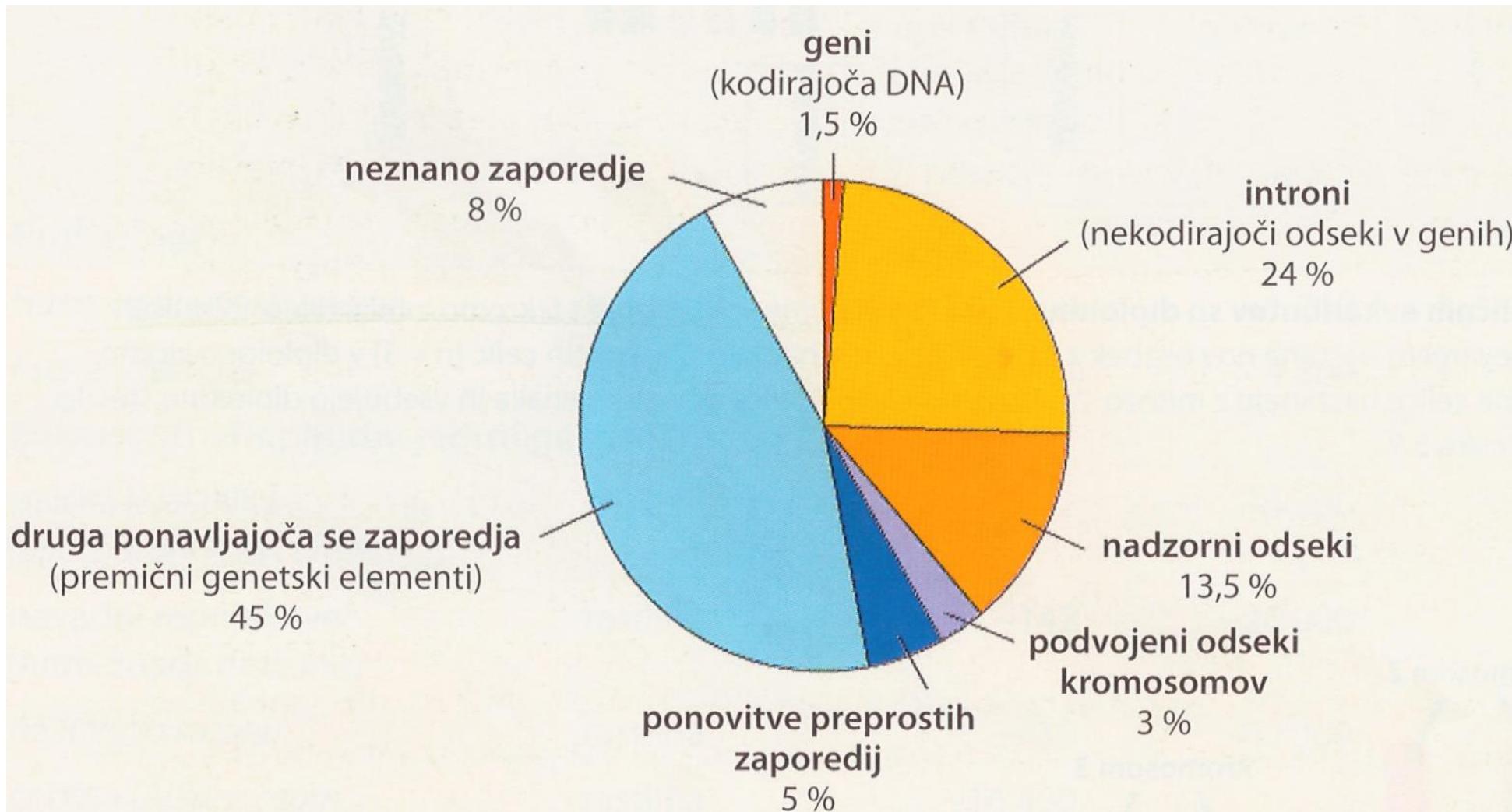
Struktura molekule RNA



Sestava človeškega genoma

- V človeškem genomu le **1,5%** DNA predstavljajo **geni (kodirajoča DNA)**.
- Znotraj genov so prisotni **nekodirajoči odseki, introni**, ki skupaj predstavljajo **24% genoma**.
- **Nadzorni odseki (13,5%)** uravnavajo izražanje genov.
- **Polovico človeškega genoma (50%)** predstavljajo različna **ponavljaljoča se zaporedja** v mnogih kopijah:
 - Podvojeni **odseki kromosomov (3%)**
 - Ponovitve **preprostih zaporedij (5%)**
 - **Premični genetski elementi (45%)**.
- Za **del človeškega genoma (8%)** zaporedje nukleotidov še **ni znano**.

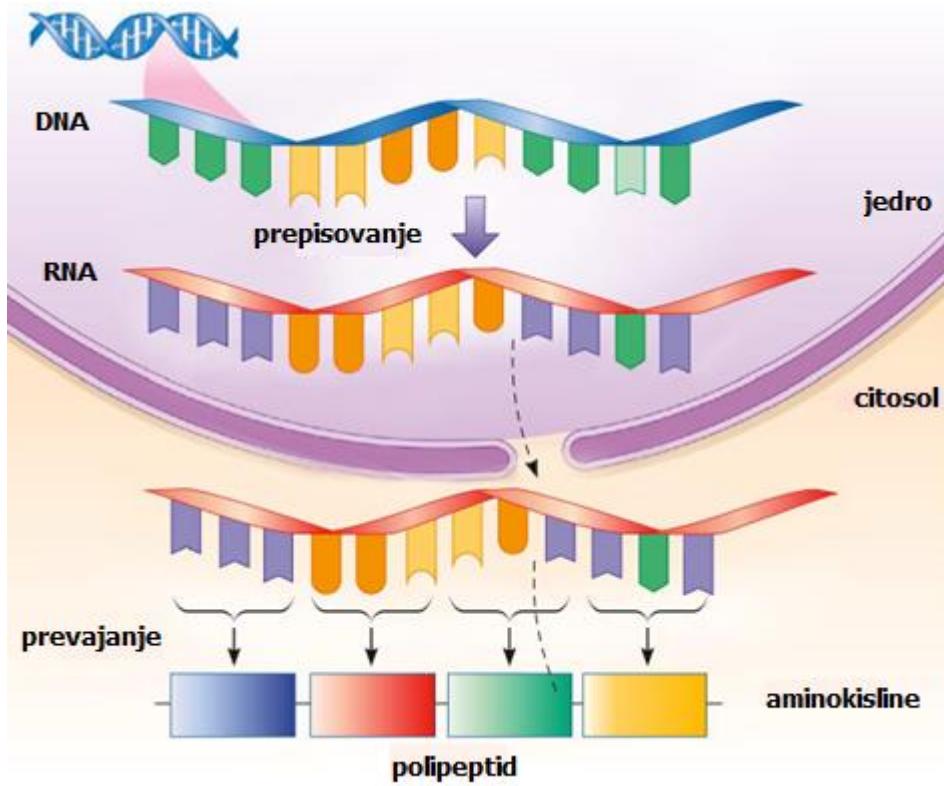
Sestava človeškega genoma



Informacija za sintezo beljakovin je zapisana v genih

- **Geni** so posamezni **odseki DNA**.
- Skupek vseh **genov** organizma je **GENOTIP**.
- Vsak **gen** določa nastanek ene **beljakovine**.
- **Beljakovine** so **molekularna osnova zunanjih in notranjih lastnosti organizma**.
- Skupek **zunanjih in notranjih lastnosti** organizma je **FENOTIP**.

Genetska informacija se prenese iz DNA na beljokane

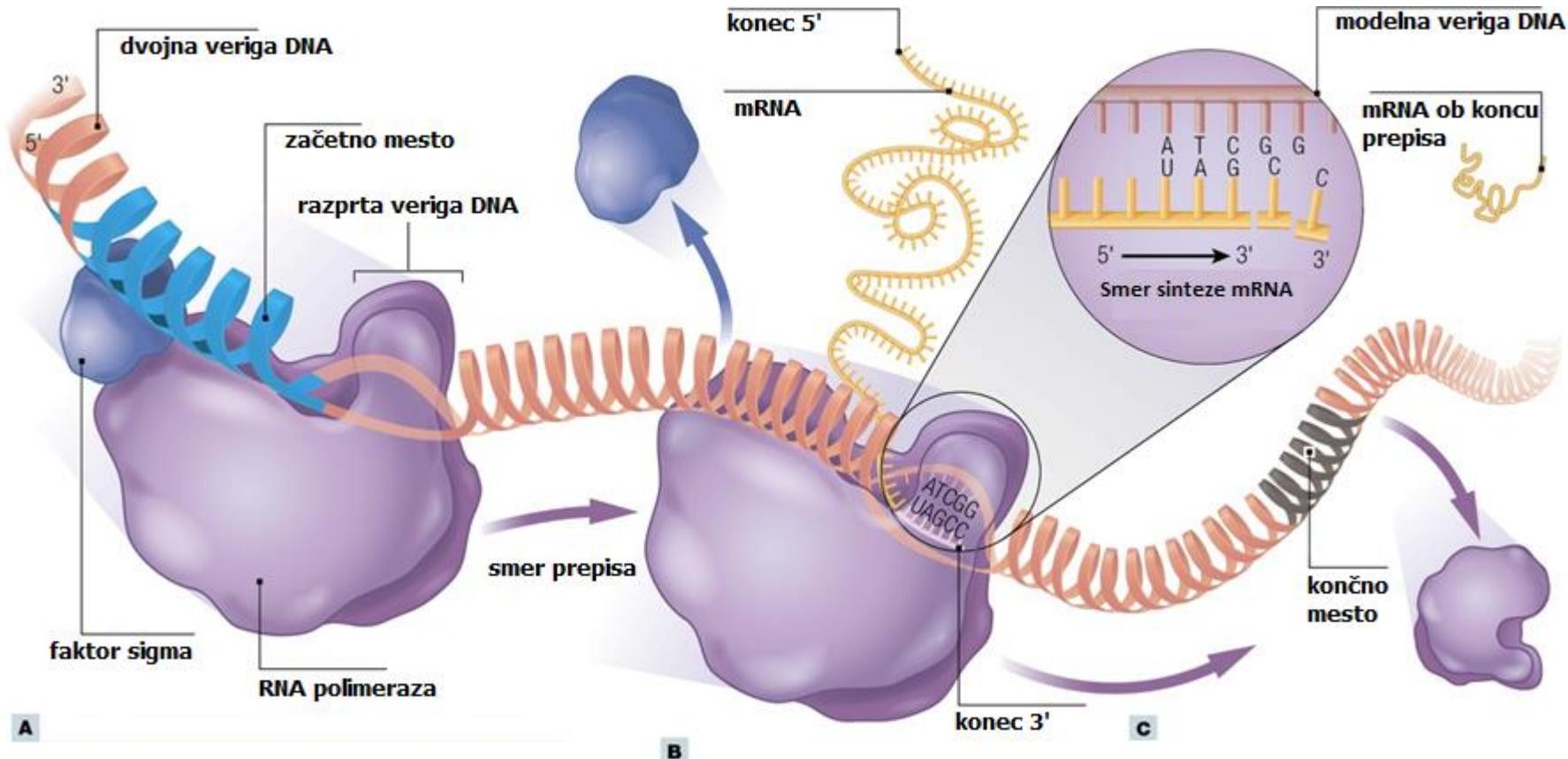


- Med **prepisovanjem (transkripcijo)** se informacija prenese iz DNA v mRNA, ki zapusti jedro in odide v citosol.
- Med **prevajanjem (translacijsko)** se informacija prenese iz mRNA v beljakovino.

Prepisovanje genetske informacije ali transkripcija

- **Obveščevalna RNA (mRNA)** (angl. *messenger*) prenaša genetsko informacijo iz jedra v citosol, kjer se bo odvijala beljakovinska sinteza.
- mRNA nastane v jedru na modelu ene verige DNA;
- nastanku mRNA pravimo **prepisovanje**;
- za prepisovanje je potreben encim **RNA polimeraza**;
- **RNA polimeraza se veže na začetno mesto (primer)** na eni verigi DNA (na drugi verigi so drugi geni);
- RNA polimeraza dodaja nukleotide nastajajoči mRNA **v smeri $5' \rightarrow 3'$** ;
- nukleotidi mRNA so **komplementarni nukleotidom** modelne verige DNA, namesto timina se pojavi **uracil**;
- prepiovanje se zaključi, ko RNA polimeraza prispe do **končnega mesta sinteze (terminator)**.

Prepisovanje – nastanek mRNA

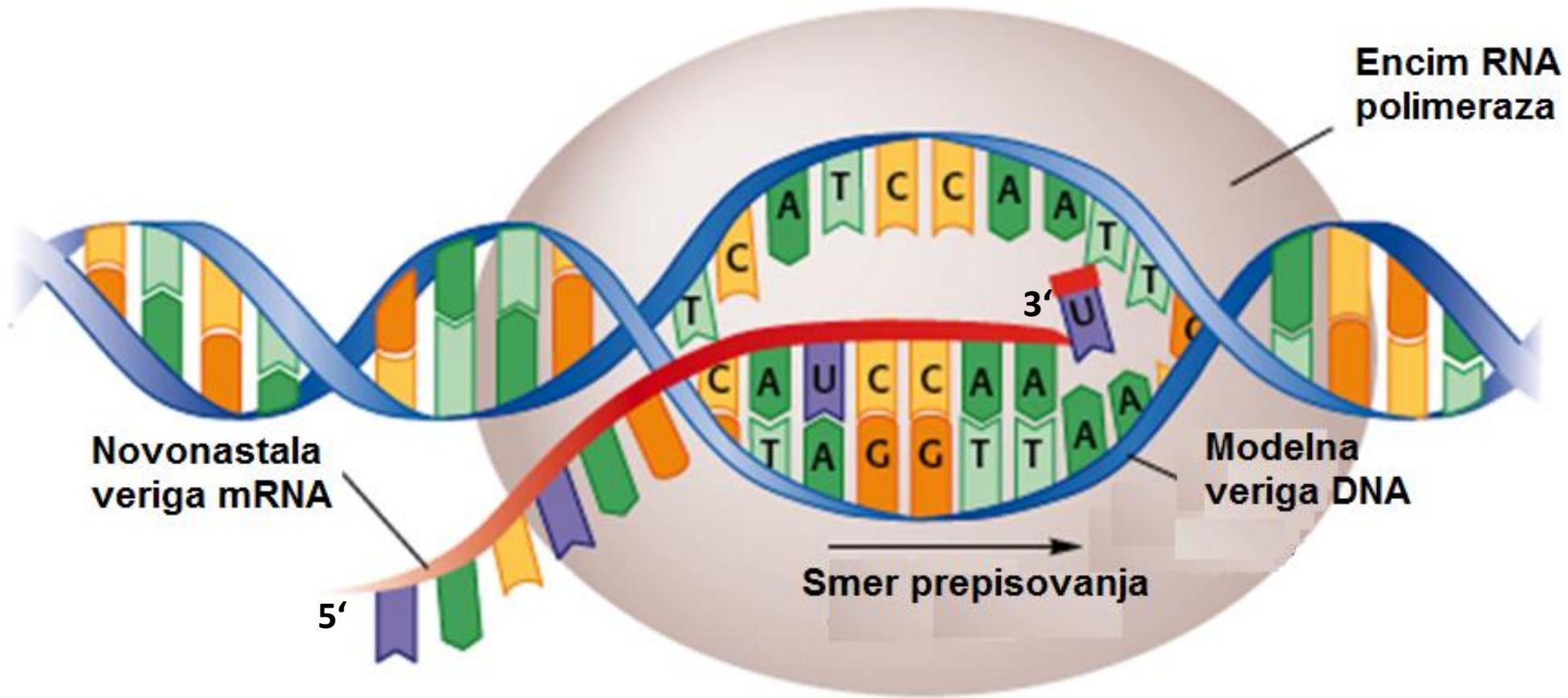


ZAČETEK: na RNA polimerazi je pritrjen **faktor sigma**, ki prepozna **začetno mesto** in se nanj poveže; **DNA** se **razpre**.

PODALJŠEVANJE: faktor sigma se **loči** od RNA polimeraze; **RNA polimeraza** potuje vzdolž dvojne verige DNA in **sintetizira mRNA**.

KONEC: ko **RNA polimeraza** dospe do končnega mesta, **zapusti DNA**; **loči se** tudi nastala **mRNA**.

Prepisovanje – nastanek mRNA



Začetek prepisovanja (začetno mesto - *primer*)

- Na začetku vsakega gena je začetno mesto sinteze (*primer*), ki mu pravimo **TATA box**; zanj je značilno **ponavljanje adeninov in timinov** (npr. TTATTAAATTAAATA).
- Vsak gen ima svoj TATA box.
- Na RNA polimerazi je pritrjen **faktor sigma**, ki **prepozna ustrezni TATA box**.
- **Glede na potrebe organizma po beljakovinah nastajajo različni faktorji sigma**, ki prepoznajo **TATA box različnih genov.**

Konec prepisovanja (končno mesto - *terminator*)

Prepisovanje se lahko zaključi na dva načina:

1. način:

- Na koncu gena je **spekularna sosledica nukleotidov**, npr..

AGTGTAGTAACACT (DNA)

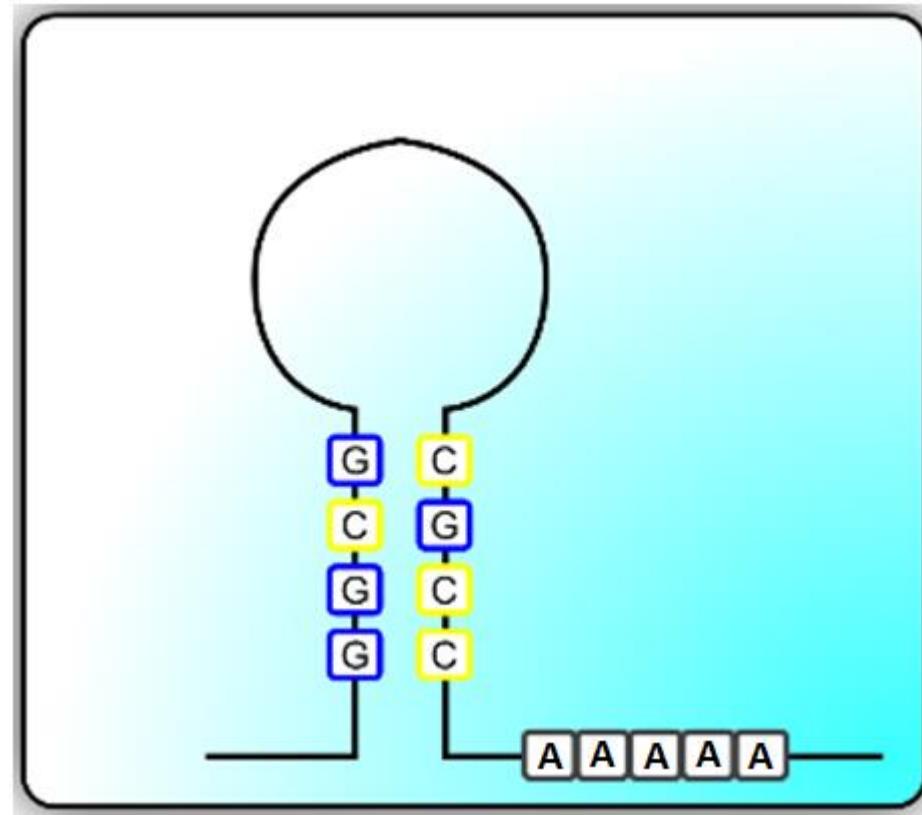
- Tudi na koncu mRNA nastane **spekularna sosledica nukleotidov**:

UCACAAUCAUUGUGA (RNA)

- **Komplementarni nukleotidi** v mRNA **se** medsebojno **povežejo** in tako nastane **zanka**, ki zaustavi delo RNA polimeraze in omogoči njeno ločitev od DNA.
- Na **vratu zanke** je več parov **CG**, ob zanki pa **rep poli(A)**.

Konec prepisovanja

1. način:



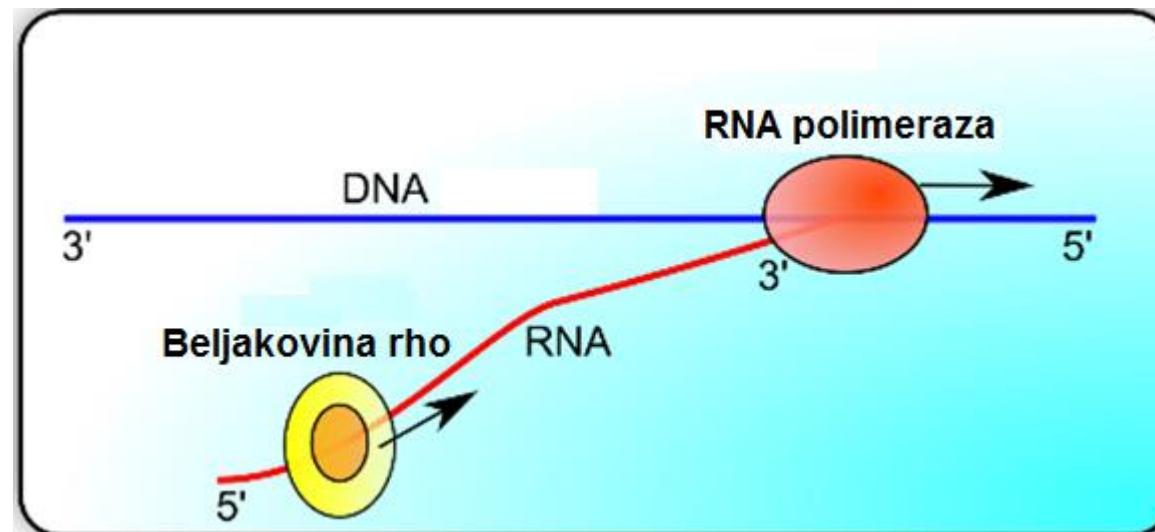
Zanka na koncu mRNA

- Rep poli(A) ni kodificiran na DNA, pač pa ga doda encim poli(A)-polimeraza.
- Rep poli(A) stabilizira mRNA in jo ščiti pred delovanjem eksonukleaz.

Konec prepisovanja

2. način:

- **Protein rho** se veže na specifičen odsek nastajajoče mRNA.
- Nato potuje v smeri 5'-3', dokler ne prispe do RNA polimeraze.
- Tam začne delovati kot **helikaza**, tako da **loči DNA od mRNA**.
- Pri tem se **sprosti** tudi **RNA polimeraza**.

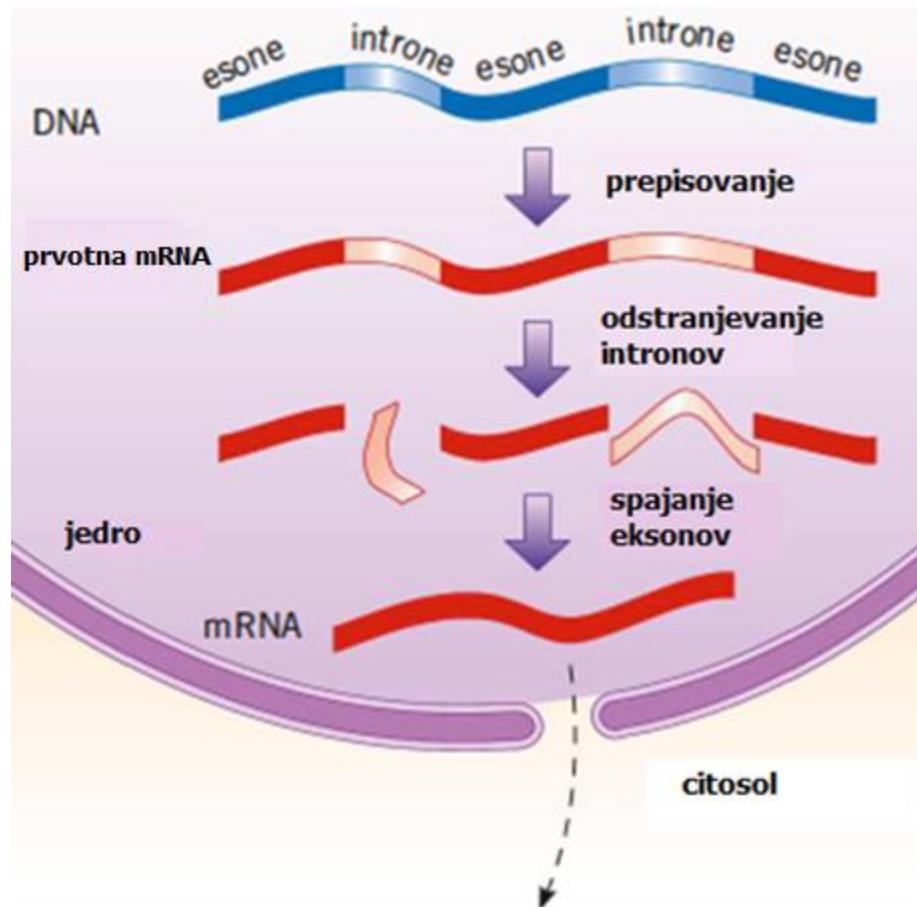


Konec prepisovanja je odvisen od beljakovine rho.

Nastanek končne mRNA iz prvočne mRNA

- Geni evkariontov imajo prekinjeno strukturo: sestojijo namreč iz **eksonov** in **intronov**.
- **Eksoni** so **kodirajoči** odseki.
- **Introni** so **nekodirajoči** odseki.
- mRNA, ki nastane med prepisovanjem, vsebuje bodisi **eksone**, kot **introne**.
- Tej mRNA pravimo **prvočna mRNA**.

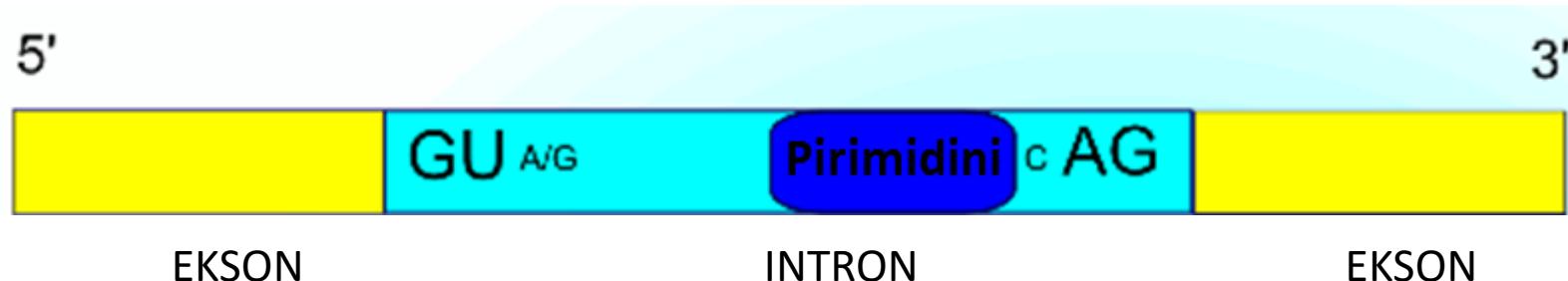
Nastanek končne mRNA iz prvočne mRNA



- Ko je prvočna mRNA še v jedru, nekateri **encimi** odstranijo **introne** in spojijo eksone v neprekinjeno molekulo mRNA.
- Procesu pravimo ***splicing***.
- Nastala molekula mRNA, ki vsebuje samo eksone, potuje v citosol, kjer se prevede v beljakovino.

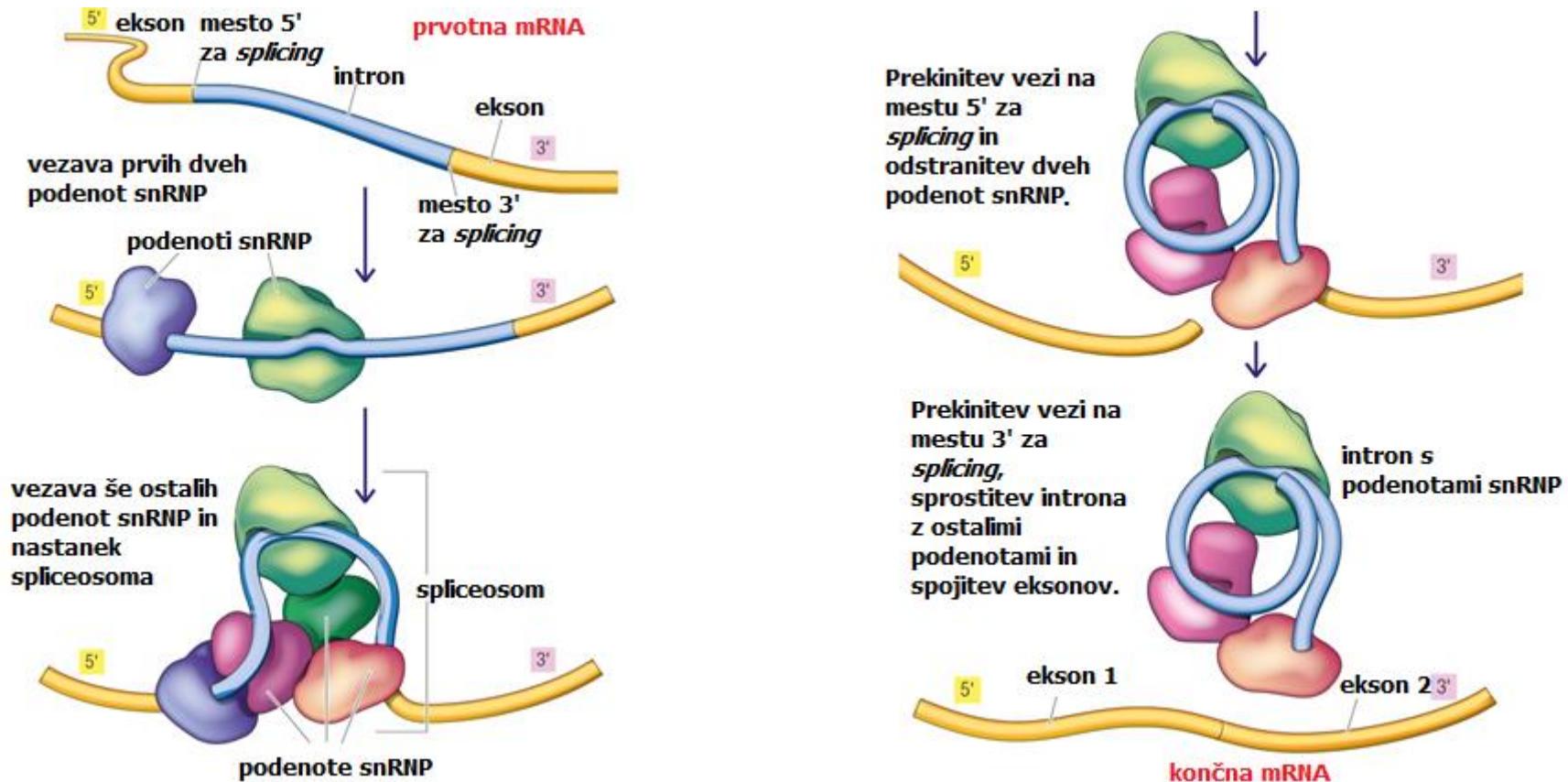
Nukleotidna struktura intronov

- Na koncех intronov sta skoraj vedno prisotni končni zaporedji **GU** in **AG**.
- V notranjosti introna, v razdalji približno 30 nukleotidov od konca **AG 3'**, se nahaja predel, ki je zelo bogat na **pirimidinih** (CU).
- $5' \text{ GU-----pirimidini}^{30 \text{ nt}} \text{ AG } 3'$



Velike črke predstavljajo nukleotide, ki **običajno sestavljajo intron**.
Male črke predstavljajo nukleotide, ki **pogostoma sestavljajo intron**.

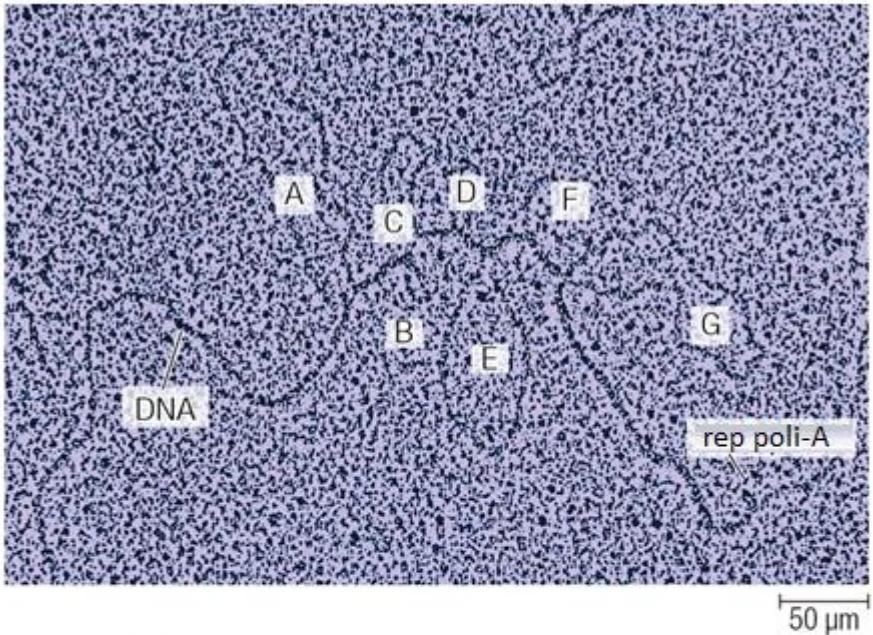
Splicing



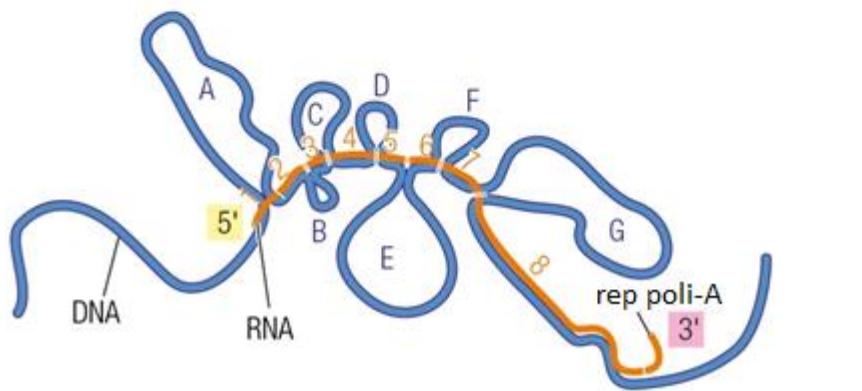
Splicing: izrezovanje intronov in spajanje eksonov .

Spliceosom: kompleks, ki ga gradijo podenote
small nuclear ribo-nucleo-protein (snRNP).

mRNA pred odstranitvijo intronov



- Zanke odgovarjajo intronom.



(Rep poli-A ščiti mRNA pred eksonukleazami).

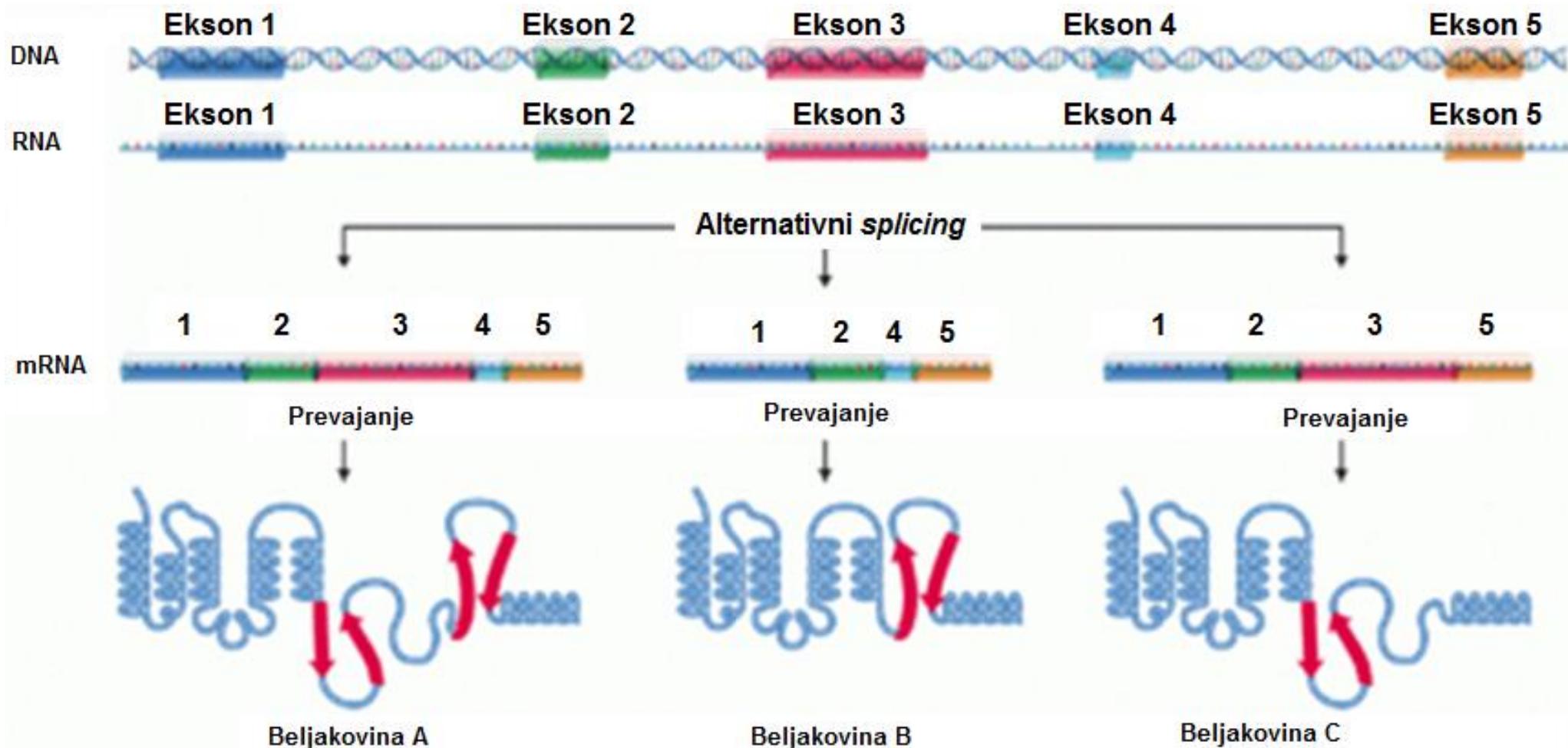
Pomen intronov

- Po mnenju znanstvenikov imajo tudi introni svoj pomen.
- Vsebujejo namreč **pomembne informacije** za pravilno **delovanje genov** in omogočajo **pravilen potek** prepisovanja **DNA→RNA**.

Različni načini izrezovanja intronov omogočajo nastanek različnih beljakovin

- V različnih tkivih se odvija različno izrezovanje intronov (*alternativni splicing*):
→ iz enega gena lahko nastanejo različni končni mRNA in torej različni proteini.
- Znanstveniki ocenjujejo, da lahko poteka *alternativni splicing* pri več kot polovici človeških genov.
- *Alternativni splicing* močno povečuje število različnih beljakovin, ki jih lahko izdelajo človeške celice.
- **Primer:** z *alternativnim splicingom* lahko človeško telo sintetizira 10^{15} različnih protiteles.

Alternativni *splicing*



Genski kod

- **Genski kod** je **skupek pravil**, po katerih se **informacije**, ki so zapisane v genetskem materialu **prevajajo v zaporedje aminokislin**, ki gradijo beljakovine.
- Genski kod **sestoji** iz **64** tričrkovnih **besed**: to so **vse kombinacije**, ki jih lahko sestavimo s **4 črkami A, U, C in G**.
- Vsaka **črka** odgovarja eni **dušikovi bazi**.
- Vsaka **beseda**, ki ji pravimo **trojček** ali **kodon**, se prevede v eno **aminokislino**.
- Več **kodonov** tvori „**stavek**“, ki se prevede v **beljakovino**.

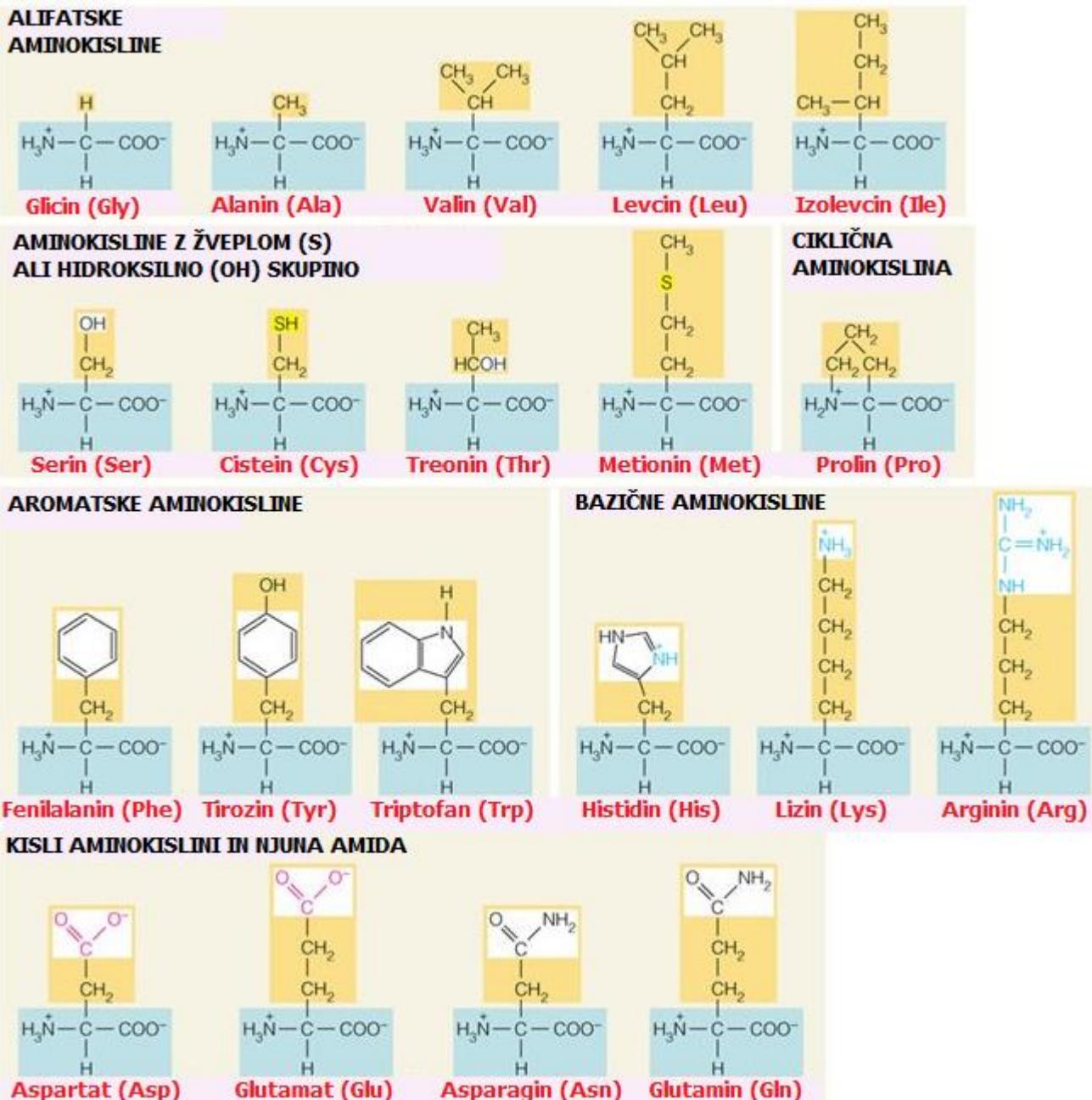
Genski kod

- **Genski kod je skupen vsem živim bitjem:** v vseh vrstah odgovarja določenemu kodonu ista aminokislina.

	prvo mesto							
	U	C	A	G				
U	UUU UUC UUA UUG	fenilalanin Phe Lev Leu	UCU UCC UCA UCG	UAU UAC UAA UAG	tirozin Tyr STOP STOP	UGU UGC UGA UGG	cistein Cys STOP tryptofan Trp	U C A G
	CUU CUC CUA CUG	levcin Lev	CCU CCC CCA CCG	CAU CAC CAA CAG	histidin His	CGU CGC CGA CGG	arginin Arg	U C A G
	AUU AUC AUA AUG	izolevcin Ile	ACU ACC ACA ACG	AAU AAC AAA AAG	asparagin ASN	AGU AGC AGA AGG	serin Ser	U C A G
	GUU GUC GUA GUG	valin Val	GCU GCC GCA GCG	GAU GAC GAA GAG	aspartat Asp	GGU GGC GGA GGG	glicin Gly	U C A G

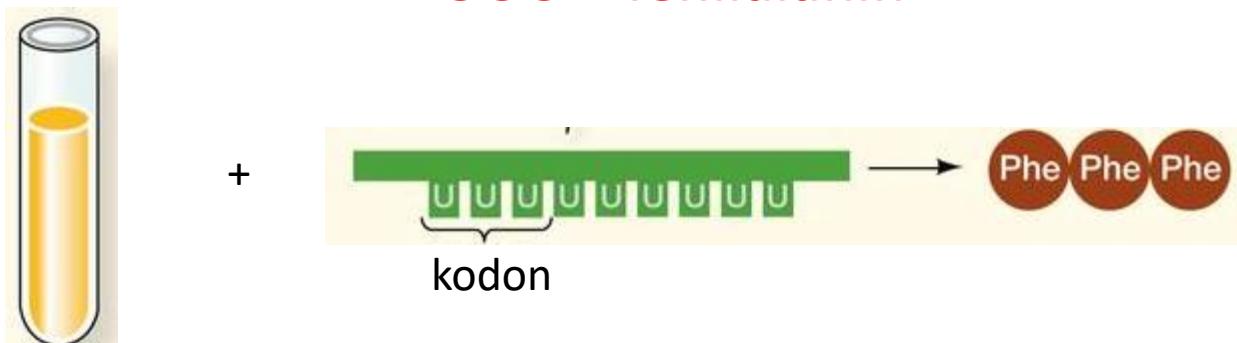
- Kodonov je mnogo več (64) kot aminokislin (20).
- Različni kodoni lahko določajo isto aminokislino, zato pravimo, da je genski kod **degeneriran**.
- Kljub temu je genski kod **nedvoumen**, saj **vsak kodon določa samo eno aminokislino**.

Aminokisline



Dešifriranje genskega koda

- **Prvi kodon** sta leta 1961 dešifrirala ameriška biokemika **Marshall Nirenberg in Heinrich Matthaei**.
- **Sintetizirala** sta kratko molekulo **m-RNA**, ki je vsebovala samo kodone UUU (**poli-U**).
- V **epruveto** s **poli-U** sta nato dodala **vse sestavine potrebne** za to, da se molekula mRNA prevede v **verigo aminokislin**.
- Ko sta nastalo **verigo aminokislin** analizirala, sta ugotovila, da vsebuje **samo** zaporedno vezane **fenilalanine**.
- Tako je bila odkrita **prva beseda** v slovarju genetskega koda:
UUU = fenilalanin



Epruveta z ribosomi, t-RNA,
aminokislinami, encimi, ...

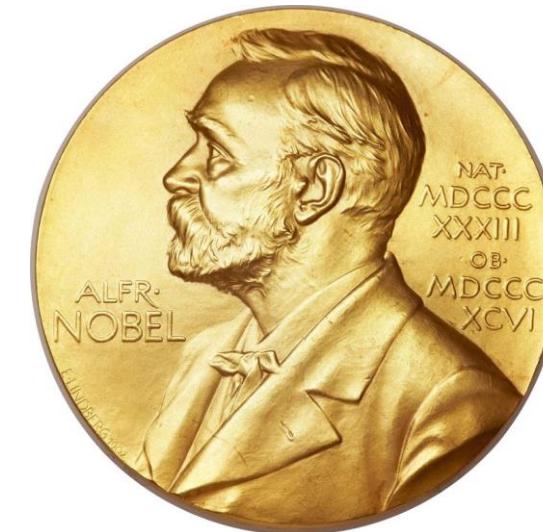
m-RNA poli-U

veriga aminokislin

Dešifriranje genskega koda



Marshall Nirenberg (desno) in Heinrich Matthaei (levo)



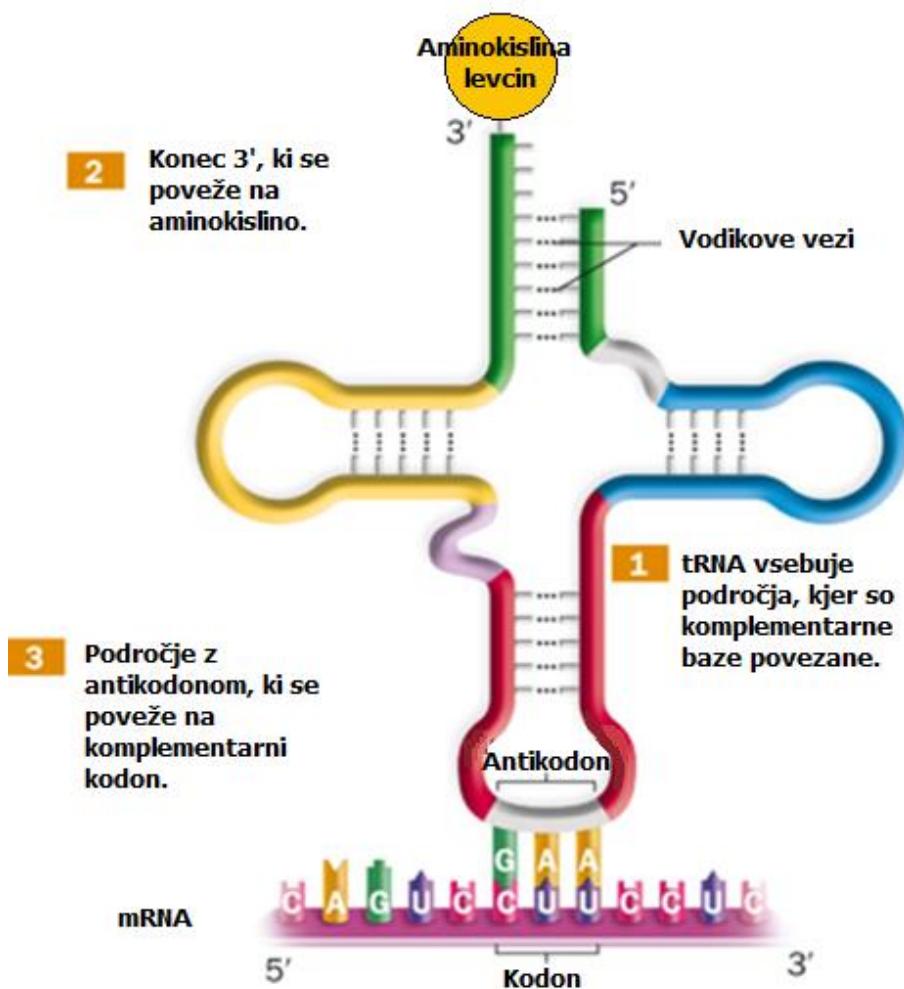
Nobelova nagrada 1968

Prevajanje genetske informacije ali translacija

- Med prevajanjem se **informacija** prenese z **mRNA** v **beljakovino**.
- Pri prevajanju sodeluje še **prenašalna RNA (tRNA)** (angl. *transfer*).
- Prevajanje se odvija v **ribosomih**, ki so sestavljeni iz **beljakovin** (1/3) in iz ribosomske RNA (**r-RNA**) (angl. *ribosomal*) (2/3).
- Tudi t-RNA in r-RNA nastaneta v jedru na modelu DNA v procesu prepisovanja.

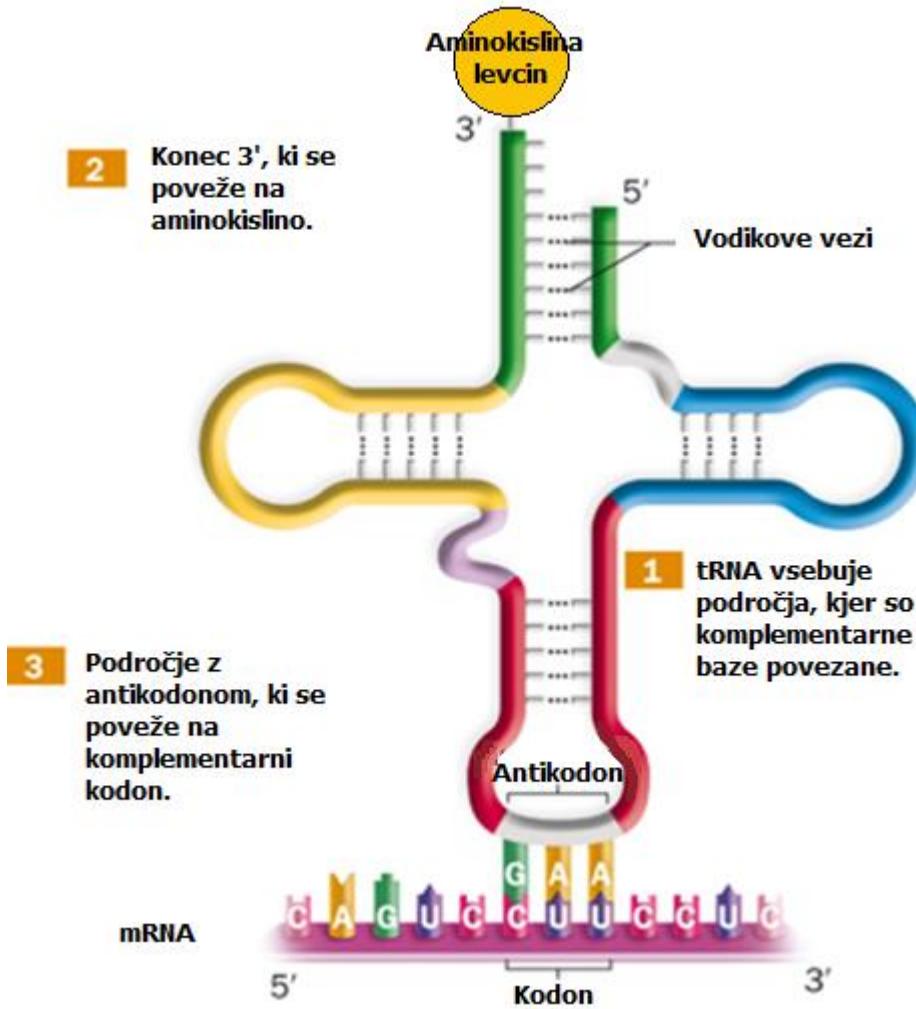
Prenašalna RNA - tRNA

- tRNA je enoverižna molekula RNA, dolga okrog 80 nukleotidov.



- Nekateri odseki (CT) so komplementarni drugim, zato nastanejo v vodni raztopini **vodikove vezi**, ki dajo molekuli t-RNA **posebno obliko**.
- Na enem koncu je trojček nukleotidov, ki mu pravimo **antikodon**, na drugi konec se poveže **aminokislina**.

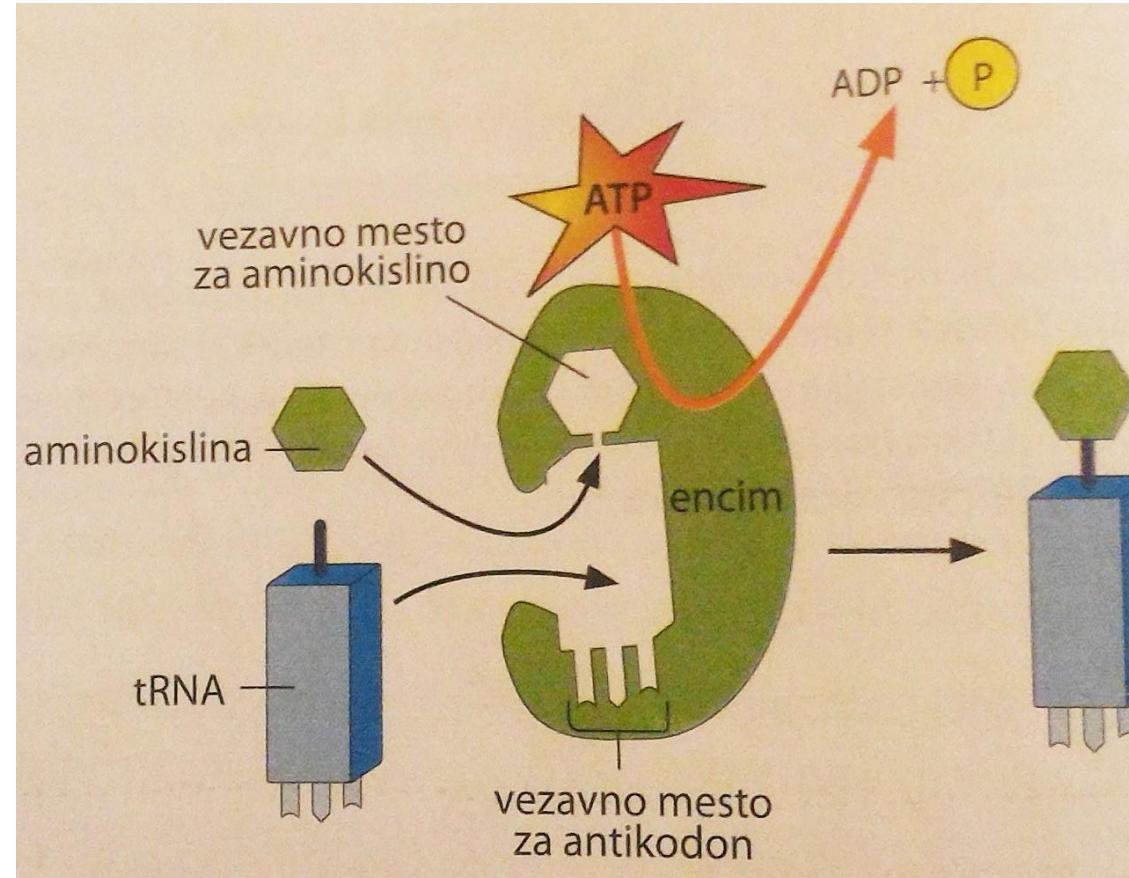
Prenašalna RNA - tRNA



- Poznamo **20 različnih t-RNA**, eno za vsako aminokislino.
- t-RNA prenaša aminokisline iz citosola v ribosome.
- Tu se **antikodon t-RNA** poveže na **komplementarni kodon m-RNA**.
- V ribosomih se posamezne aminokisline med sabo povežejo v takem zaporedju, kot narekuje genski kod na m-RNA.

Nastanek kompleksa t-RNA - aminokislina

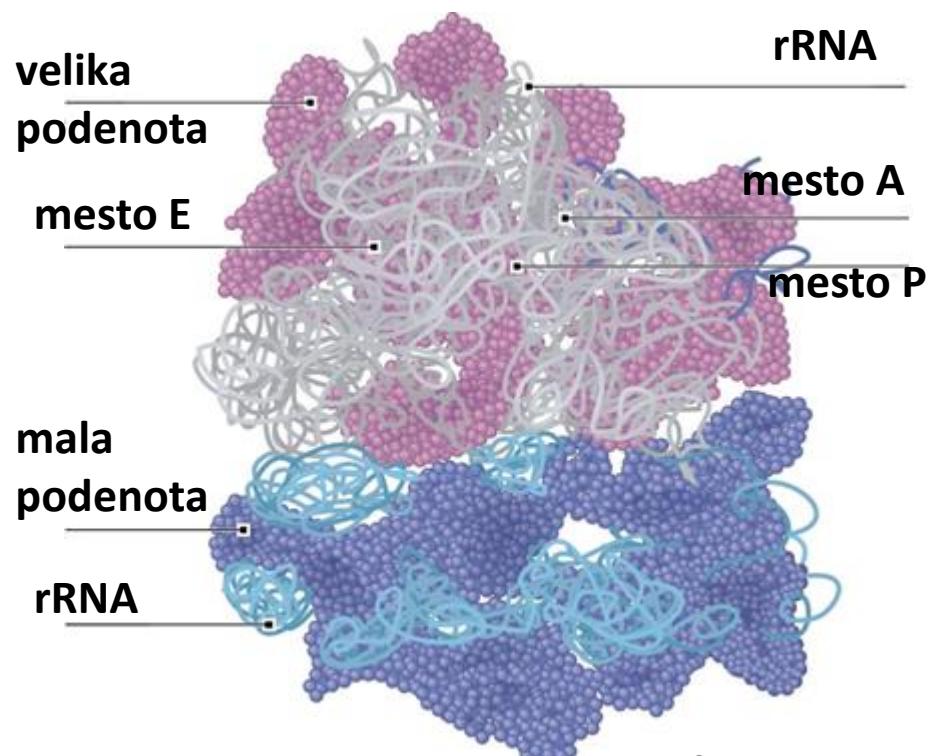
- Vezava aminokisline na tRNA poteka z encimom **aminoacil-tRNA-sintetaza**.
- Tudi sintetaz je **20 različnih vrst**.



Vezava aminokisline na t-RNA

Ribosom

- Ribosom je majhna kroglasta struktura (20 nm), zgrajena iz **male** in **velike podenote**.
 - Velika podenota sestoji iz 34 beljakovin in 2 molekul ribosomske r-RNA.
 - Mala podenota sestoji iz 21 beljakovin in 1 molekula ribosomske r-RNA.

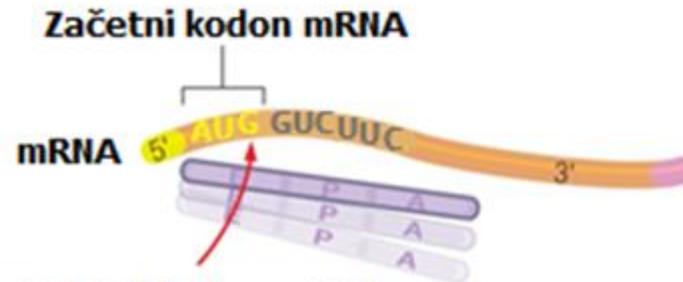


- Na **mali podenoti** je **vezavno mesto** za **m-RNA**.
- Na **veliki podenoti** so **tri vezavna mesta** za **t-RNA**:
 - **mesto A (aminokislina)**
 - **mesto P (peptid)**
 - **mesto E (exit)**.

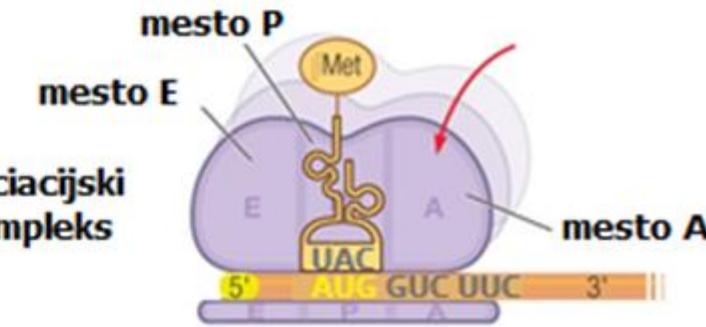
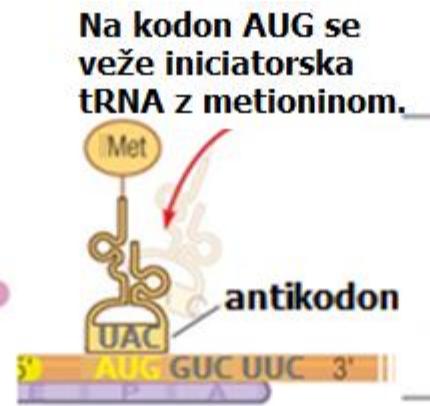
Beljakovinska sinteza

- Prevajanju genetske informacije pravimo tudi **beljakovinska sinteza**.
- Beljakovinska sinteza se odvija **na ribosomih v citoplazmi**.
- Odvija se v treh fazah:
 - **začetek prevajanja**,
 - **podaljševanje verige aminokislin**,
 - **konec prevajanja**.

Začetek prevajanja

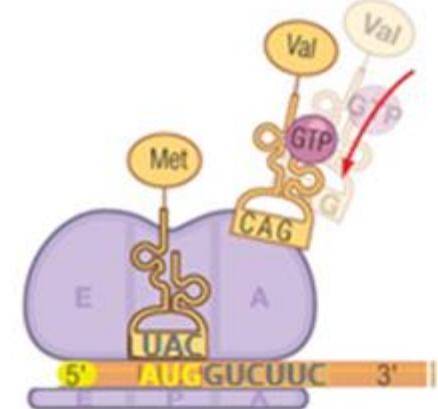


Začetni kodon mRNA
se veže na mesto P
male ribosomske
podenote.

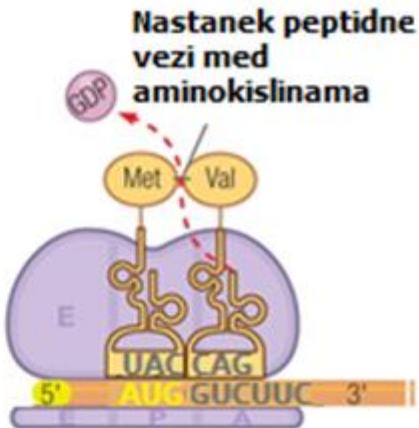


Velika ribosomska podenota se pritrdi na iniciacijski kompleks.
Začetna tRNA zaseda mesto P.

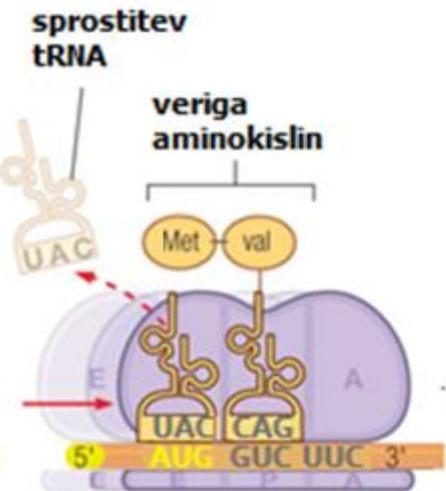
Podaljševanje verige aminokislin



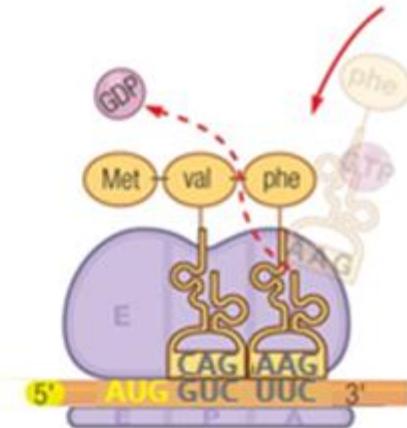
Na prosto mesto A prihaja druga tRNA s svojo aminokislino.



Energijo za nastanek peptidne vezi posreduje gvanozin trifosfat (GTP).

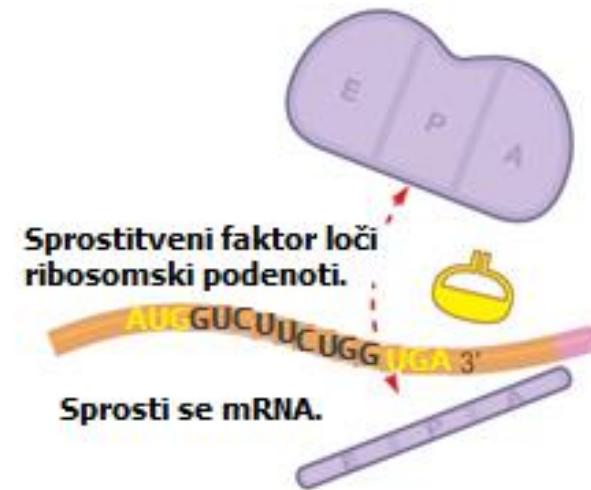
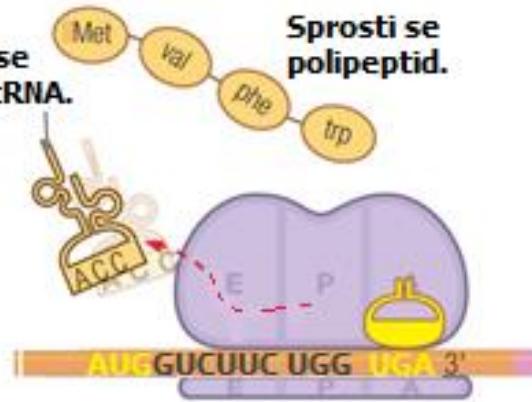
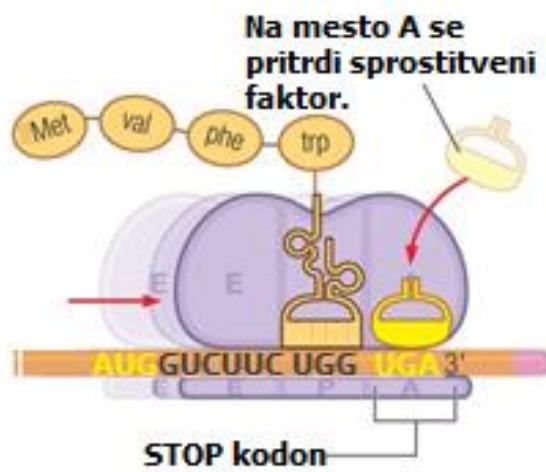


Metionin se loči od tRNA. Ribosom se pomakne za tri nukleotide v smeri 5'- 3'. Prva tRNA se znajde na mestu E (exit), iz katerega se kmalu sprosti, druga pa se znajde na mestu P. Mesto A ostane prosto.



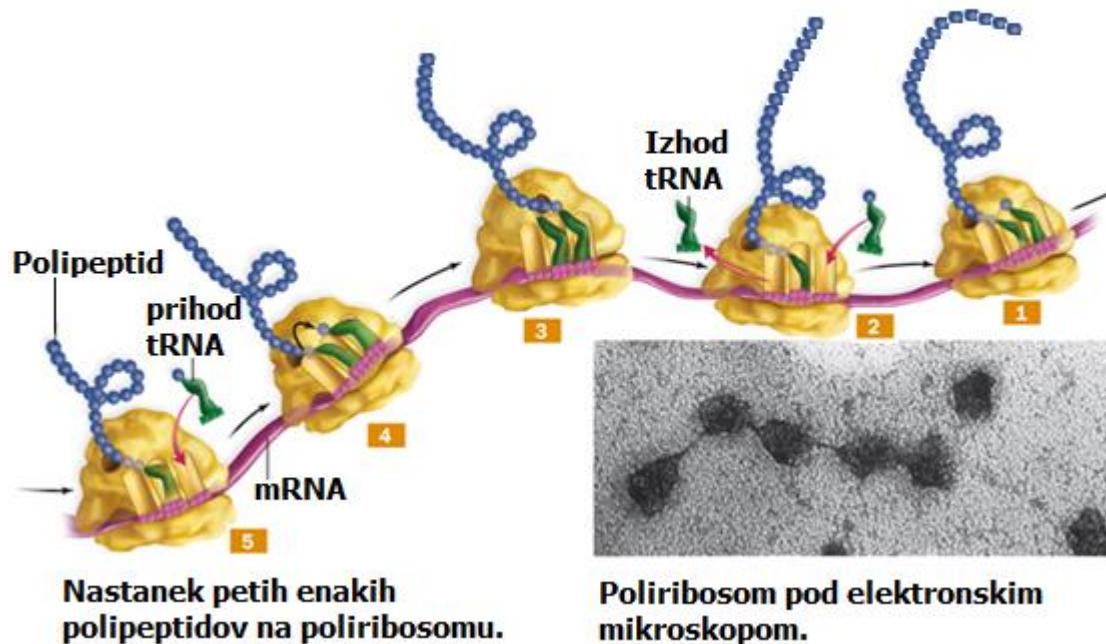
Nova tRNA zasede mesto A.

Konec prevajanja

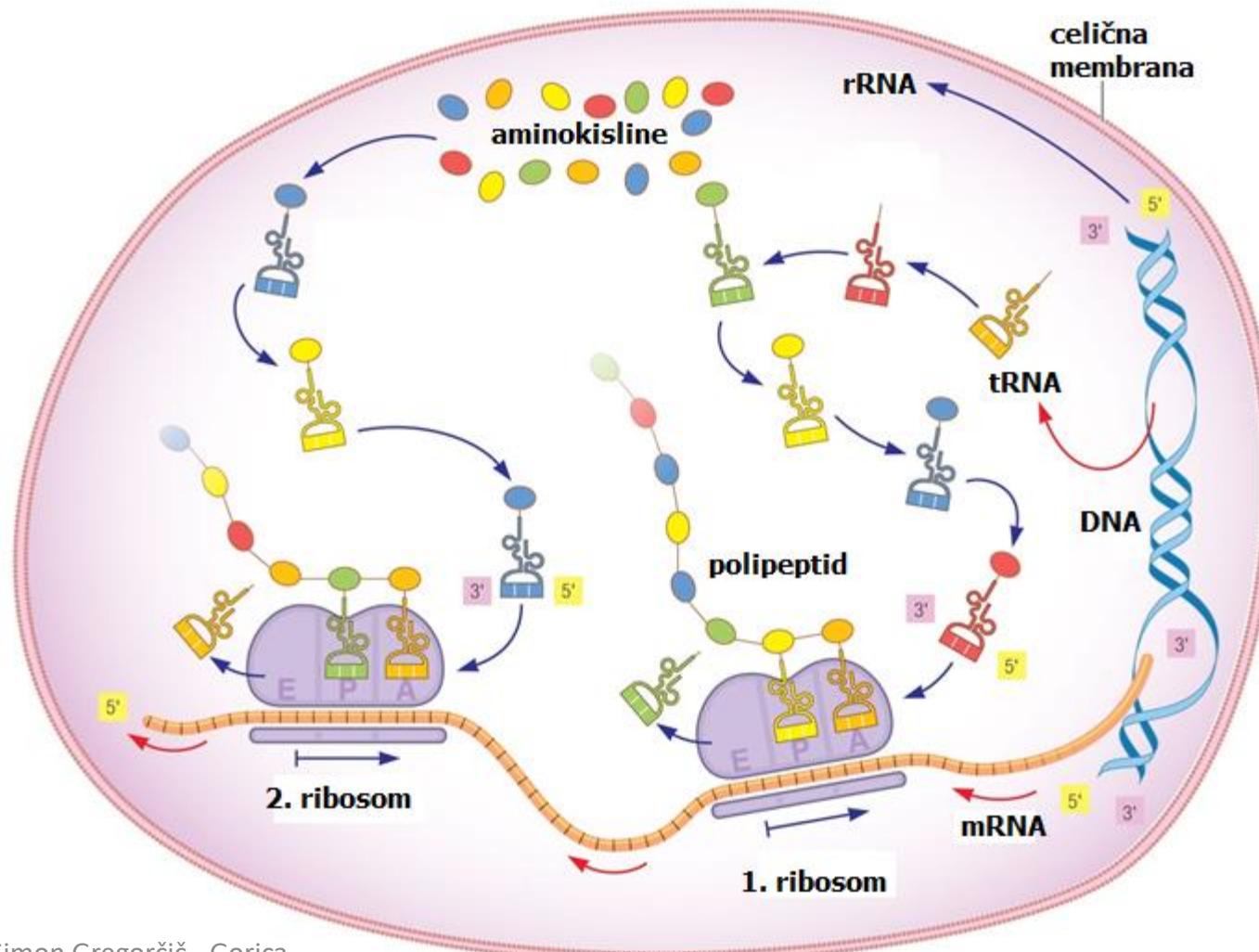


Bakterije imajo poliribosome

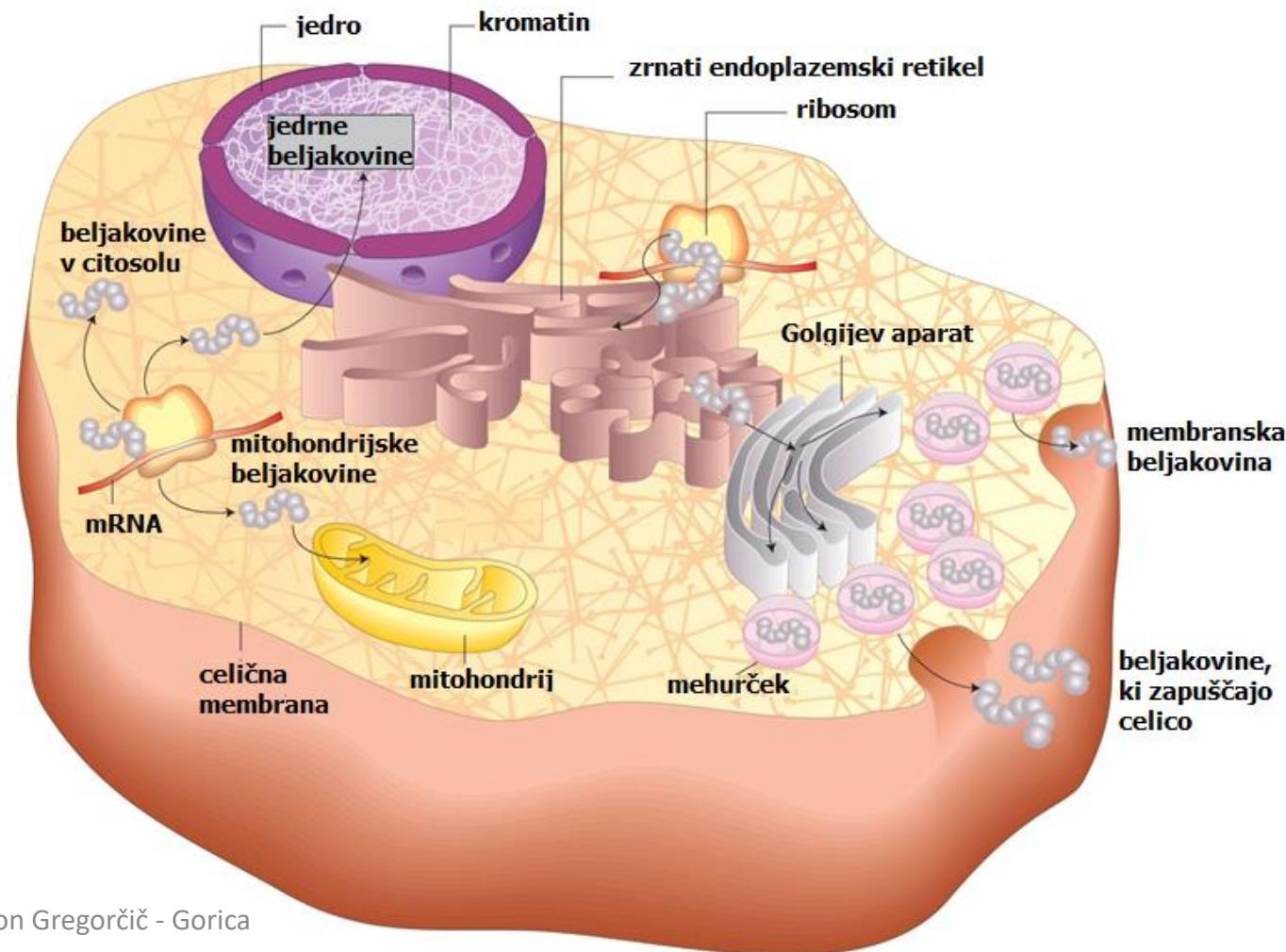
- V bakterijah se **na isto m-RNA** lahko priključi **več ribosomov**, ki tvorijo t.i. **poliribosom**.
- Posamezni ribosomi se premikajo po m-RNA od začetnega do končnega kodona v smeri $5' \rightarrow 3'$.
- Poliribosom lahko v kratkem času sintetizira **veliko število polipeptidov** na modelu ene same m-RNA.



Beljakovinska sinteza v prokariontski celici



Beljakovinska sinteza v evkariontski celici



Gensko inženirstvo: TEHNOLOGIJA REKOMBINANTNE DNA

Tehnologija rekombinantne DNA

- **Gensko inženirstvo** je tehnologija, ki omogoča **sestavljanje umetnih molekul DNA**.
- **Rekombinantna DNA** je **v laboratoriju pripravljena DNA**, ki združuje genetski material iz različnih virov (organizmov).
- **Molekulsко kloniranje** je pridobivanje veliko kopij rekombinantne DNA.
 - Običajno pride do molekulskega kloniranja **znotraj plazmidov**, ki se **samostojno podvojujejo**.
- Če v gostiteljsko celico vstavimo zapis za protein, ki je pod kontrolo promotorja, bo v gostiteljski celici nastal **rekombinantni protein**.

Tehnologija rekombinantne DNA

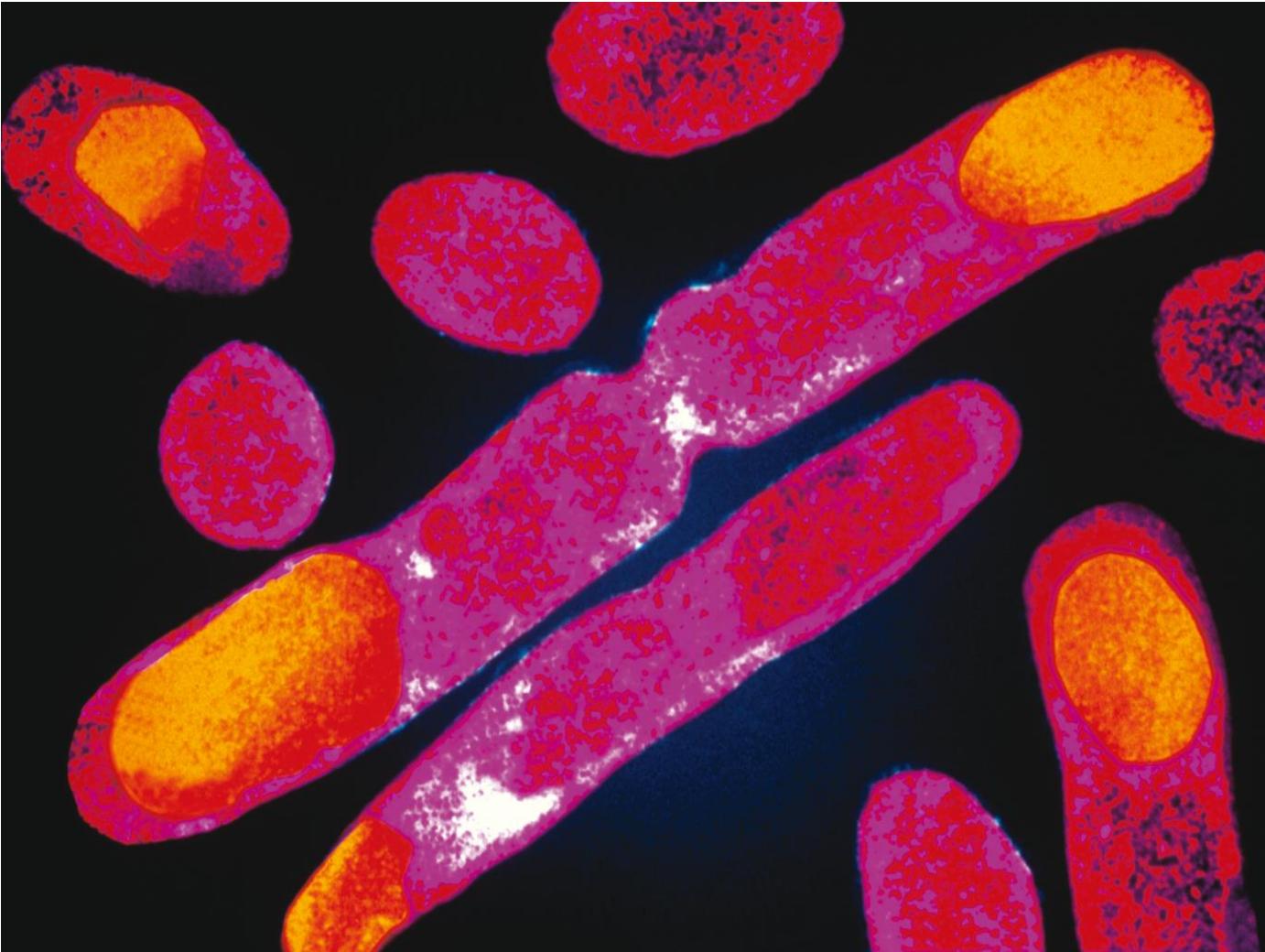
- **Gensko spremenjeni organizmi (GSO)** ali **transgeni organizmi** so organizmi, ki **vsebujejo tuje gene**, ki so bili v njihov genom vstavljeni z metodami genskega inženirstva.
- **Tehnologija rekombinantne DNA** prinaša mnoge možnosti za izboljševanje lastnosti organizmov, hkrati pa prinaša nova tveganja in etične probleme.

Primeri proizvodov, pridobljenih z genskim inženiringom

Proizvod	Gensko spremenjeni organizem, ki proizvod izdeluje	Uporaba
Človeški insulin	bakterija	zdravljenje sladkorne bolezni
Človeški rastni hormon	bakterija	zdravljenje motenj rasti
Goveji rastni hormon	bakterija	pospeševanje rasti goveda
Celulaza iz bakterij ali gliv	bakterija	razgradnja celuloze za krmila ali pridobivanje bioetanola
Taksol (strup iz drevesa tise)	bakterija	zdravljenje raka
Cepivo proti hepatitisu B	kvasovka	preprečevanje okužbe z virusom
Eritropoetin (EPO)	celice sesalcev	zdravljenje anemije (slabokrvnosti)
Faktor VIII	celice sesalcev	zdravljenje hemofilije
Tkvni aktivator plazminogena (TPA)	celice sesalcev	zdravljenje srčnih napadov ⁴

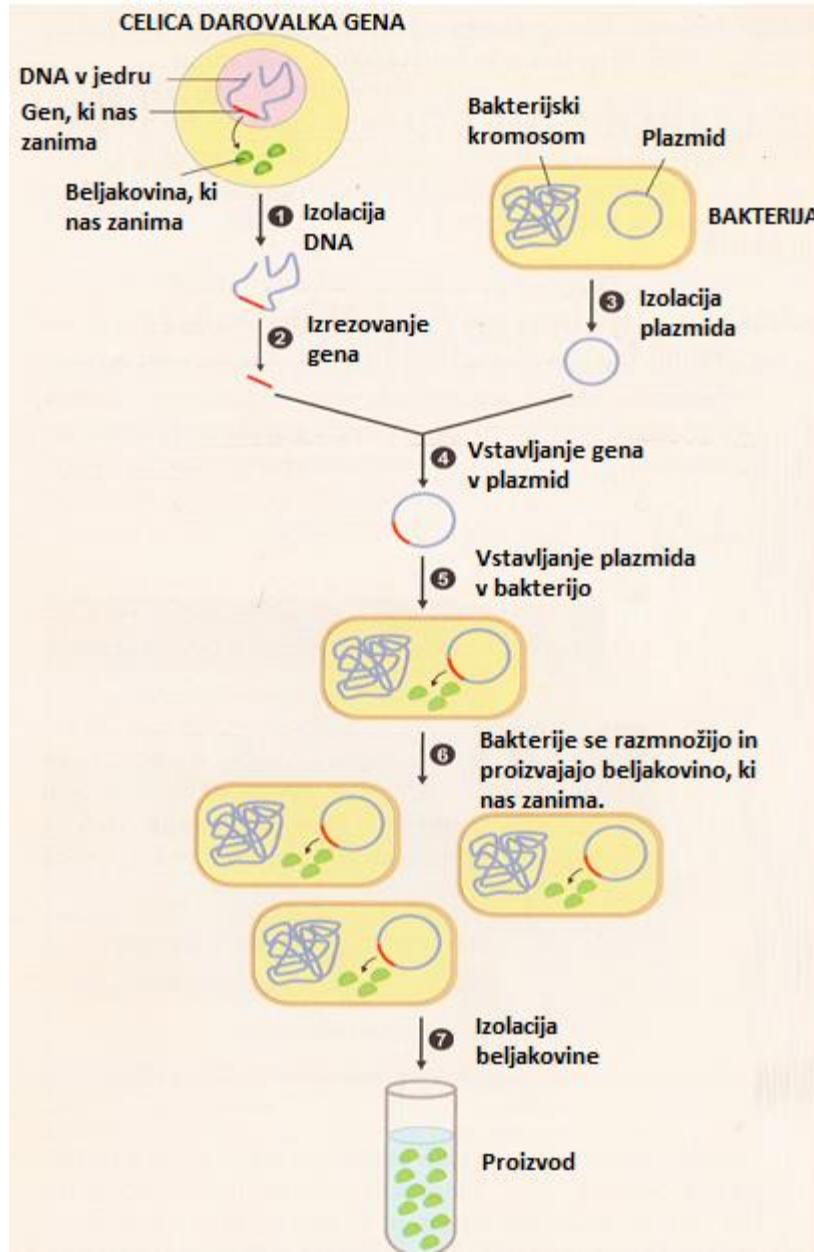
Bakterije, ki izdelujejo človeški insulin

- Leta **1973** so znanstveniki ustvarili **prvi gensko spremenjeni organizem** (bakterijo).
- Leta **1982** so **začeli uporabljati** beljakovinski hormon **insulin**, ki so ga izdelali z uporabo gensko spremenjenih organizmov.
 - Insulin povzroča privzem glukoze iz krvi v jetrne in mišične celice, kjer se glukoza uskladišči v obliki glikogena.
 - Insulin si kot zdravilo vbrizgavajo sladkorni bolniki, katerih telo izdela premalo ali nič insulina.
 - Pred razvojem metod genskega inženirstva so insulin pridobivali iz trebušnih slinavk živali, predvsem goveda, prašičev in konj.
- **Danes v svetovnem merilu izdelajo približno 70% insulina** z uporabo **gensko spremenjenih bakterij** z vstavljenim genom za človeški insulin.



Proizvodnja insulina (oranžna barva) v bakteriji *E. Coli*.

Princip vnosa tujega gena v bakterijsko celico



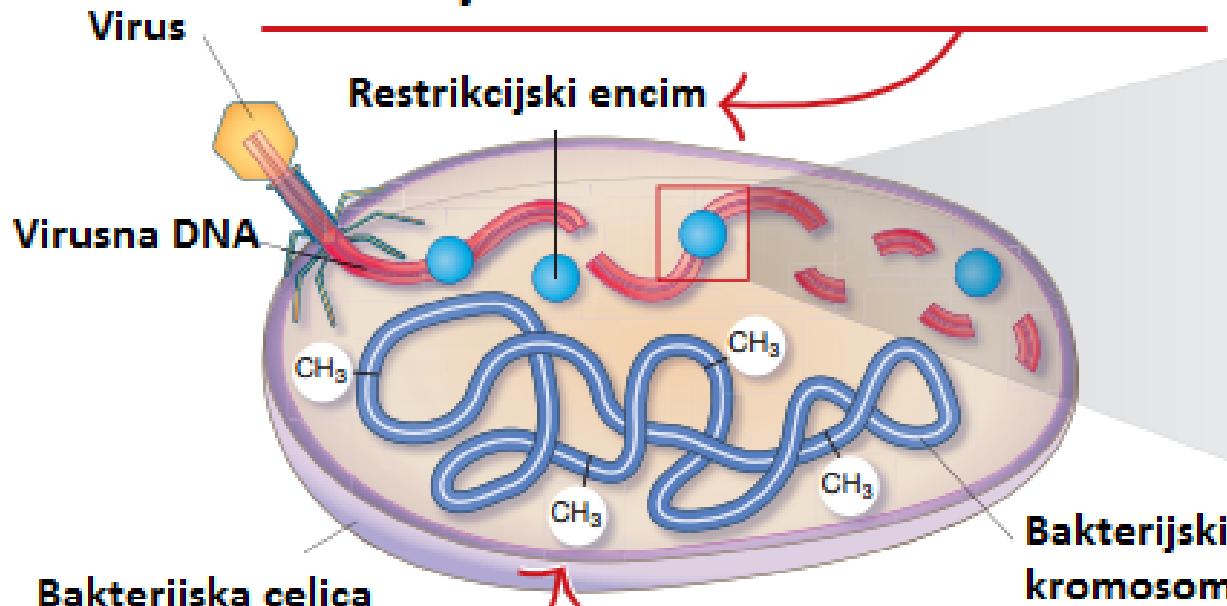
- Iz evkariontskih celic izoliramo molekule DNA, iz katerih izrežemo gen, ki nas zanima.
- Iz bakterije izoliramo plazmid (vektor) in vanj vstavimo tuj gen.
- Nato plazmide z vstavljenim genom vnesemo v bakterijske celice.
- Bakterije se začnejo v gojišču razmnoževati in proizvajati tudi tujo beljakovino, ki je zapisana v tujem genu.
- Ko se bakterije dovolj namnožijo in proizvedejo dovolj tujje beljakovine, iz njih to beljakovino izoliramo.

Postopek izrezovanja in vstavljanja genov v vektorje

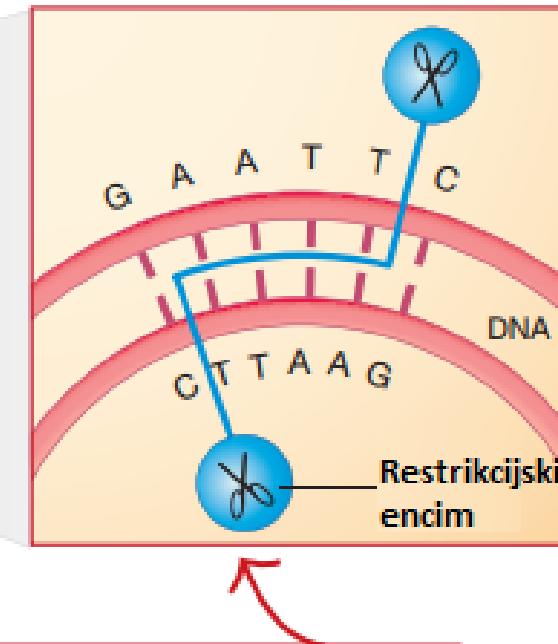
- Za rezanje molekul DNA na specifičnih mestih uporabljajo znanstveniki **restrikcijske encime**.
 - Restrikcijski encimi so naravne molekule, ki jih celice uporabljajo za obrambo pred virusi (restrikcijski encimi namreč razrežejo tujo DNA).
 - Različne vrste bakterij izdelujejo različne restrikcijske encime.
- Danes poznamo na stotine različnih restrikcijskih encimov.
- Vsak **restrikcijski encim** „**prepozna**“ določeno kratko zaporedje **nukleotidov** v molekuli DNA, običajno **dolgo od 4 do 8 nukleotidnih parov**.

Palindromna zaporedja

Velika večina restriktijskih encimov prepozna **palindromna zaporedja**, t.j. zaporedja, ki se lahko berejo v obeh smereh.

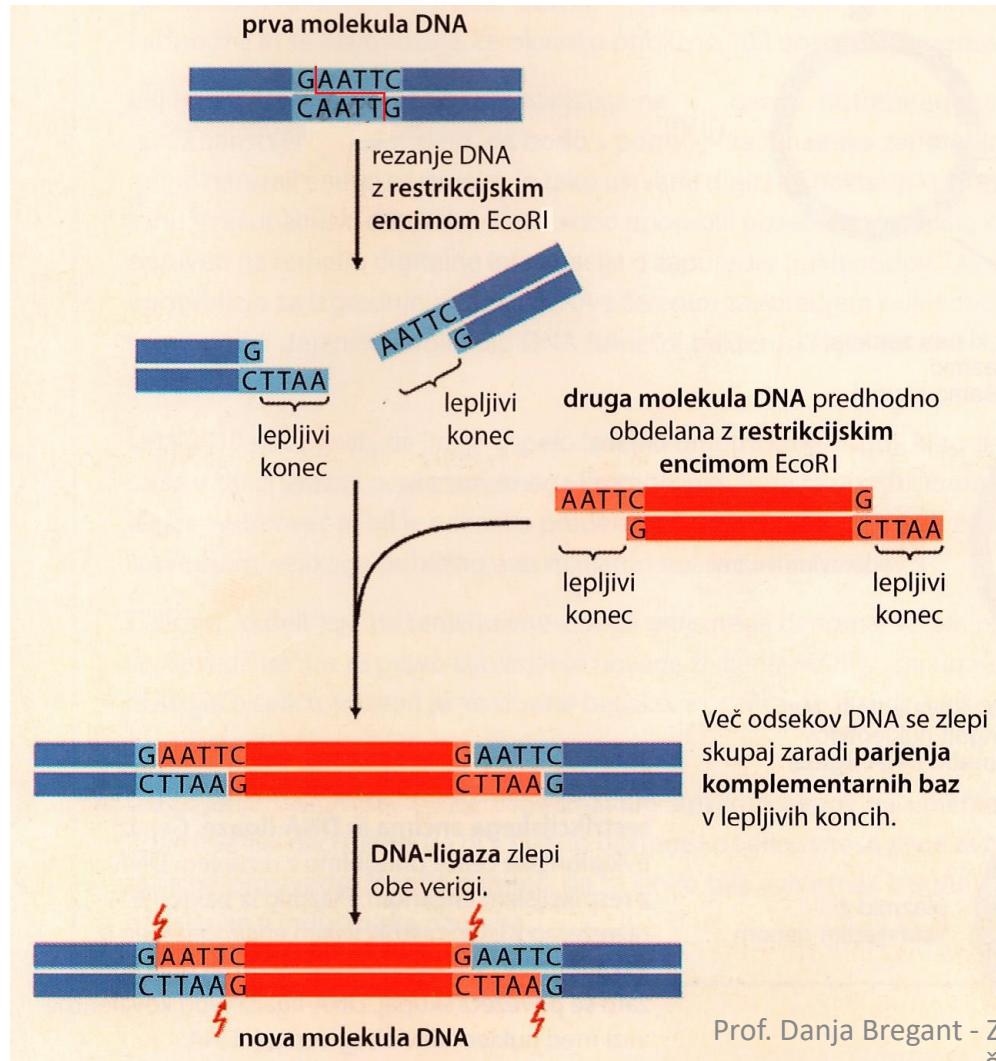


Bakterija zaščiti svoja **palindromna zaporedja** z **metilacijo DNA** (dodatkom metilnih skupin $-\text{CH}_3$).



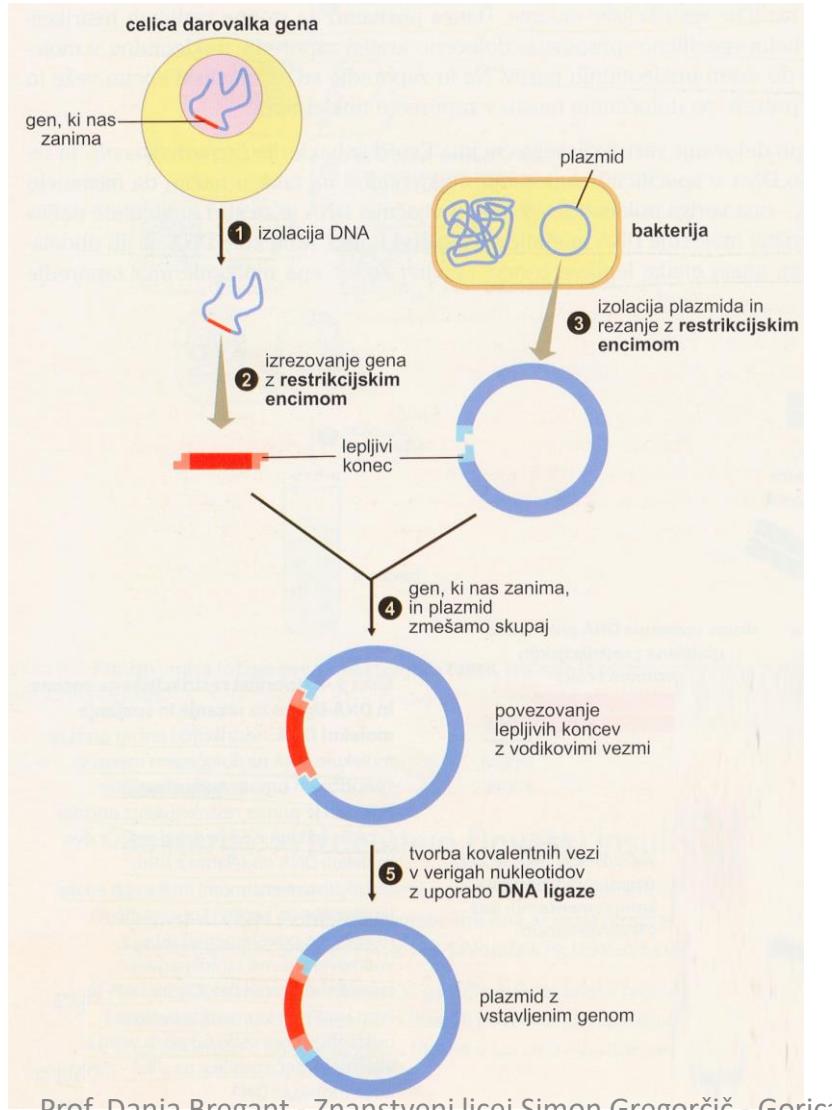
Restriktijski encim Eco RI ima **palindromno tarčno zaporedje GAATT** (ki se na komplementarni verigi bere v nasprotni smeri).

Delovanje restriktijskega encima *Eco RI* iz bakterije *Escherichia coli*.



- Restriktijski encim razreže molekulo DNA tako, da nastaneta stopničasta konca, ki jima pravimo **lepljiva konca**.
- Če **dve molekuli DNA** obdelamo z istim restriktijskim encimom, **imata** obe enaka **lepljiva konca**.
- **Lepljiva konca** različnih molekul **se povežeta** med seboj z vodikovimi vezmi zaradi parjenja **komplementarnih baz**.
- **DNA ligaza** zlepi obe verigi (**rdeče puščice** na sliki).

Vstavljanje gena v plazmid z uporabo restriktijskega encima in DNA-ligaze



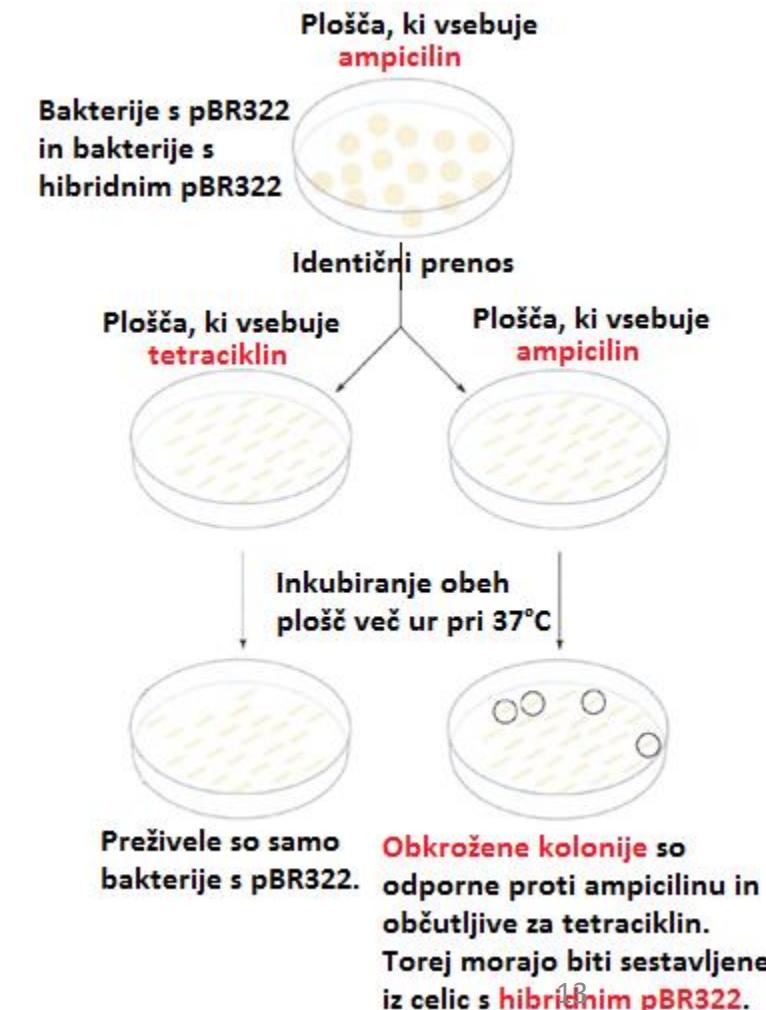
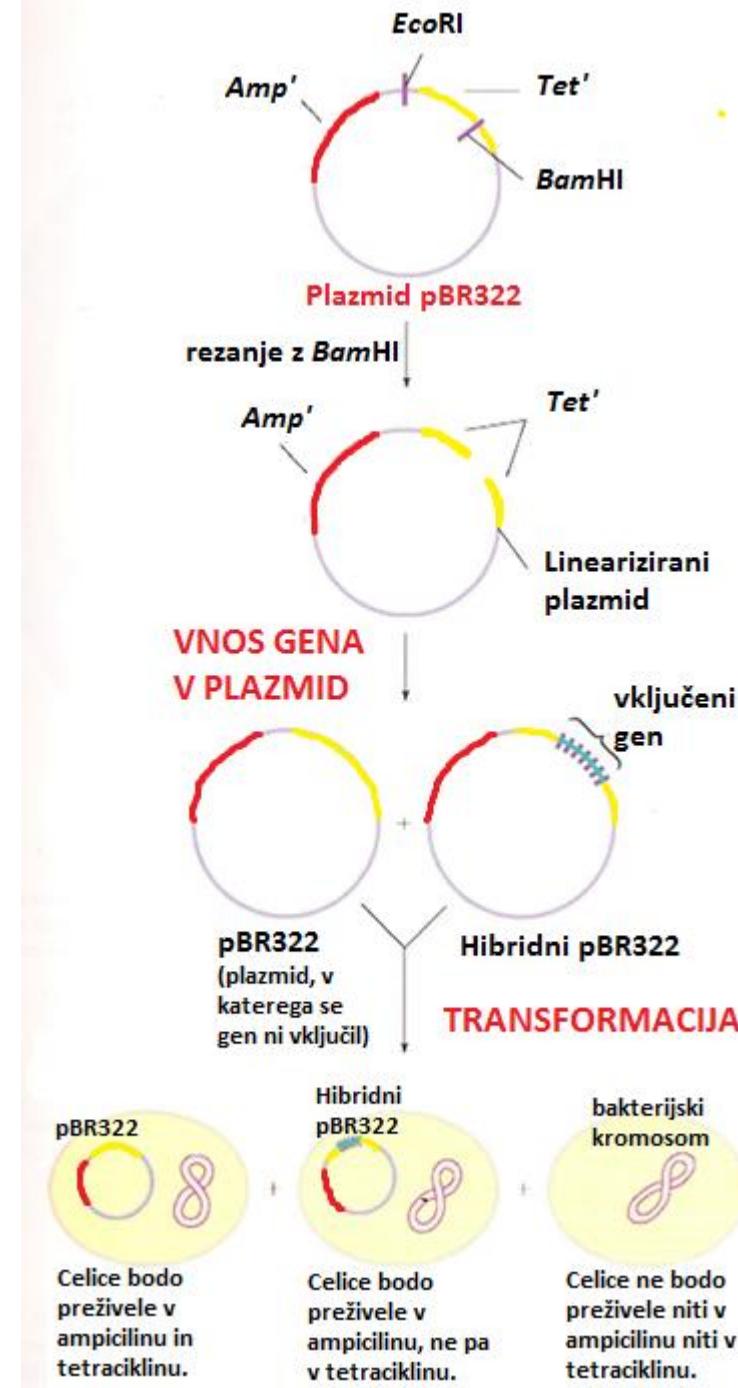
- Iz celice darovalke gena **izoliramo DNA**.
- Izberemo tak **restriktijski encim**, ki iz DNA izreže celoten gen.
- S pomočjo restriktijskega encima **izrežemo želeni gen**.
- Z istim restriktijskim encimom **prerezemo plazmid**.
- Izrezani **gen** in prerezani **plazmid** prenesemo **v isto epruveto**.
- **Lepljivi konci se povežejo z vodikovimi vezmi**.
- V epruveto **dodamo DNA-ligazo**, ki tvori kovalentne vezi med sosednjimi nukleotidi.
- Uspešno se vključi le nekaj genov.

Vključitev plazmida v bakterijo (transformacija)

- Bakterije in plazmide damo **v isto epruveto**, kjer bo potekala **transformacija** (=vnos tuje DNA v kompetentne bakterijske celice).
- Bakterijo je treba ustrezeno obdelati, **da postane sposobna za transformacijo (kompetentna)**.
- V ta namen **izvedemo elektroporacijo**: epruveto s suspenzijo celic in plazmidov izpostavimo **električnemu polju** ustrezne jakosti in trajanja, ki povzroči **nastanek por v bakterijski membrani**, skozi katere lahko vstopi plazmid.
- Dodamo še **CaCl₂**, ki pospešuje vstop plazmida v bakterijo.
- **Uspešno se vključi le nekaj plazmidov**.
- Po transformaciji vstavimo **bakterije v gojišče**, kjer se bodo razmnoževale in **proizvajale želeno beljakovino**.

Testiranje učinkovitosti transformacije

- Za vnos gena v bakterijo uporabimo **plazmid pBR322**, ki vsebuje gena za odpornost proti **ampicilinu** in **tetraciklinu**.
- Uporabimo restriktijski encim **BamHI**, ki **prereže** plazmid **znotraj gena za odpornost na tetraciklin**.
- Vklučimo gen** v plazmid.
- Izvedemo **transformacijo**.
- Bakterije s **pBR322** bodo rasle v obeh gojiščih.
- Bakterije s **hibridnim pBR322** bodo preživele v gojišču z ampicilinom, ne pa v gojišču s tetraciklinom.
- Bakterije, ki **niso transformirale**, ne bodo preživele ne v ampicilinu, ne v tetraciklinu.



Priprava rekombinantne DNA (povzetek)

1. Priprava gena za prenos:

- izrezovanje z restriktičnim encimom
- ali prepis mRNA z reverzno transkriptazo
- ali sinteza iz nukleotidov.

2. Izbor in izolacija plazmida (ali drugega vektorja) za prenos v bakterijo.

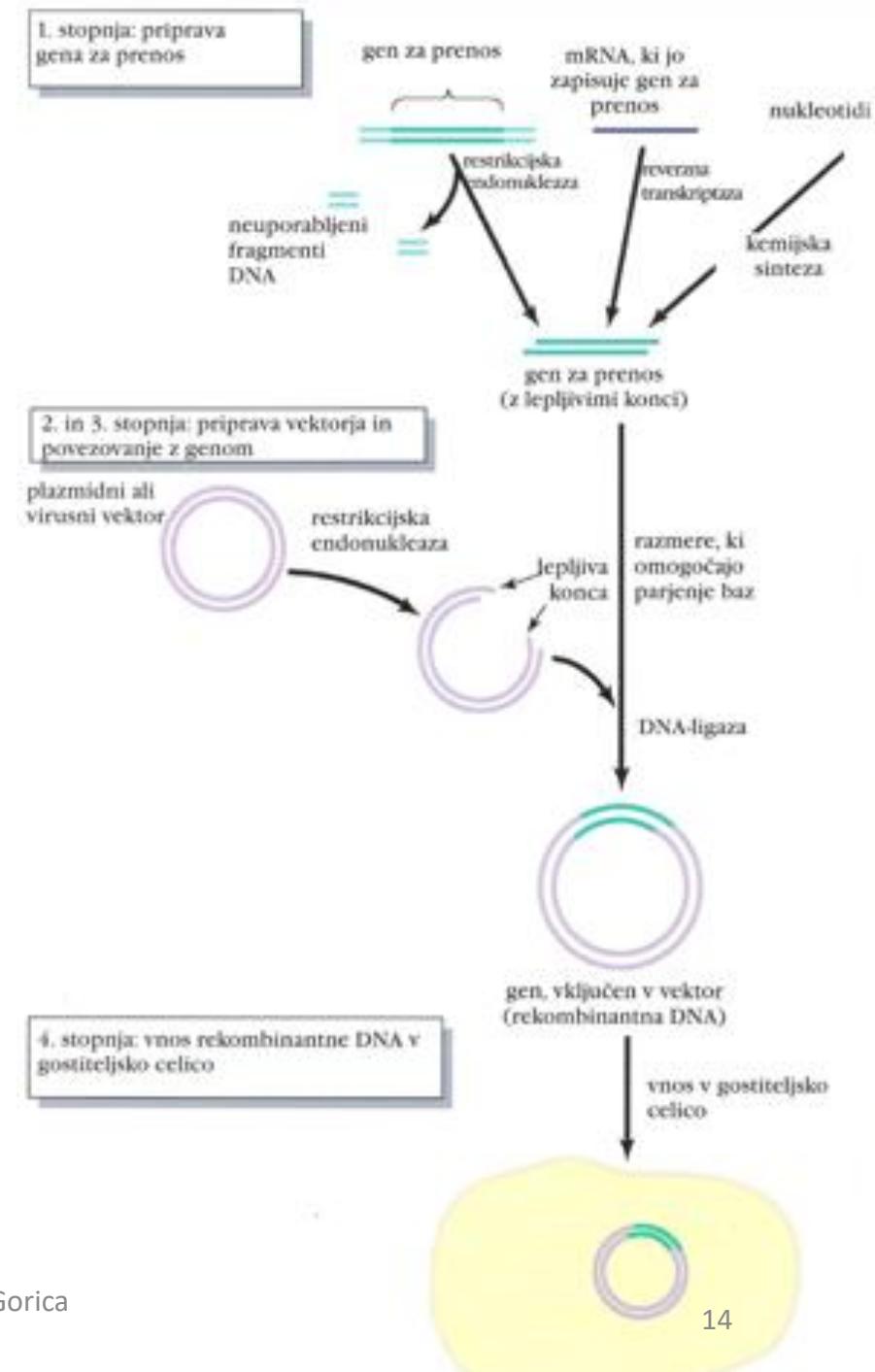
- Rezanje vektorja z restriktičnim encimom.

3. Vstavitev fragmenta tuje DNA v vektor – nastane **rekombinantna** ali **hibridna DNA**.

4. Vnos hibridne DNA v bakterijo (**transformacija**).

5. Postavitev bakterij v gojišče s hranilnim agarjem.

6. Razvoj metode za **pregledovanje** bakterij s hibridno DNA.



Izbira gostiteljskih celic

- Idealne lastnosti gostiteljskih celic so sledeče:
 - hitra rast,
 - prehranjevanje s cenovno ugodnimi hranili ,
 - nepatogenost,
 - sposobnost transformacije,
 - stabilnost.
- Mikroorganizmi s temi lastnostmi so:
 - *E. coli*,
 - *Bacillus subtilis*
 - *Saccharomyces cerevisiae*.

Kloniranje rekombinantne DNA

- Rekombinantno DNA kloniramo s pomočjo **klonirnih vektorjev**.
- **Izbira klonirnih vektorjev je odvisna od velikosti fragmenta DNA**, ki ga hočemo klonirati.

KLONIRNI VEKTORJI

- Plazmidi
- Bakteriofagi
- Kozmidi
- Umetni kromosomi bakterij (BAC)
- Umetni kromosomi kvasovk (YAC)

VELIKOST FRAGMENTA DNA

- do 10.000 *bp*
- do 21.000 *bp*
- do 45.000 *bp*
- do 300.000 *bp*
- nad 1.000.000 *bp*.

Plazmidi

- Plazmidi so **majhne krožne molekule**.
- Običajno **nosijo gene za odpornost proti antibiotikom**.
- Vsebujejo **mesta za restrikcijske encime**.
- V bakterijski celici **se samostojno razmnožujejo**.
- Njihov **način podvojevanja** je lahko:
 - **omejen**: samo nekaj kopij v celici
 - **sproščen**: tudi do 200 kopij v celici; lahko nastane tudi do 2000 ali 3000 kopij.
- Lahko **sprejmejo vključke do 10.000 baznih parov**.

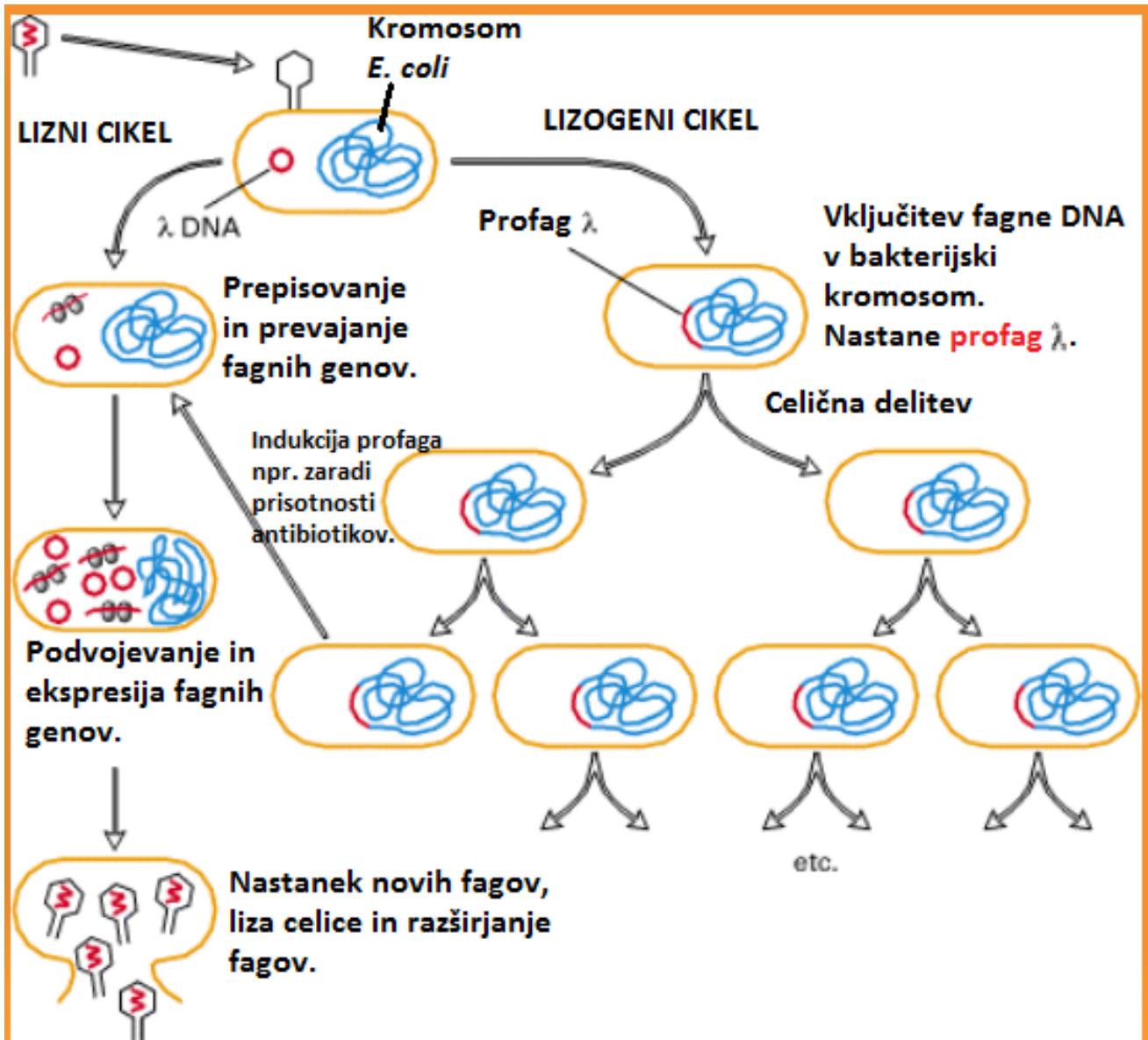
Idealni plazmidni klonirni vektor

- Podvojevanje na **sproščen način**.
- Biti mora **majhen**
 - lažja ločitev od velike **kromosomske DNA**
 - lažja obdelava brez poškodb
- Vsebovati mora **markerje (označevalce)** za **odpornost proti antibiotikom** (za testiranje učinkovitosti molekulskega kloniranja)
- Imeti mora **le eno cepitveno mesto** za določeno restriktivno endonukleazo.

Bakteriofagi

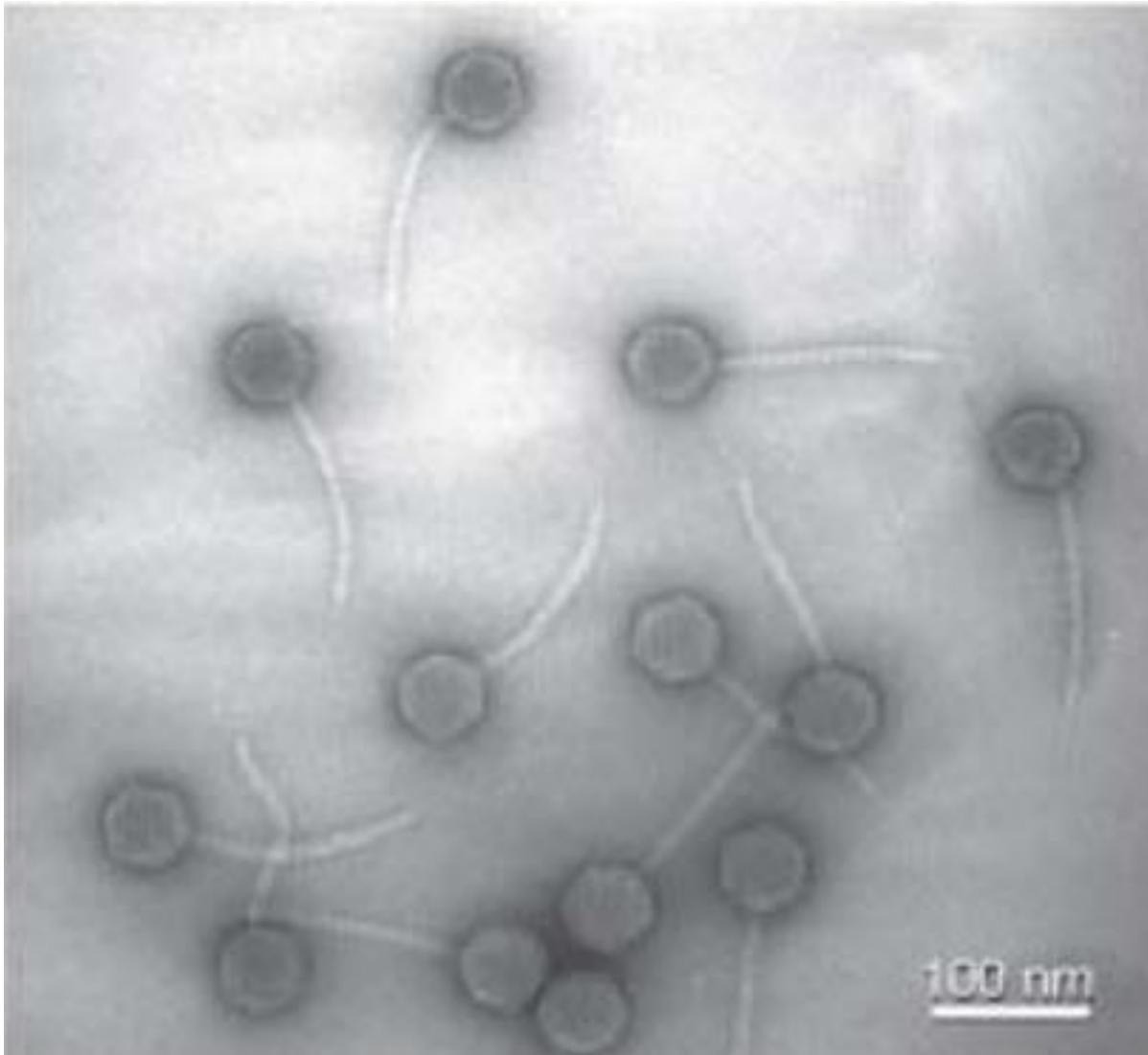
- Bakteriofage kot vektorje uporabljamo za molekulsко kloniranje daljših fragmentov DNA.
- Najpogosteje uporabljeni klonirni vektor te skupine je **fag λ** , molekula DNA s približno 50.000 baznimi pari.
- Prednosti:
 - Fag λ je večji od plazmidne DNA – primeren za vnos daljših fragmentov evkarijntske DNA (8.000 do 20.000 bp).
 - Rekombinantna fagna DNA se lahko učinkovito pakira v fagne glave.
 - V bakteriji je možna namnožitev mnogo kopij rekombinantne DNA.
 - Možna je preprosta identifikacija rekombinantne fagne DNA.

Lizni in lizogeni cikel faga λ



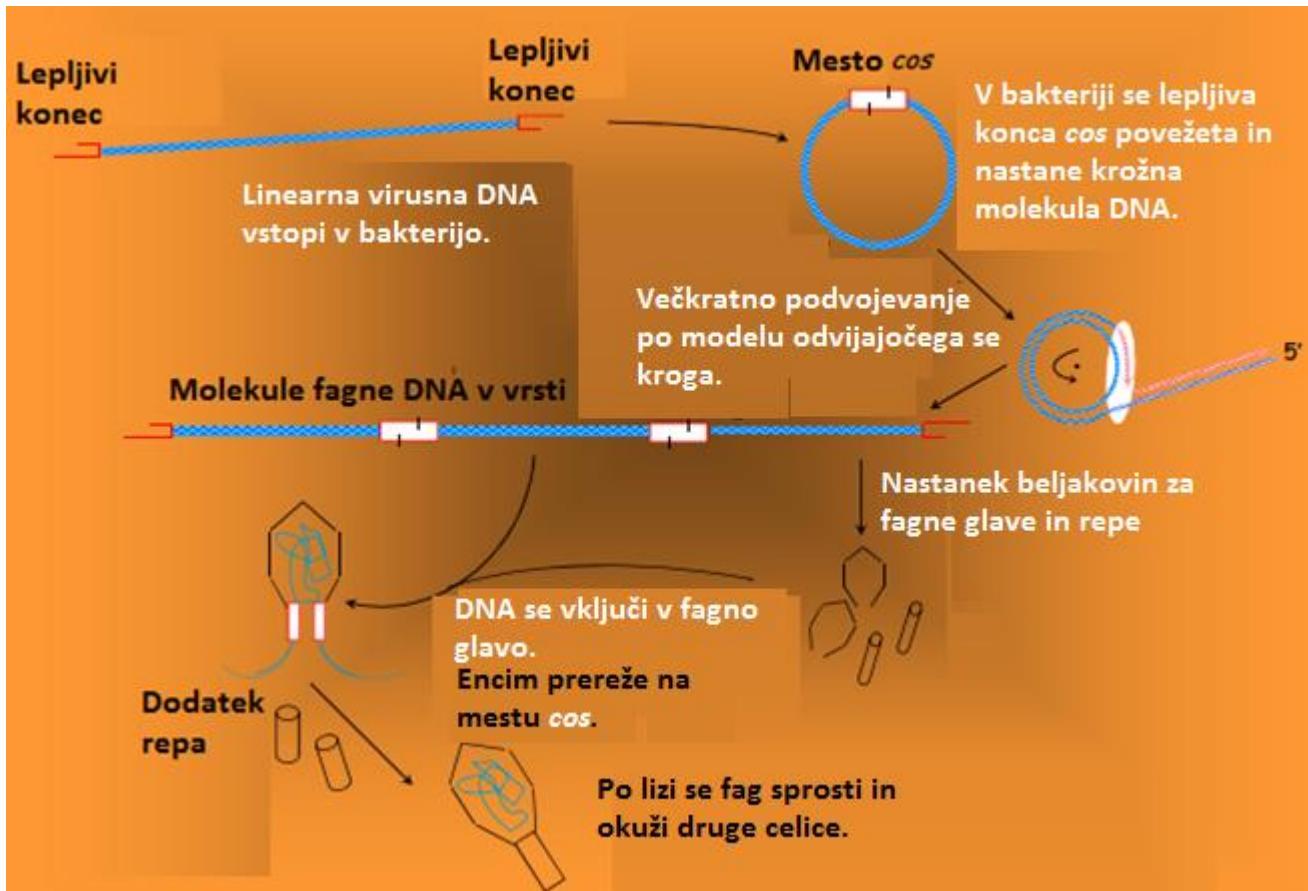
Kapaciteta fagne glave

- DNA faga λ je sestavljen iz **50.000 bp** z enoverižnima zaporedjema *cos* na obeh straneh.
 - Mesti *cos* sta sestavljeni iz **12 nukleotidov**, ki so med sabo komplementarni.
- **V fagno glavo pa se lahko pakirajo** tudi malo krajše ali malo daljše molekule DNA in sicer **od 38.000 do 51.000 bp**.
- Pri manipulaciji fagne DNA moramo upoštevati, da **fagu moramo pustiti 30.000 bp**, ki so esencialni za njegovo razmnoževanje.
- Na to DNA lahko povežemo **gen dolžine od 8.000 do 21.000 bp**.



Bakteriofag λ

Podvojevanje fagne DNA in njeni pakiranje v fagne glave



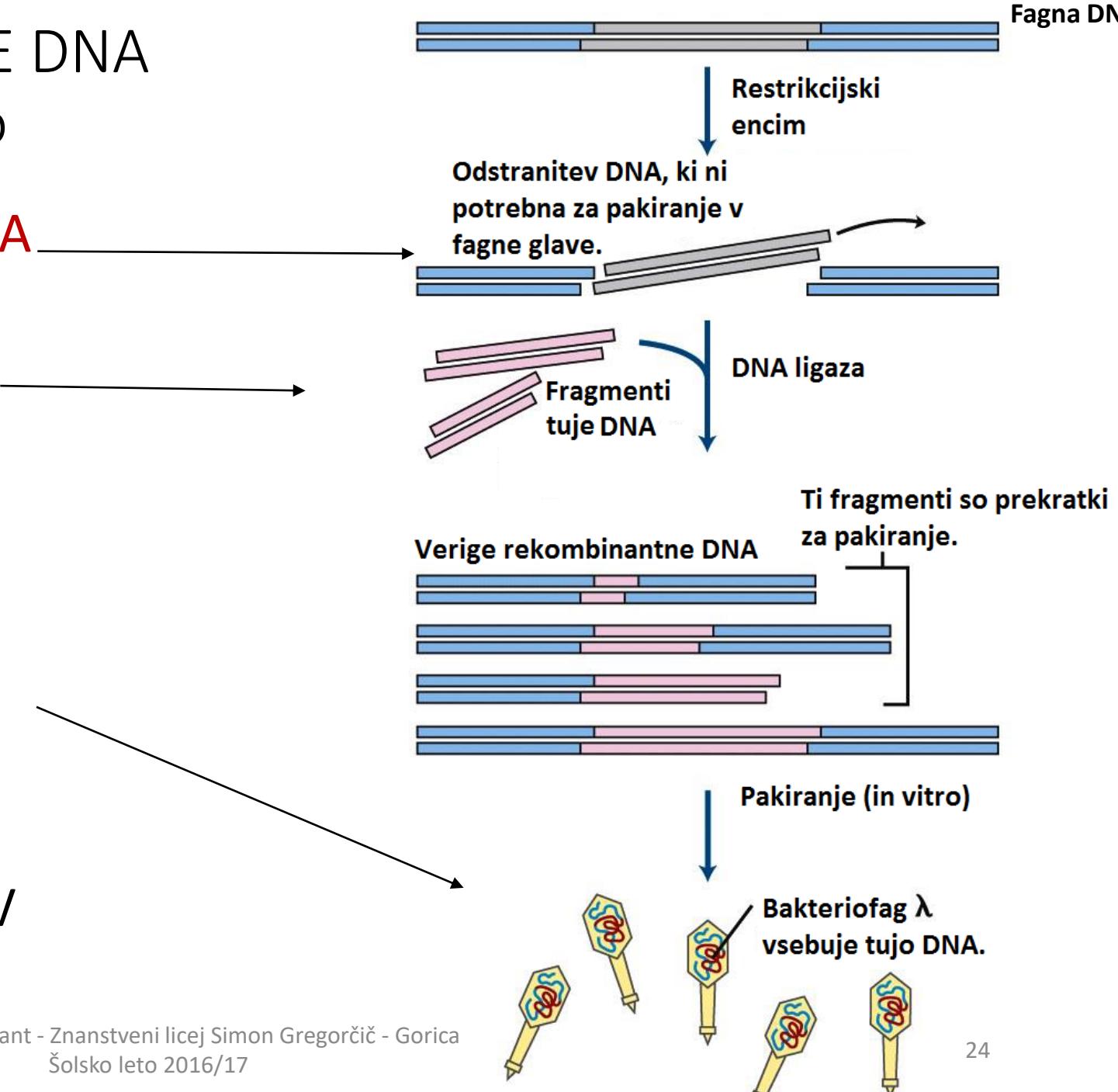
- Ko **vstopi fag v bakterijo**, se dve mesti *cos* **povežeta**.
- Tako nastane **krožna molekula**, ki je varna pred **eksonukleazami**.
- Krožna molekula se začne **podvojevati** po **modelu odvijajočega se kroga**.
- Nastane **dolga veriga DNA**, sestavljena iz **zaporedja fagnih genomov**.
- Na **mestih cos** jo **encim prereže**, tako da se lahko DNA **pakira** v fagne glave.

KLONIRANJE REKOMBINANTNE DNA

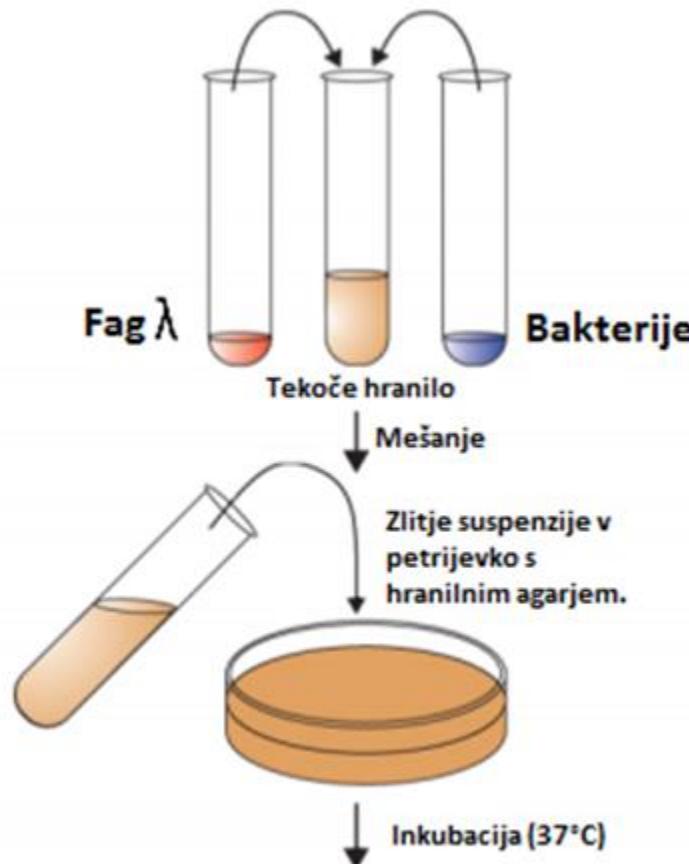
1. Pakiranje gena v fagno glavo

- Približno **1/3 bakteriofagne DNA** je **neesencialne** in jo lahko **nadomestimo** z **insertom** od 8.000 do 21.000 bp.
- Za vezanje uporabimo **DNA ligazo**.
- Dobimo verige **rekombinantne DNA**, ki jih vstavimo **v lizat*** bakterij, tako da se ***in vitro*** spakirajo v virusne delce.

*Lizat bakterij = suspenzija, ki vsebuje ostanke bakterij po lizi. V lizatu so prisotni tudi fagni delci (kapside, repi,...)



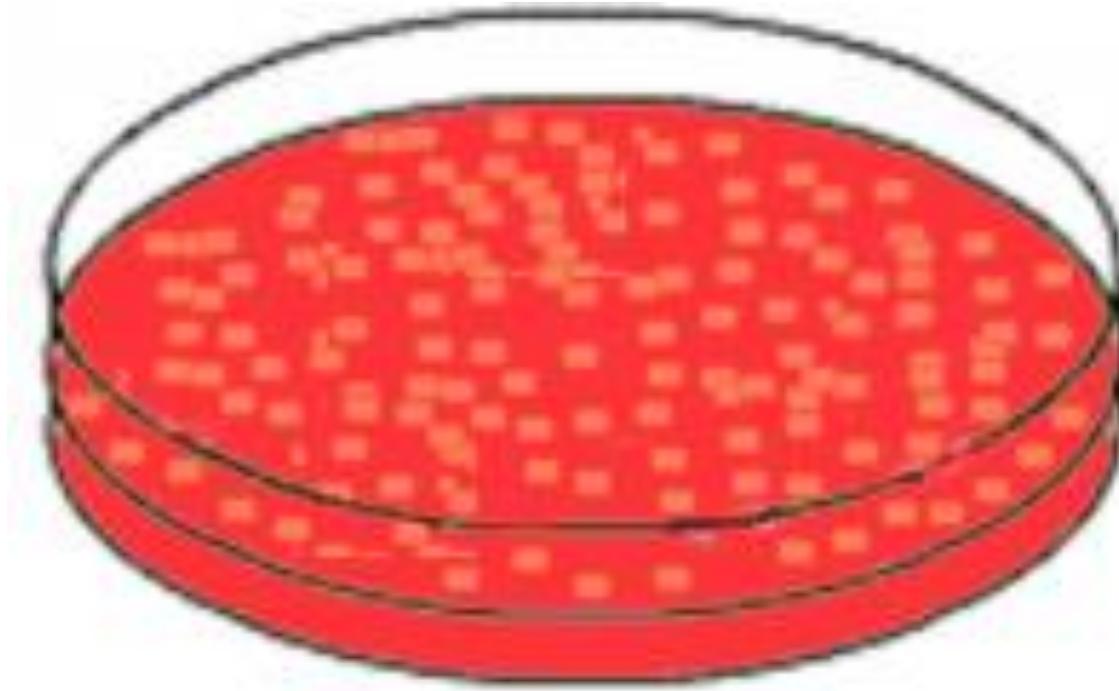
2. Vstop faga λ v bakterije



Razmnoževanje faga povzroči lizo celic, kar je razvidno s pojavom liznih plakov na trdnem gojišču.

- V epruveto s tekočim gojiščem damo fage λ in bakterije *E. coli*.
- Suspenzijo zlijemo na trdno gojišče v petrijevki in inkubiramo za 12-16 ur pri 37°C .
- Fagi λ vstopijo v bakterijske celice.
- Na gojišču bomo opazili prozorne plake, ki pričajo o lizi bakterijskih celic.
- Iz plakov lahko izoliramo fage z rekombinantno DNA.

Nastanek plakov v bakterijski kulturi



- **Plaki*** na trdnem gojišču so znak za bakterijsko lizo.
- Tu je **velika gostota fagov z rekombinantno DNA**.

***Plak ali razbistritev** je okrogle, transparentne čistine v bakterijski kulturi, ki nastane zaradi lize z virulentnim virusom.

3. Testiranje prisotnosti rekombinantnih fagov

- **Uporabljamo kolonije bakterij $Lac Z^-$, ki so nesposobne metabolizirati laktozo, ker ne proizvajajo encima β -galaktosidaze.**
- V fagno DNA **vključimo tudi gen $Lac Z$, ki bo povzročil nastanek encima β -galaktosidaze.**



- Po okužbi s fagom bodo **bakterije postale $Lac Z^+$** in bodo torej proizvajale **β -galaktosidazo**.
- Z uporabo ustreznega **indikatorja**, ki se **obarva modro** v prisotnosti **β -galaktosidaze**, evidentiramo **plake $Lac Z^+$** (v katerih so **rekombinantni fagi**).

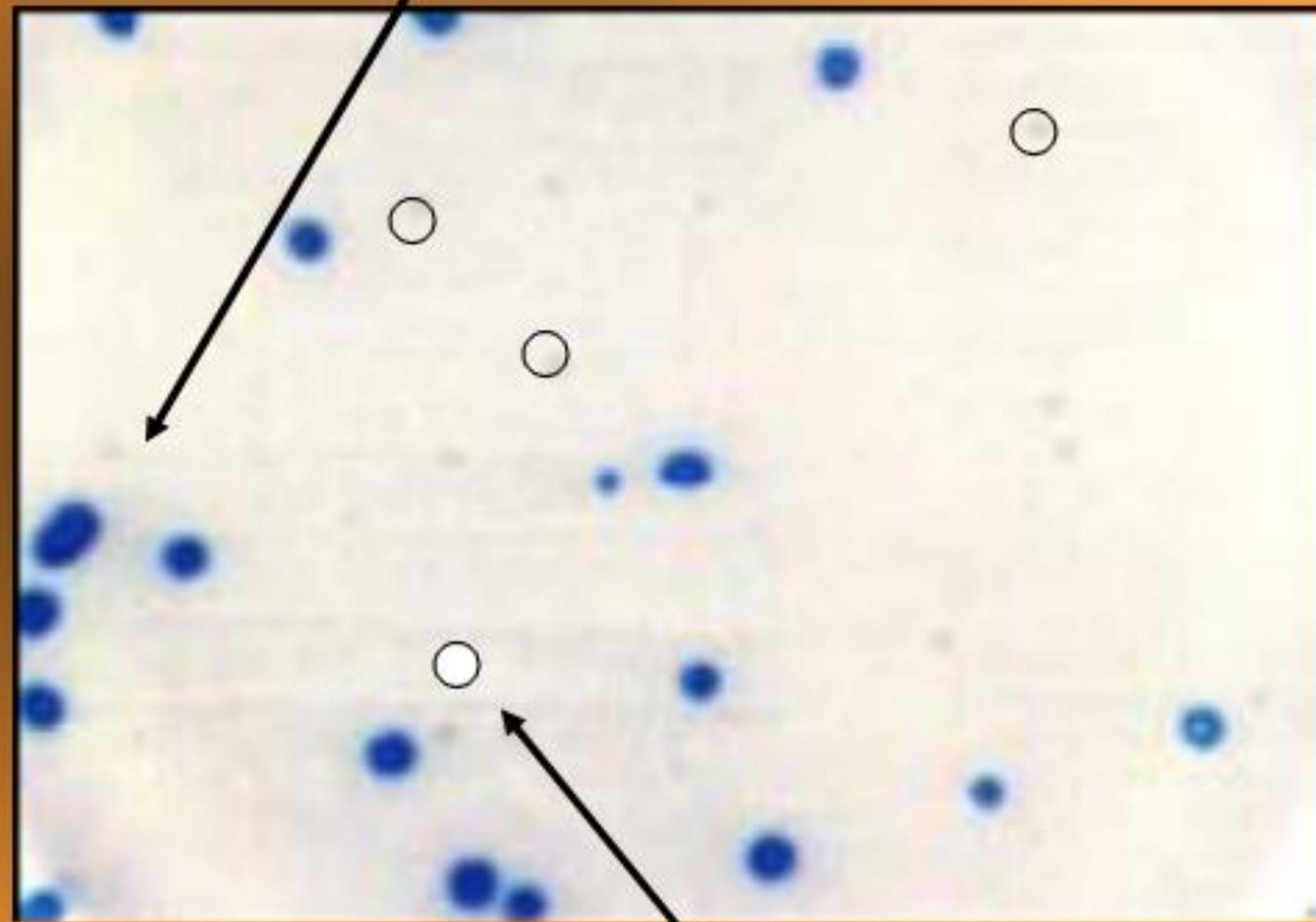
**MODRI PLAKI =
REKOMBINANTNI FAGI**

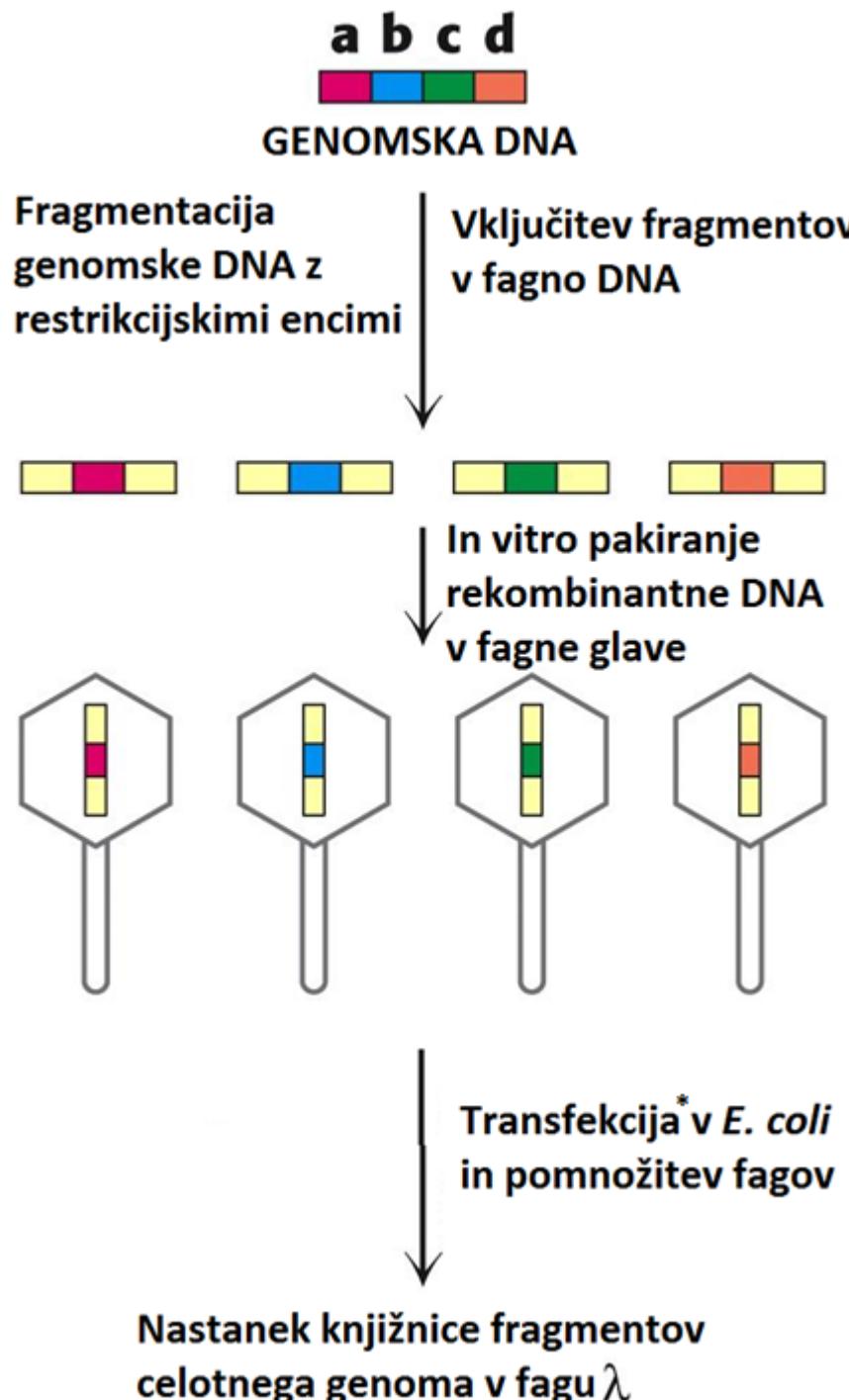
**BELI PLAKI =
NEREKOMBINANTNI FAGI**

**DNA IZOLIRAMO IZ MODRIH
PLAKOV.
BELI PLAKI NE VSEBUJEJO
INSERTA.**

Modri plaki (LacZ+)

Beli plaki (LacZ-)





Ustvarjanje knjižnice fragmentov celotnega genoma

- Z uporabo bakteriofagnih vektorjev lahko ustvarimo knjižnico fragmentov celotnega genoma nekega organizma. Postopek:
 1. Z restriktijskimi endonukleazami **razrežemo genomsko DNA na več 1000 fragmentov** – naključna populacija fragmentov.
 2. Z **gelsko elektroforezo ločimo fragmente po velikosti**. Za evidentiranje fragmentov agarozni **gel obarvamo**.
 3. Iz gela **izrežemo posamezne frakcije** in jih **izoliramo**.
 4. **Fragmente ustreznih velikosti (cca.15kb) vstavimo v bakteriofagno DNA**.
 5. Vstop fagov v bakterije.
 6. ***Transfekcija** (=vključitev tujega gena) v bakterije.
 7. Pomnožitev fagov.
 8. Nastanek knjižnice fragmentov celotnega genoma v fagu.

Gelska elektroforeza

- Gelska elektroforeza je postopek, s katerim **ločimo molekule DNA po velikosti**.
- Elektroforeza temelji na dejstvu, da **v električnem polju električno nabit delci potujejo proti polu z nasprotnim nabojem**.
- V vodnem okolju imajo **molekule DNA negativni naboj**, saj vsebujejo veliko negativno nabitih fosfatnih skupin.
- Zato molekule DNA **potujejo proti pozitivnemu polu**.
- Fragmenti DNA **se ločijo glede na molekulsko maso**.
- Najmanjše molekule potujejo **najhitreje** in dosežejo pozitivni pol, **največje molekule potujejo počasneje** in ostanejo v bližini negativnega pola.

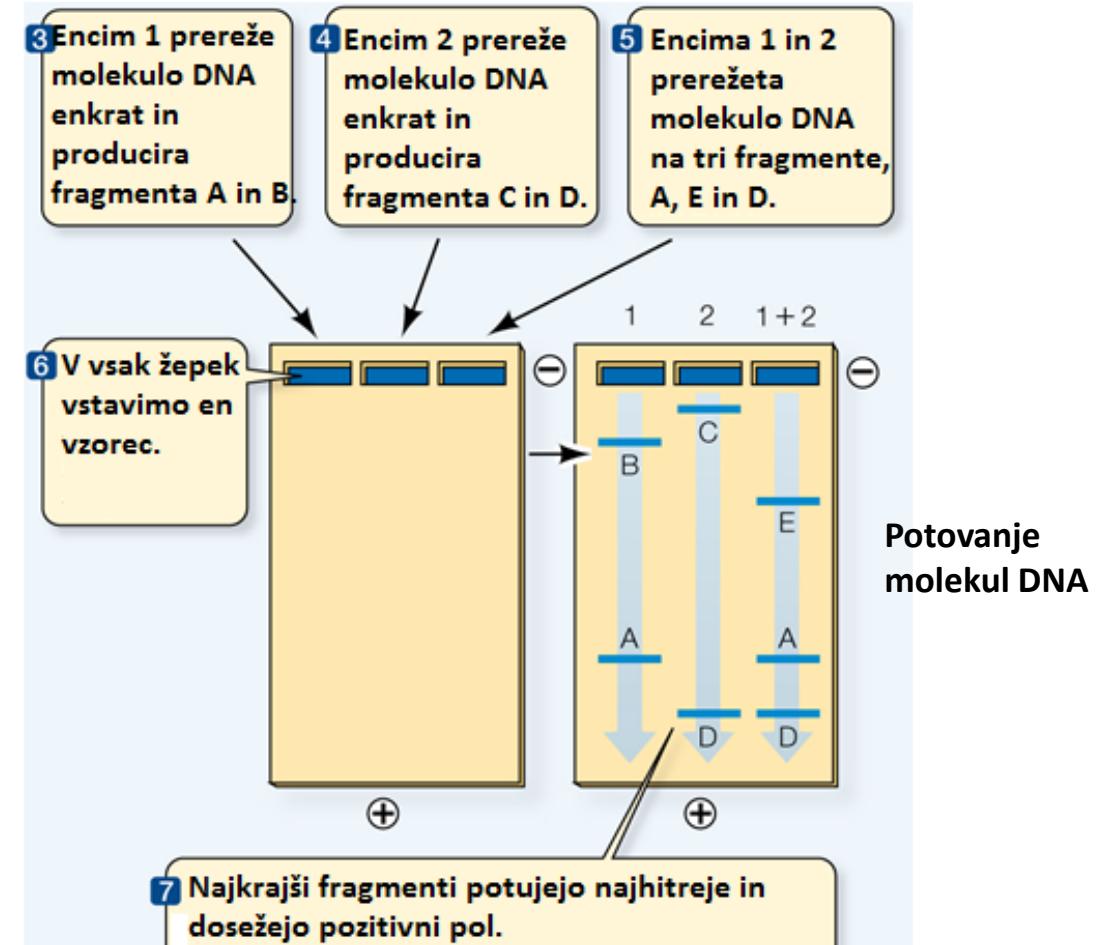
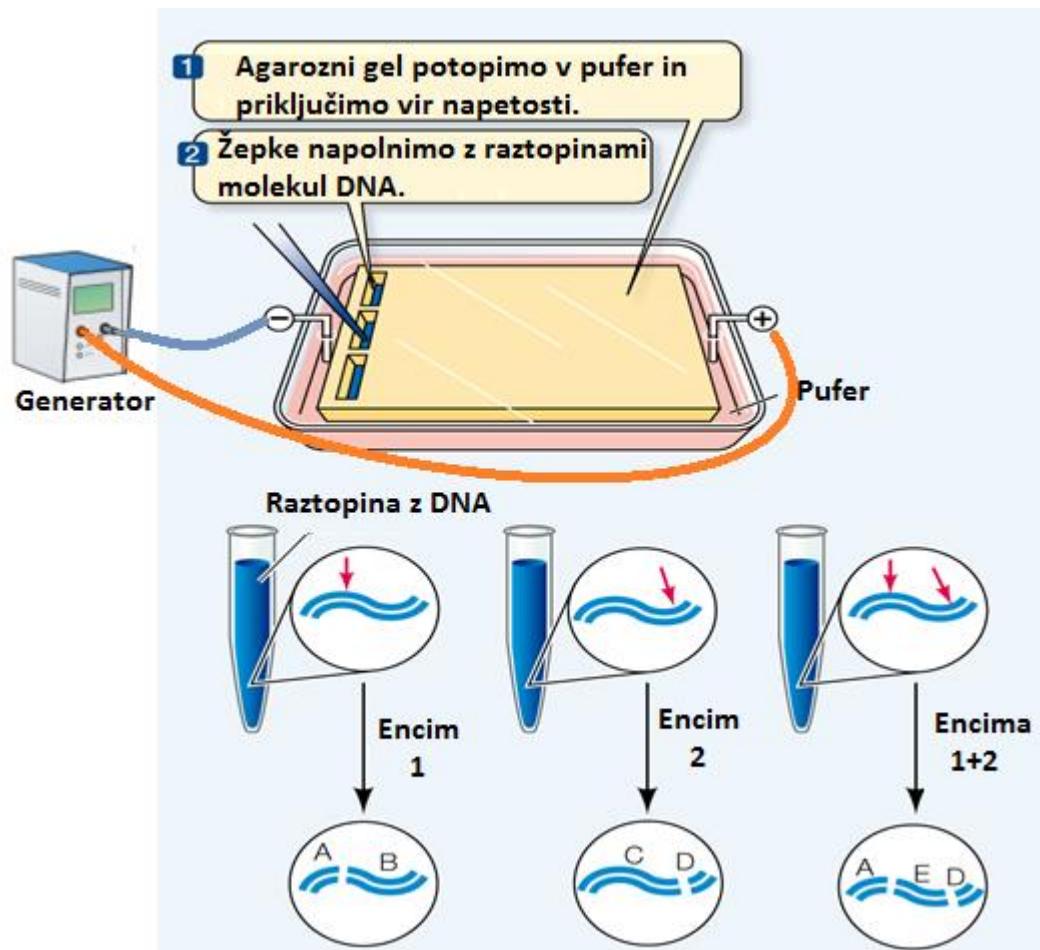
Gelska elektroforeza - postopek

- Najprej **pripravimo agarozni* gel**; to je pravokotna ploščica s posebnimi vdolbinami (**žepki**), v katere lahko vnesemo vzorec.
Agaroza je polisaharid, ki ga pridobivamo **iz alg.*
- Gel potopimo v **pufer**, ki bo ohranjal negativne naboje na DNA.
- **V žepke nanesemo vzorce** z molekulami DNA.
- **S priklopom na vir napetosti** v gelu vzpostavimo **električno polje**.
- **Negativni pol** je pri vzorcih DNA, **pozitivni** pa na nasprnom koncu gela.
- **Negativno nabite molekule DNA** začnejo potovati **proti pozitivnemu polu**.

Gelska elektroforeza - postopek

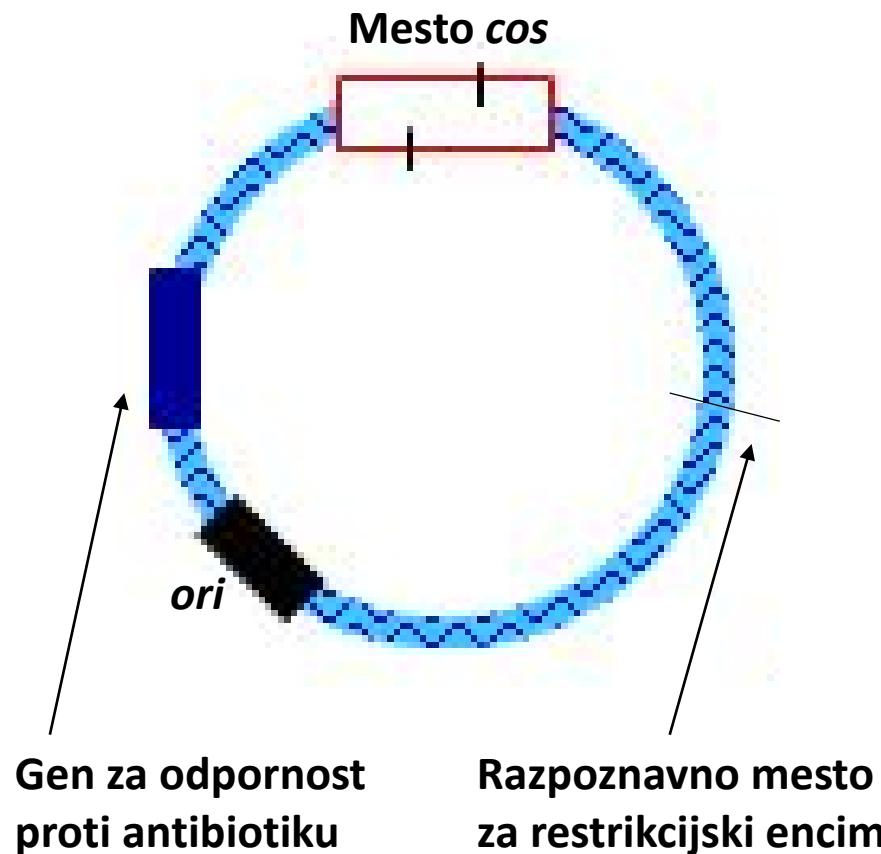
- Molekule agaroze tvorijo gosto prepleteno mrežo.
- Mreža agaroze bolj ovira potovanje daljših molekul DNA, kot krajših.
- Zato daljše molekule DNA potujejo počasneje kot krajše.
- Molekule DNA se ločujejo po velikosti.
- Po določenem času vir napetosti izključimo.
- Ker so molekule DNA brezbarvne, jih moramo obarvati, da jih lahko vidimo.
- Skupk enako velikih molekul DNA vidimo kot podolgovato liso na gelu.

Gelska elektroforeza



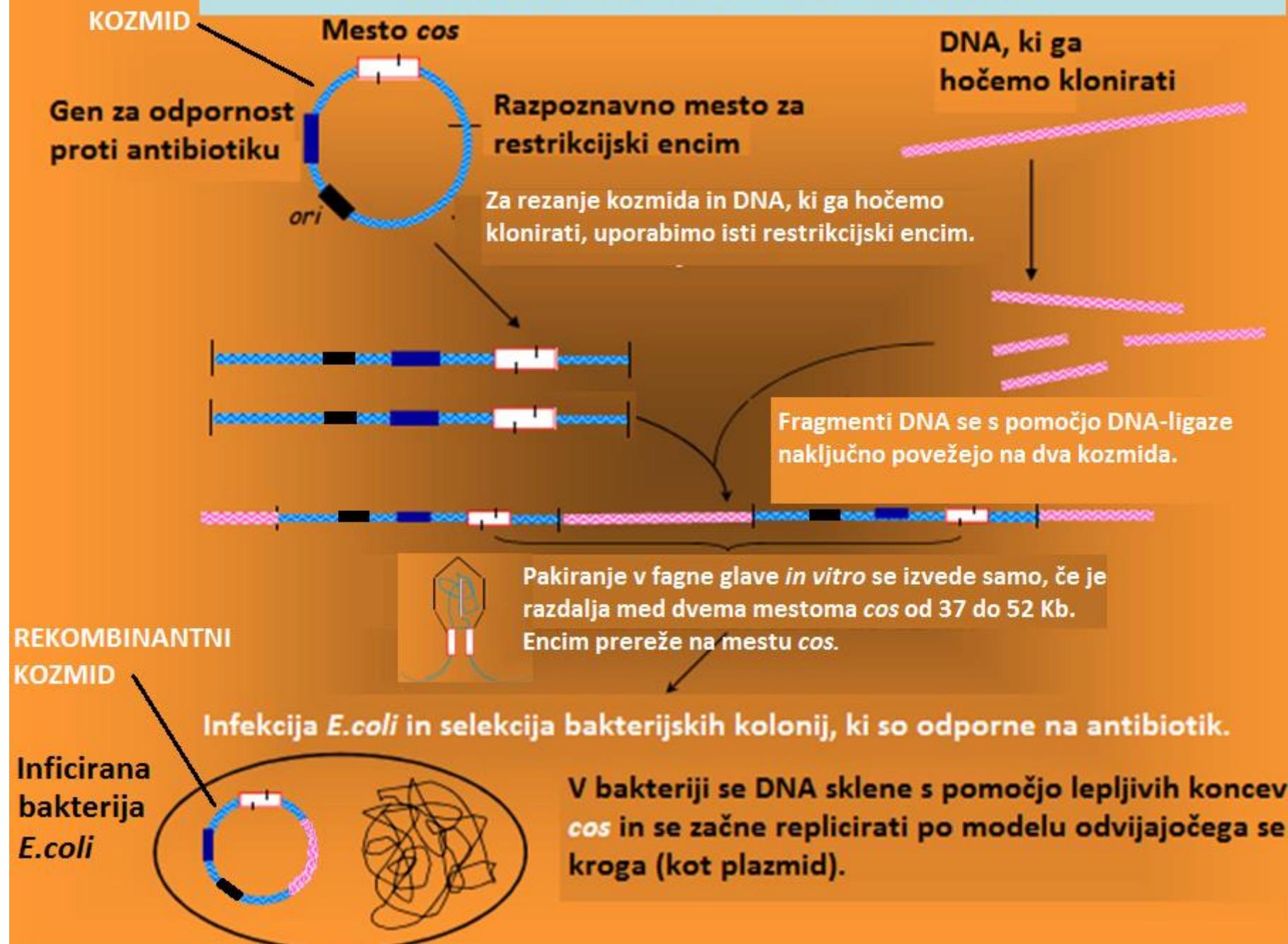
Kozmidi

- Kozmidi so umetni **plazmidi**, primerni za **kloniranje** **dolgih fragmentov** evkariontske DNA.
- Kozmidi imajo značilnosti **plazmidov** in **bakteriofagov**.
- Zgradimo jih tako, da **v plazmid vcepimo** lokus ***cos* faga λ** , (\rightarrow **“cosmid”**), ki omogoči pakiranje kozmida v kapsido.
- **Kozmidno DNA** je zato možno **obdati** s fagovim ovojem *in vitro*.
- Take fage lahko uporabimo za **transfekcijo** (=vključitev tujega gena) v *E. coli*.
- **Prednost** uporabe faga je tudi ta, da so **fagi veliko stabilnejši od plazmidov**: v njih lahko **ohranimo rekombinantno DNA za dolga obdobja** (**genoteka ali genomska knjižnica**).

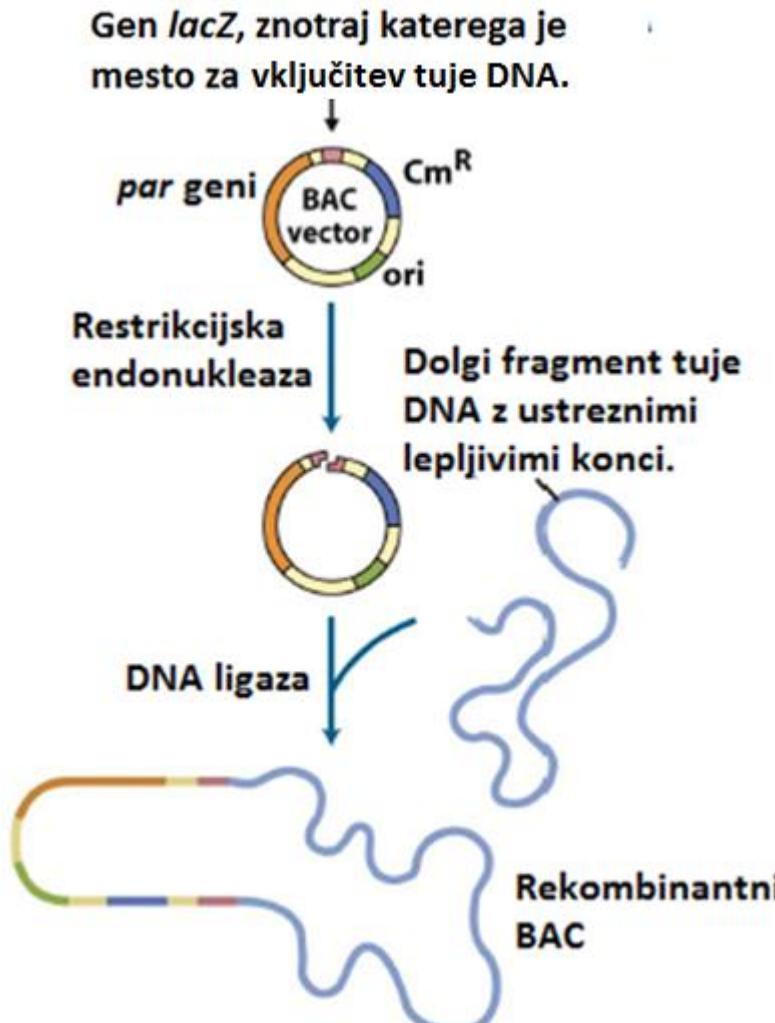


KOZMID

KLONIRANJE DNA Z UPORABO KOZMIDOV

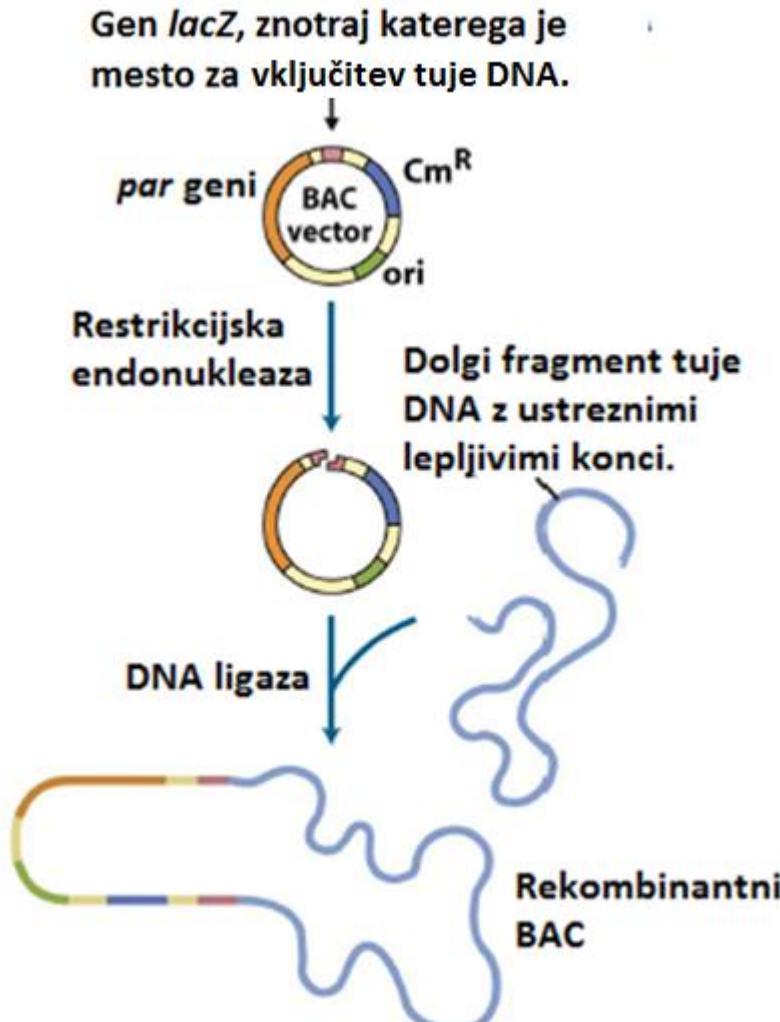


Bakterijski umetni kromosom - BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*)



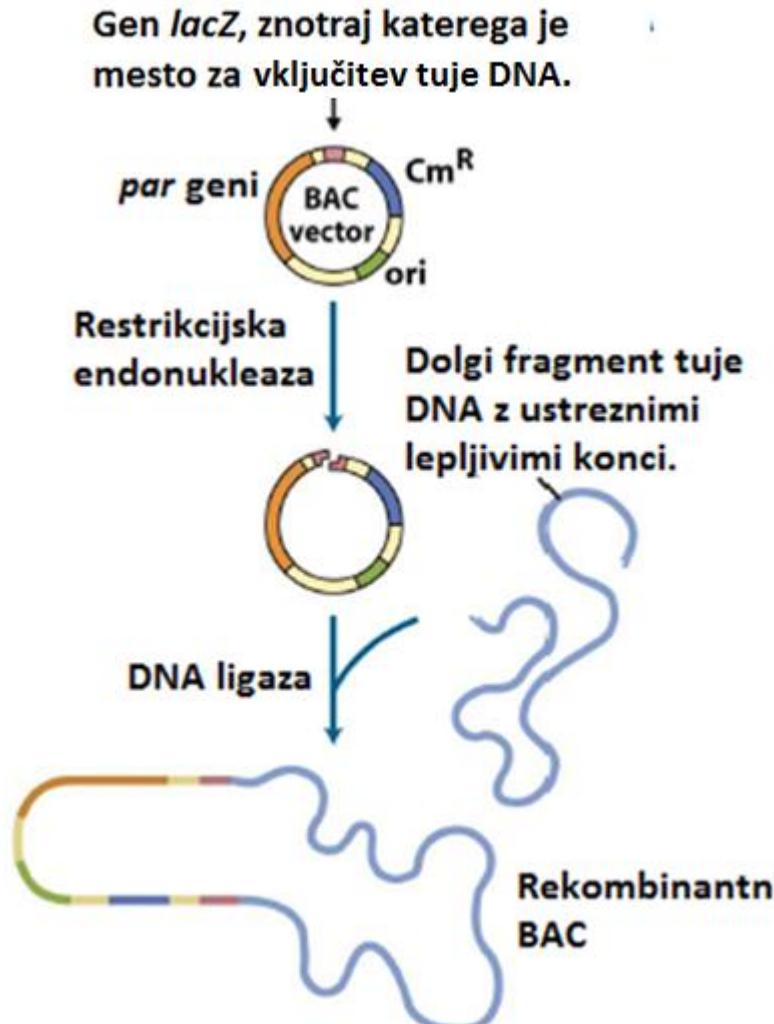
- BAC je sintetični vektor, prirejen za **vnos dolgih fragmentov DNA** –100.000 do 300.000 bp.
- BAC vsebuje:
 - mesto **ori**, ki omogoča **replikacijo v bakterijah**.
 - **par gene**, ki so normalno prisotni v plazmidu F bakterije E.coli in omogočajo **enakomerno porazdelitev plazmidov med hčerinski celici pri delitvi**.
 - **Cm^R**–zapis za **rezistenco za kloramfenikol**.
 - **lac Z**– gen za **β-galaktosidazo**, ki omogoča **selekcijo rekombinantnih bakterij**.
 - Znotraj gena *lac Z* je mesto za vključitev tuje DNA.

Kloniranje z bakterijskim umetnim kromosomom - BAC



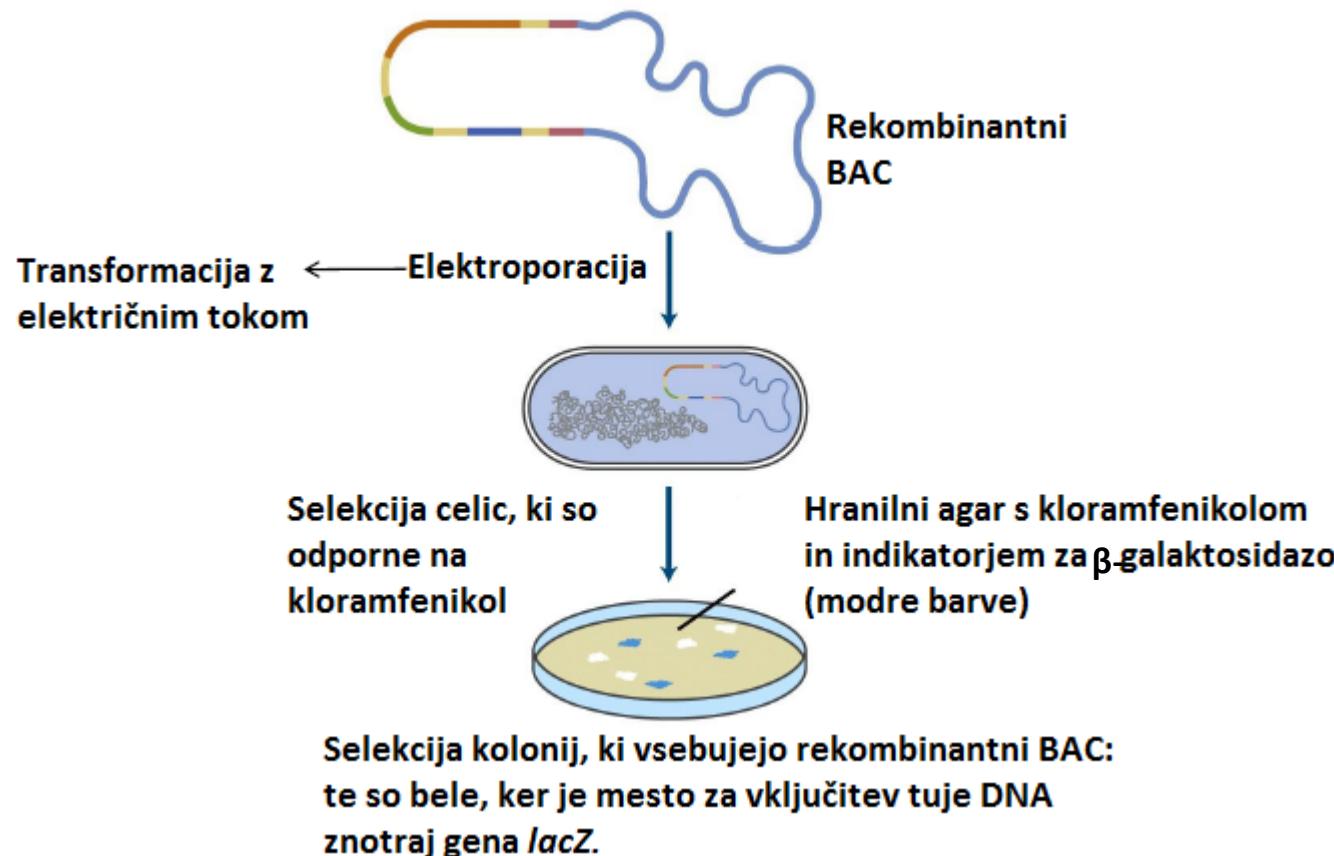
- V vektor BAC (znotraj gena *lac Z*) vključimo fragment DNA, ki ga hočemo klonirati. Dobimo rekombinantni BAC.
- Z elektroporacijo vključimo rekombinantni BAC v kolonijo bakterij.
- Bakterije morajo biti:
 - *Lac Z*⁻ (nesposobne metabolizirati laktozo, ker ne proizvajajo encima β -galaktosidaze);
 - *Cm*⁻ (občutljive na kloramfenikol).
- Zlijemo suspenzijo bakterij v petrijevko s hranilnim agarjem, s kloramfenikolom in z indikatorjem za β -galaktosidazo.

Kloniranje z bakterijskim umetnim kromosomom - BAC

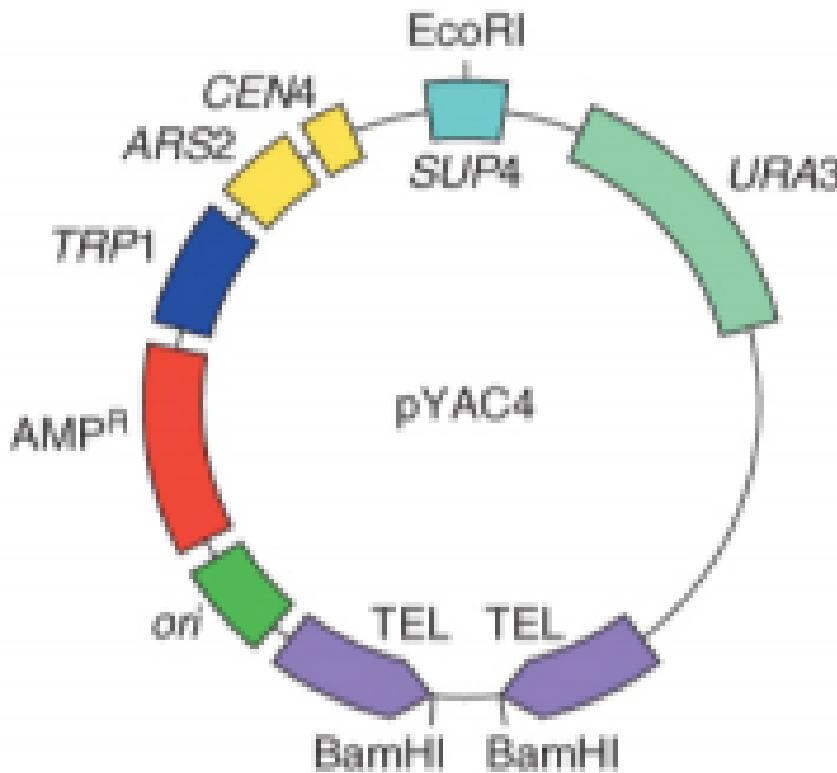


- Bakterije, v katere se BAC ni vključil, ne preživijo v prisotnosti kloramfenikola.
- Bakterije, v katere se je vključil samo fragment DNA, tudi ne preživijo v prisotnosti kloramfenikola.
- Preživita samo 2 vrsti bakterijskih kolonij:
 - Bakterije, v katere se je vključil BAC brez fragmenta DNA, preživijo in so modre barve, ker gen *lac Z* ni bil prekinjen.
 - Bakterije, v katere se je vključil rekombinantni BAC, preživijo in so bele barve, ker je bil gen *lac Z* prekinjen.

Bakterijski umetni kromosom - BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*)_β

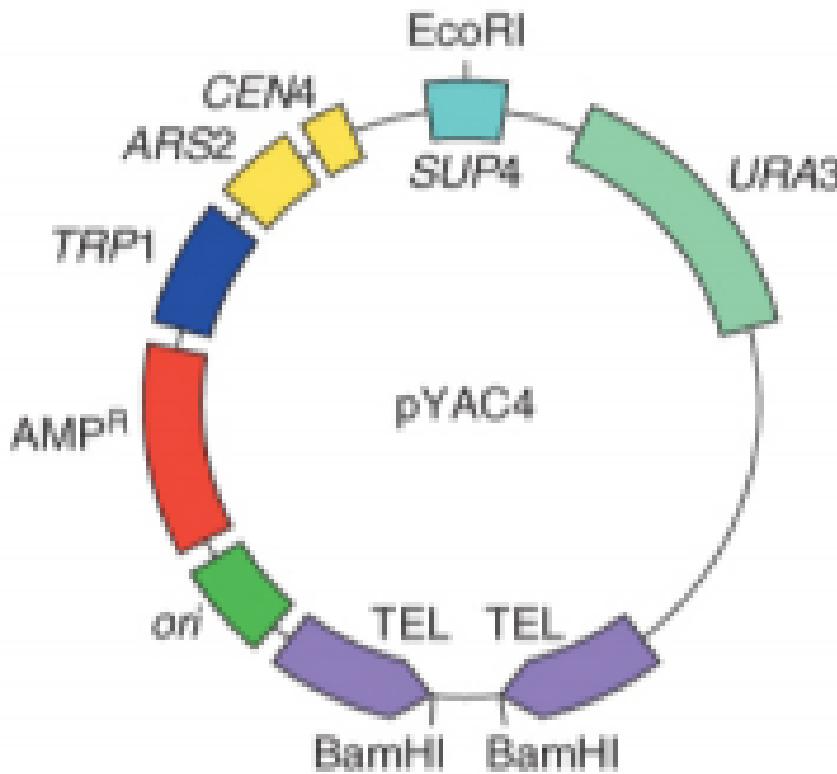


Umetni kromosom kvasovke – YAC (*Yeast Artificial Chromosome*)



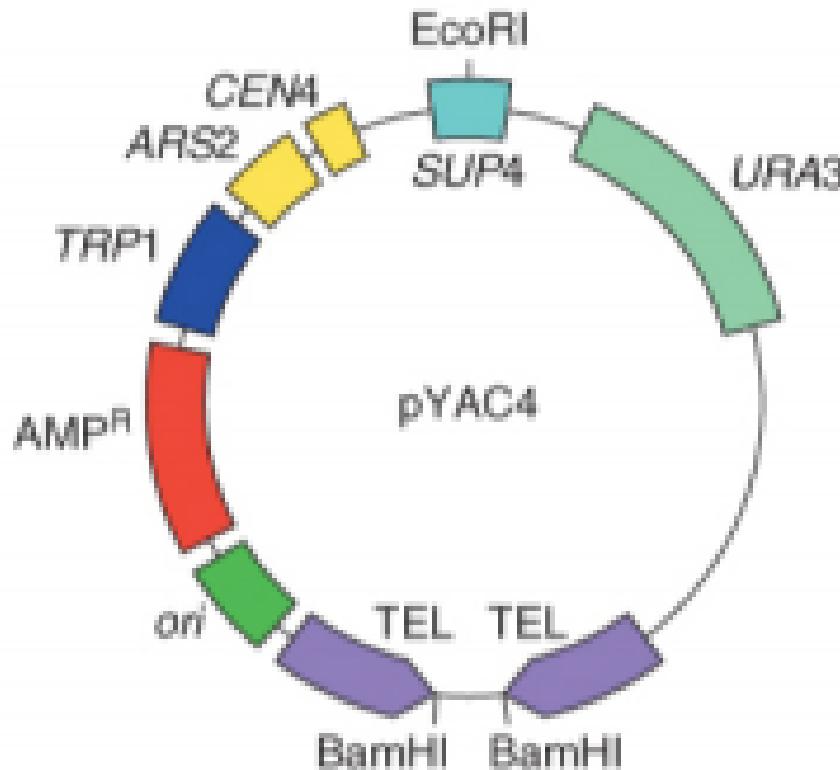
- Med vsemi vektorji lahko **YAC sprejme najdaljše fragmente DNA (nad 1.000.000 bp)**, kar je zelo pripravno za **kloniranje človeškega genoma**, vendar je njegova **sposobnost transformacije v kvasovke zelo nizka**.
- Druga **pomanjkljivost** je ta, da je **vektorje YAC težko manipulirati**, ker so **zelo labilni** in v gostitelju **težijo k rekombinaciji**.
- Vektorji YAC **se razmnožujejo bodisi v bakterijah**, kot v **kvasovkah**.
- **Ohranjamo jih v bakterijah *E.coli***.

Umetni kromosom kvasovke – YAC (*Yeast Artificial Chromosome*)



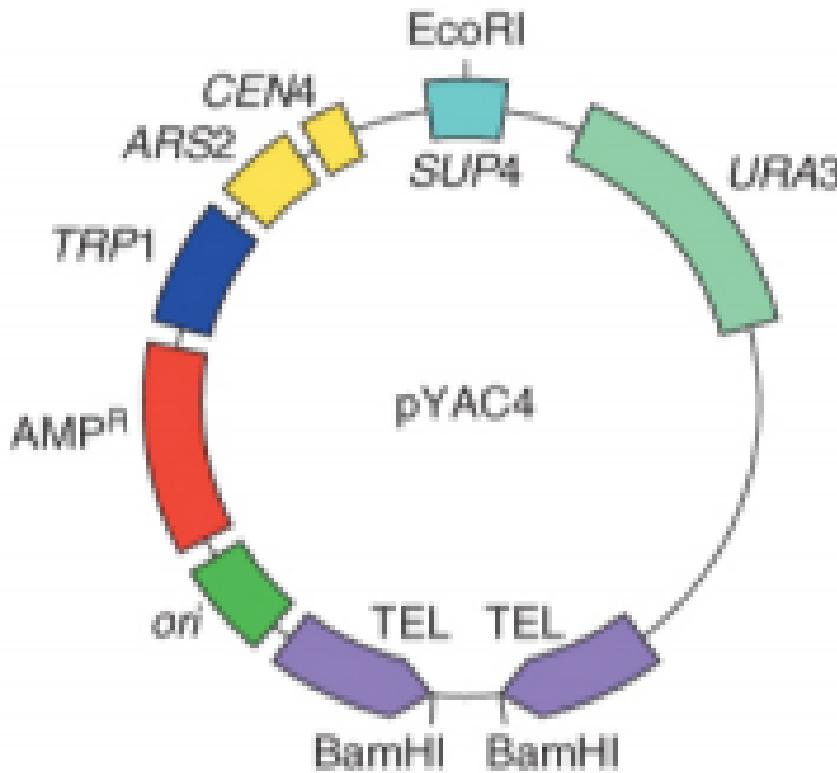
- Rekombinantni YAC kloniramo:
 - v bakterijah z mutacijo *amp*⁻ (niso odporne na ampicilin);
 - v kvasovkah s sledečimi mutacijami:
 - *Trp*⁻ (niso sposobne sintetizirati triptofana);
 - *Ura*⁻ (niso sposobne sintetizirati uracila);
 - *Ade*⁻ (niso sposobne sintetizirati adenina in so rdeče).

Umetni kromosom kvasovke – YAC (*Yeast Artificial Chromosome*)



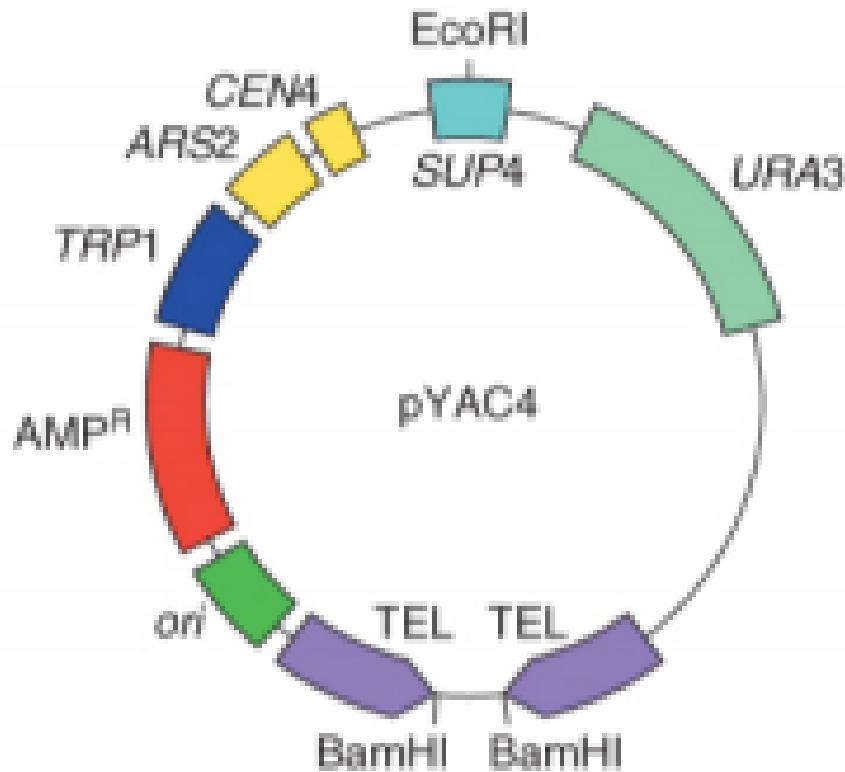
- Umetni kromosom YAC ima **značilnosti**, ki so skupne vsem **evkariontskim kromosomom** in sicer:
 - **2 telomera (TEL)**, ki stabilizirata vektor
 - **centromer (CEN)**, ki omogoča pravilno ločevanje vektorja med mitozo
 - **izhodišče za replikacijo (ARS)**.

Umetni kromosom kvasovke – YAC (*Yeast Artificial Chromosome*)



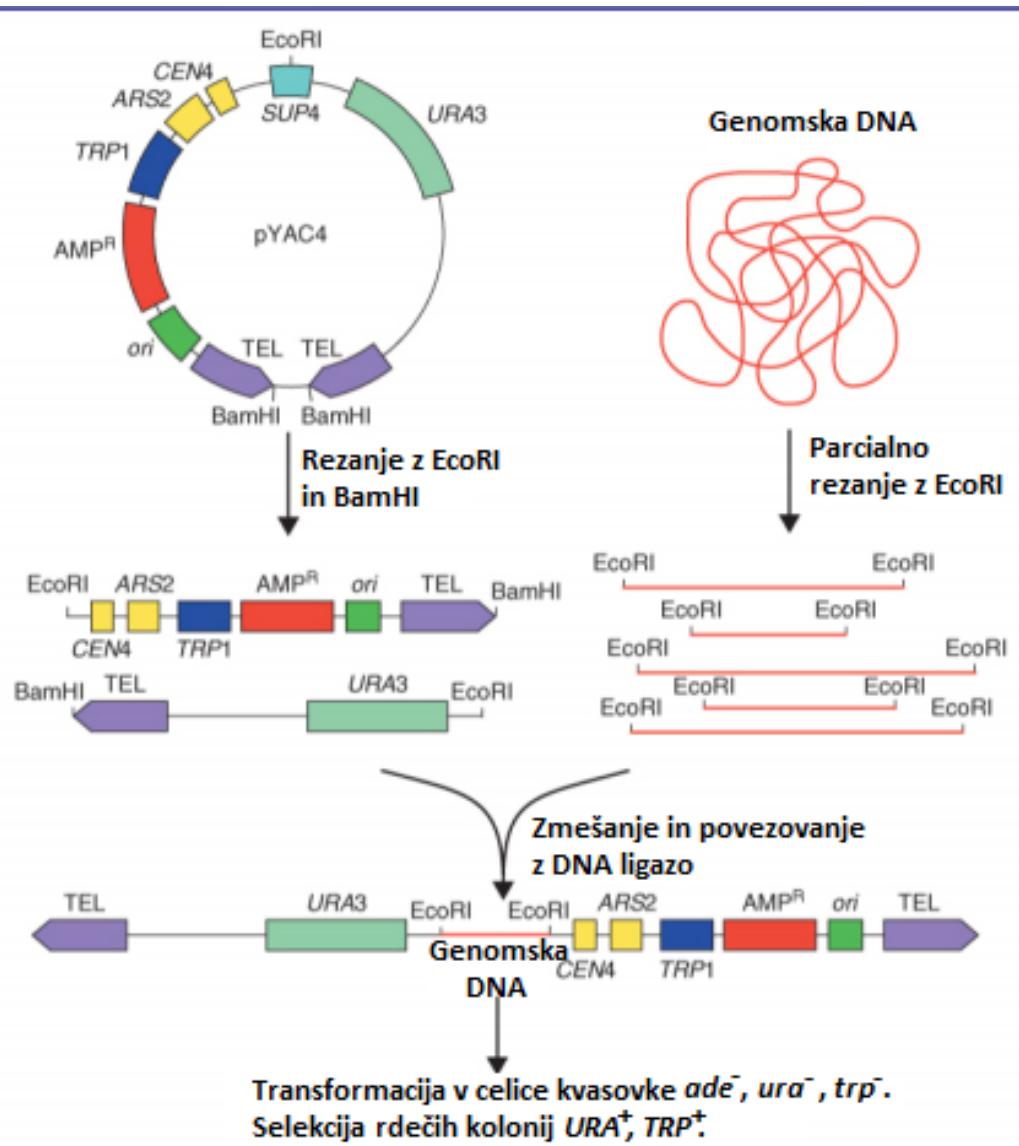
- Ostale značilnosti:
 - Ena prepoznavno mesto za **EcoRI** in dve mesti za **BamHI**.
 - Mesto **ori**, ki omogoča **replikacijo v bakterijah**.
 - **AMP**: gen za **odpornost proti ampicilinu** (genski marker za **selekcijo rekombinantnih bakterij**).
 - **TRP, URA, SUP**: **genski markerji** za selekcijo **rekombinantnih celic kvasovk**.

Umetni kromosom kvasovke – YAC (*Yeast Artificial Chromosome*)



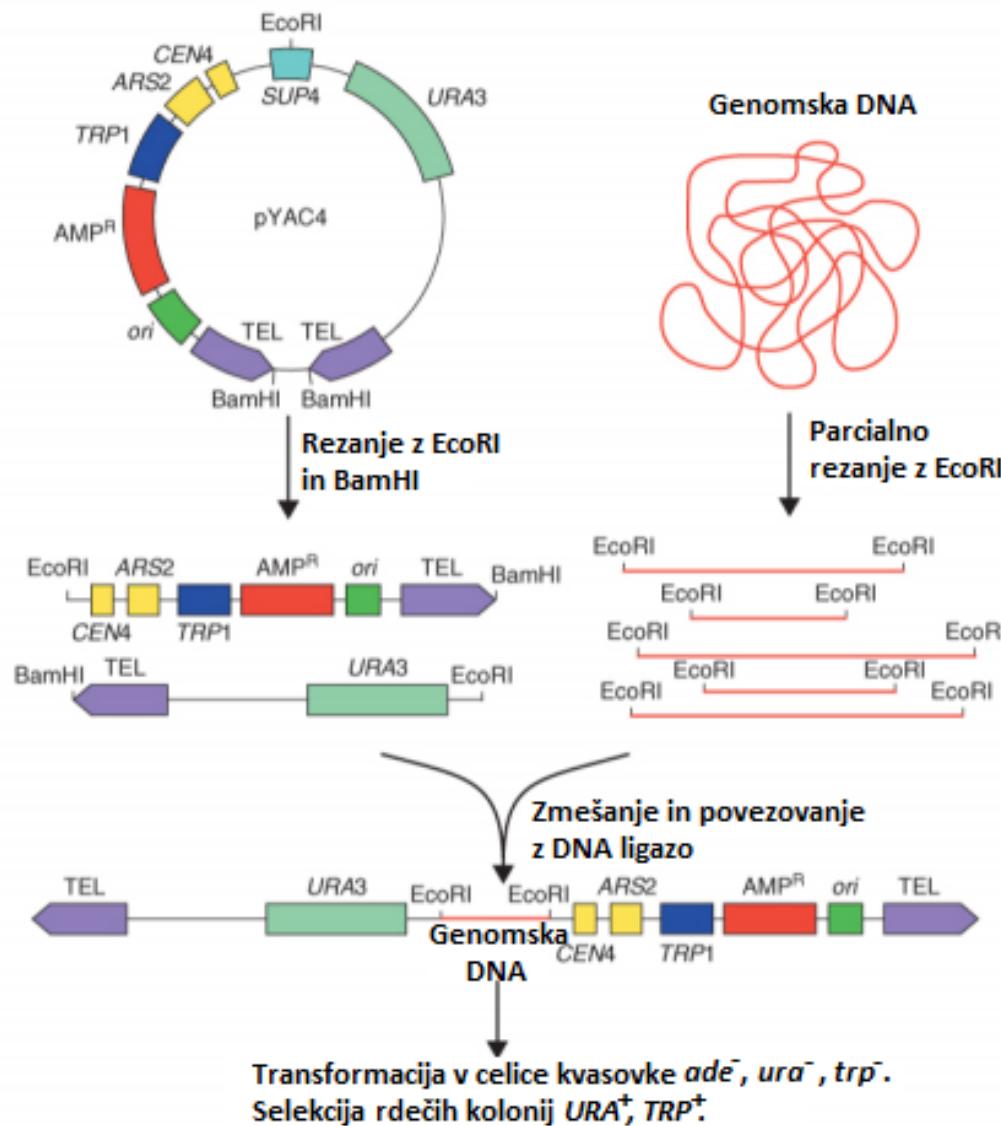
- Gen **TRP** omogoča biosintezo triptofana v kvasovkah *trp*⁻.
- Gen **URA** omogoča biosintezo uracila v kvasovkah *ura*⁻.
- Gen **SUP** prepreči tvorbo rdečega barvila, zato so v njegovi prisotnosti kolonije bele barve.

Postopek kloniranja z vektorjem YAC



1. **Parcialno rezanje** genomske **DNA** z encimom **EcoRI**.
2. **Ločitev dveh vej vektorja YAC** z encimoma **EcoRI** in **BamHI**.
 - Na **eni veji** je gen **TRP**, ki omogoča biosintezo **triptofana**.
 - Na **drugi veji** je gen **URA**, ki omogoča biosintezo **uracila**.
3. **Vezava obeh vej vektorja z insertom genomske DNA (DNA ligaza)**.

Postopek kloniranja z vektorjem YAC



3. Transformacija v kvasovke *ade⁻, ura⁻, trp⁻* na terenu brez uracila in triptofana.
4. **Selekcija** rekombinantnih kvasovk:
 - Kolonije kvasovk, ki vsebujejo kompletен vektor (obe veji, z genomsko DNA v sredini) so rdeče barve (ker se gen SUP inaktivira zaradi vključitve genomske DNA) in **preživijo v terenu brez uracila in triptofana**.
 - (Kolonije kvasovk, ki vsebujejo vektor YAC brez genomske DNA tudi preživijo, vendar so bele, ker je ostal gen SUP cel).

Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

- V nekaterih genetskih raziskavah ali v sodni medicini imamo ponavadi na razpolago zelo majhne količine DNA, npr. dedni material ene same celice, človeškega lasu, biopsiranega tkiva itd.
- **Verižna reakcija s polimerazo (PCR)** omogoča pomnoževanje *in vitro* določenega zaporedja DNA, ki ga hočemo analizirati.
- S tem **ga dejansko ojačamo** in ga **lažje določimo** ali **kloniramo**.

Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

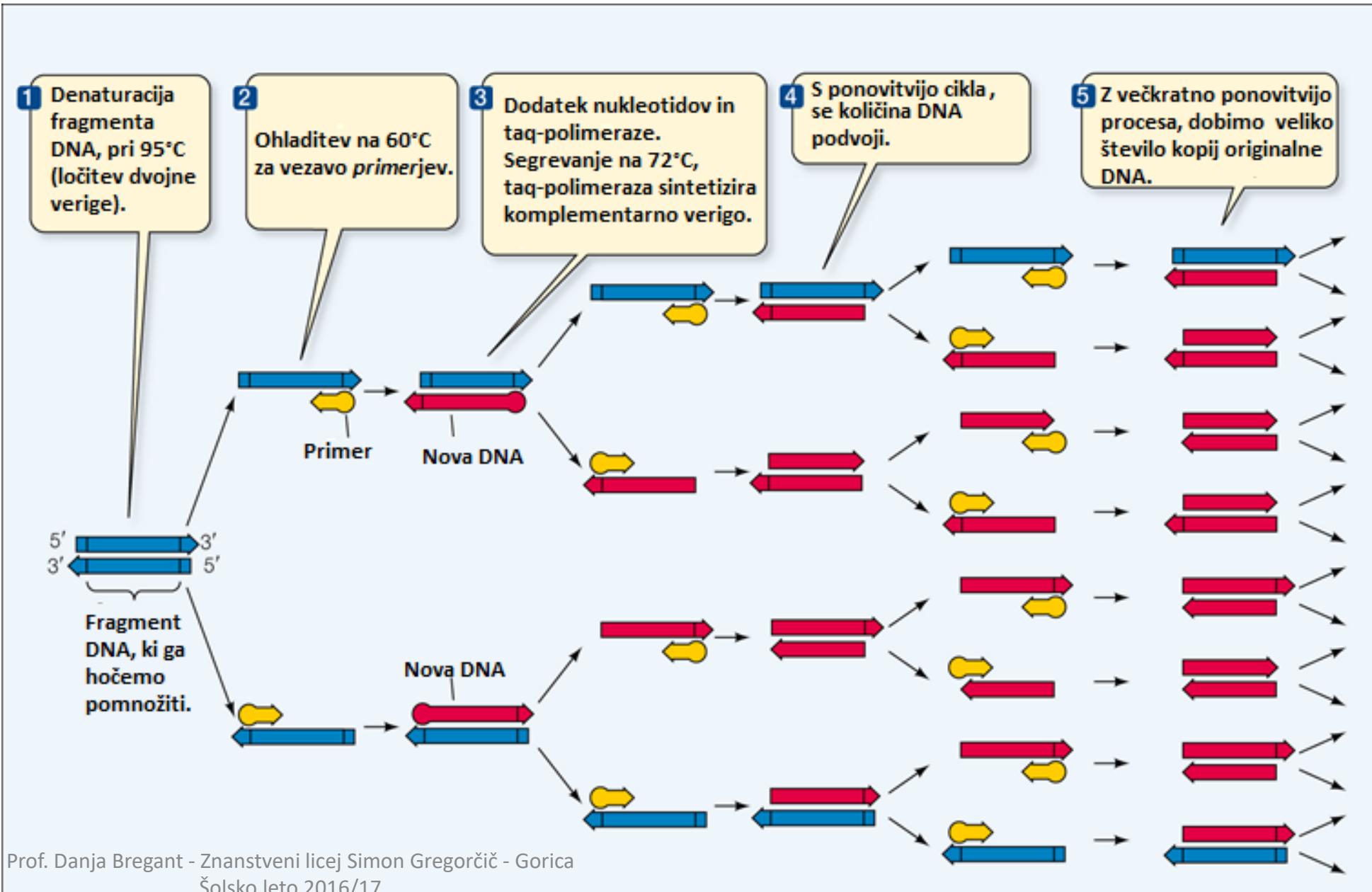
Nobelova nagrada 1993: ameriški biokemik Kary Mullis

- V verižni reakciji s polimerazo (PCR) se **ciklično ponavlja** sledeče **3 stopnje**:
 1. Denaturacija (=ločitev verig) izvorne **DNA**, ki jo želimo pomnožiti, pri **95 °C** (30 s).
 2. Ohladitev na **50 – 65 °C** za **vezavo** dveh sintetičnih oligonukleotidov (**primer**) na mesto 5' vsakega fragmenta DNA.
 3. Segrevanje na **72 °C**: polimerizacija DNA v smeri 5` – 3` (**1000 nukleotidov/min**).
- V 1-3 urah dobimo **milijardkratno pomnožitev DNA**.

Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

- Postopek je avtomatiziran, v reakcijo moramo poleg naštetih materialov dodati še **vse 4** deoksiribonukleozidtrifosfate **dNTP**, in sicer dATP, dGTP, dCTP in dTTP ter **ustrezen pufer**.
- Uporabiti moramo termostabilno **taq DNA polimerazo**.
 - Taq DNA polimeraza je značilna DNA polimeraza **termofilne bakterije *Thermus aquaticus*** in je **optimalno aktivna** pri temperaturah **70-80°C**.

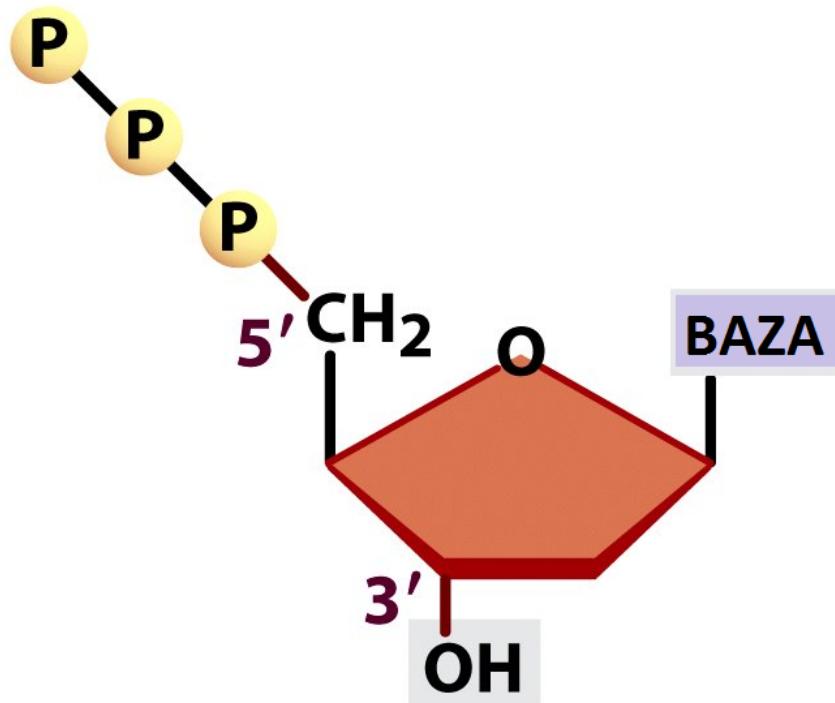
Verižna reakcija s polimerazo (PCR)



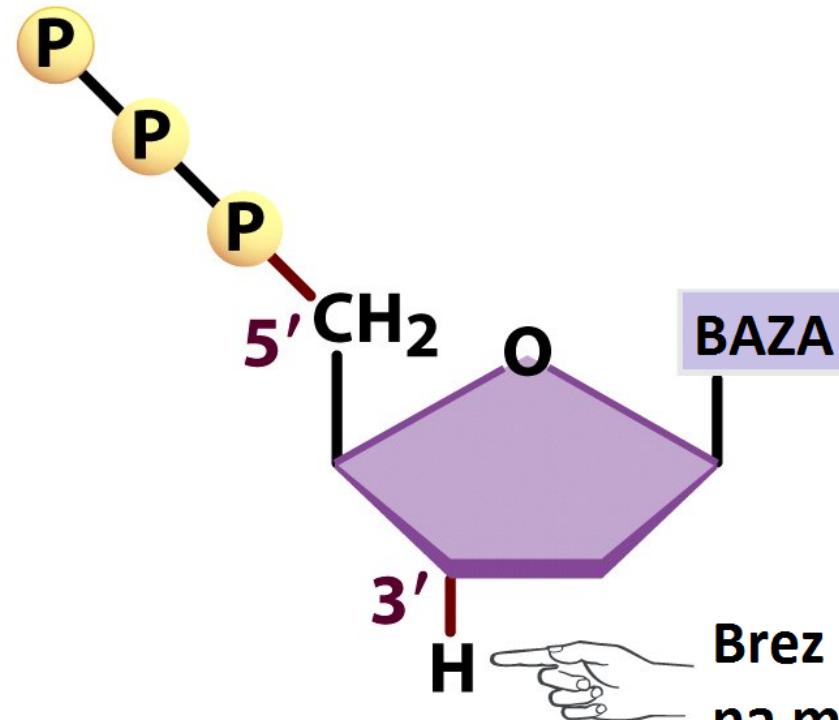
Določanje nukleotidnega zaporedja: Sangerjeva metoda

1. Pomnožimo fragment DNA z metodo PCR in ga denaturiramo (93-94°C).
2. Vzamemo 4 epruvete in jih označimo s črkami G, T, A, C.
3. V vsako epruveto damo denaturirani DNA, *primer*, nukleotide (dNTP) in DNA polimerazo.
 - V epruveto G dodamo še ddGTP (dideoksi G nukleotid)
 - V epruveto T dodamo še ddTTP (dideoksi T nukleotid)
 - V epruveto A dodamo še ddATP (dideoksi A nukleotid)
 - V epruveto C dodamo še ddCTP (dideoksi C nukleotid)
 - Razmerje med ddNTP in dNTP je 1 : 100.
 - Vsak ddNTP je markiran z različnim fluorokromom, molekulo, ki oddaja različno barvo fluorescentne svetlobe.

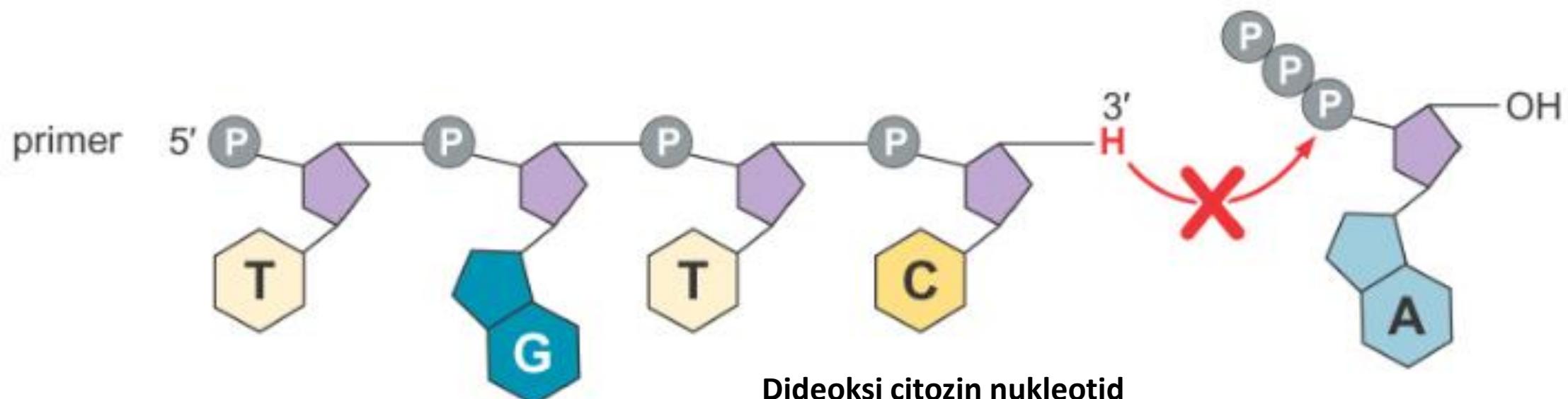
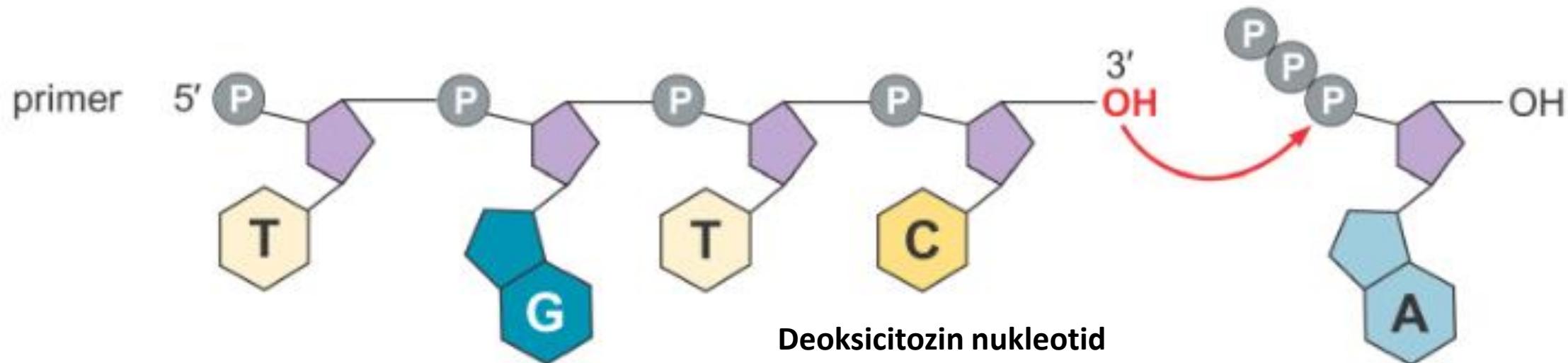
Nukleotid ddNTP onemogoča nadaljevanje sinteze DNA



dNTP omogoča
podaljševanje
verige DNA



ddNTP onemogoča
podaljševanje
verige DNA



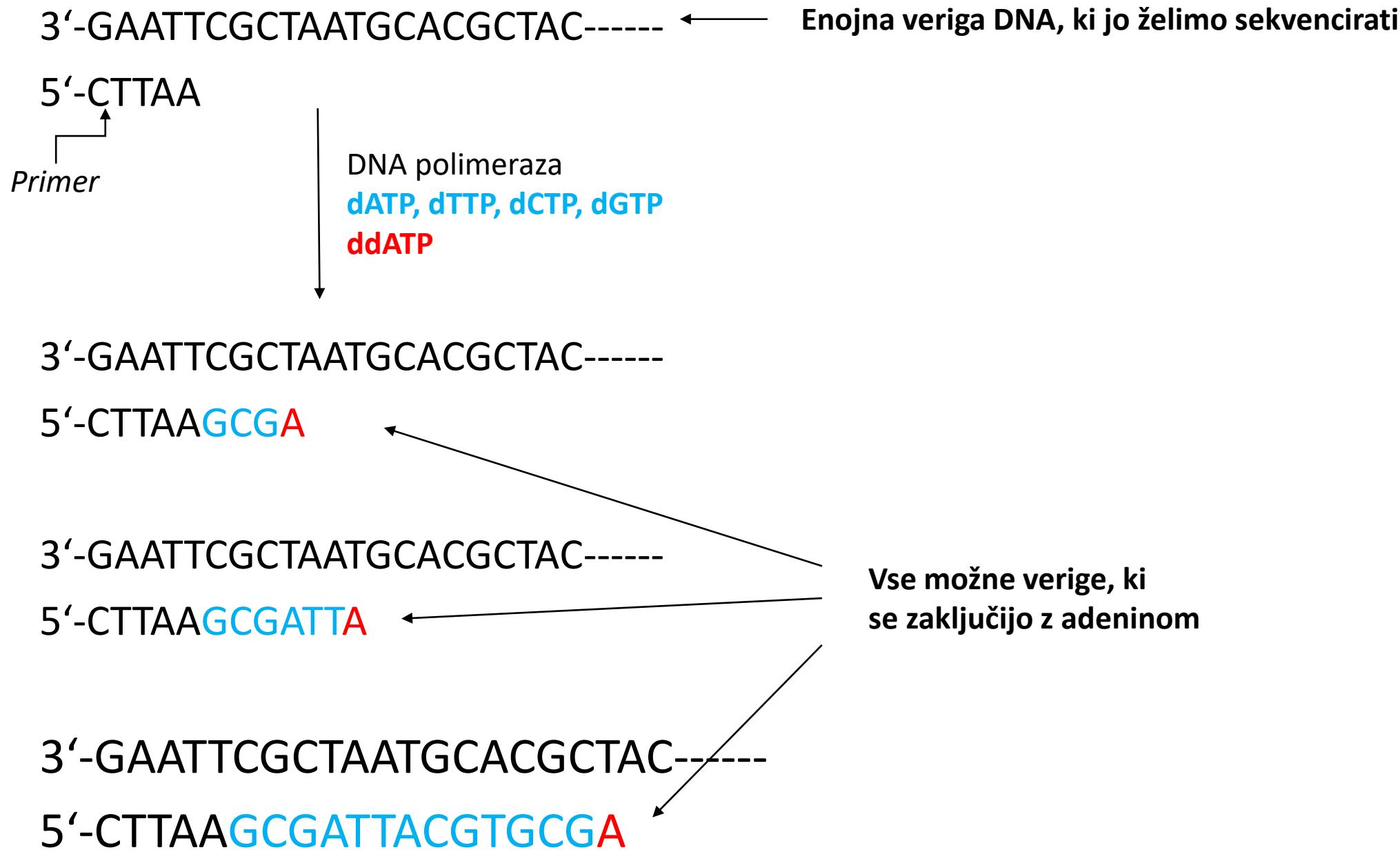
Določanje nukleotidnega zaporedja

Sangerjeva metoda

4. V vsaki epruveti se sintetizirajo različno dolgi fragmenti DNA: sinteza se prekine, ko se na verigo naključno poveže ddNTP, ki onemogoči vezavo naslednjega nukleotida.

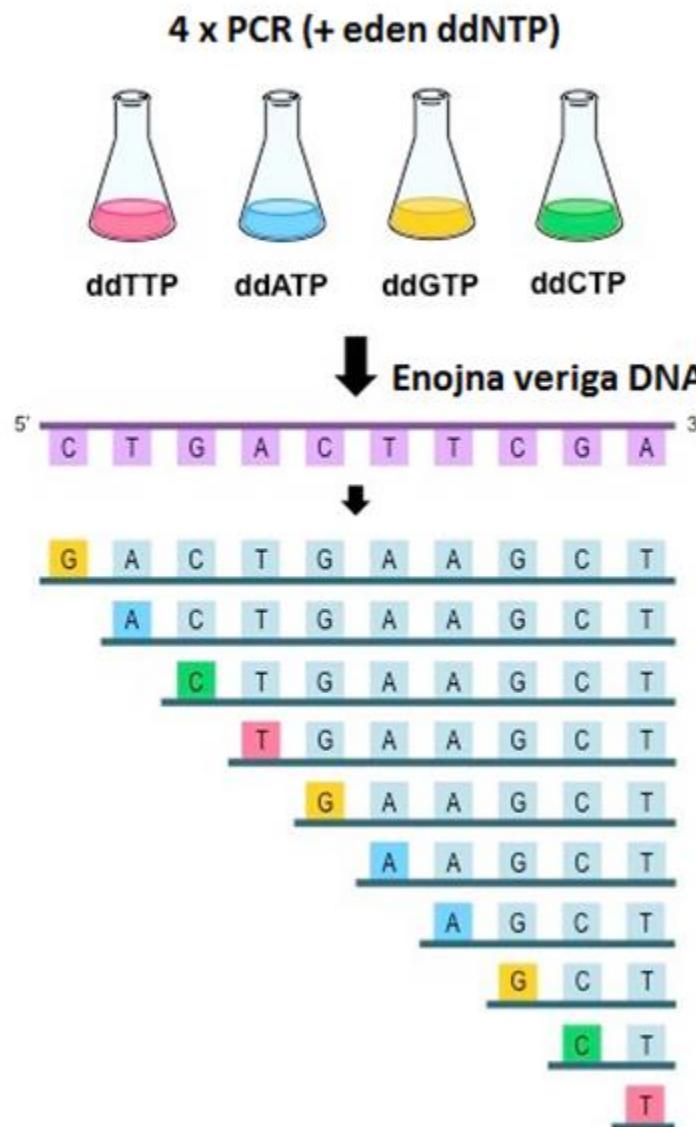
- V epruveti **G** bodo nastali vsi možni fragmenti, ki se končajo z **G**.
- V epruveti **T** bodo nastali vsi možni fragmenti, ki se končajo s **T**.
- V epruveti **A** bodo nastali vsi možni fragmenti, ki se končajo z **A**.
- V epruveti **C** bodo nastali vsi možni fragmenti, ki se končajo s **C**.

PRIMER SINTEZE FRAGMENTOV V EPRUVETI A

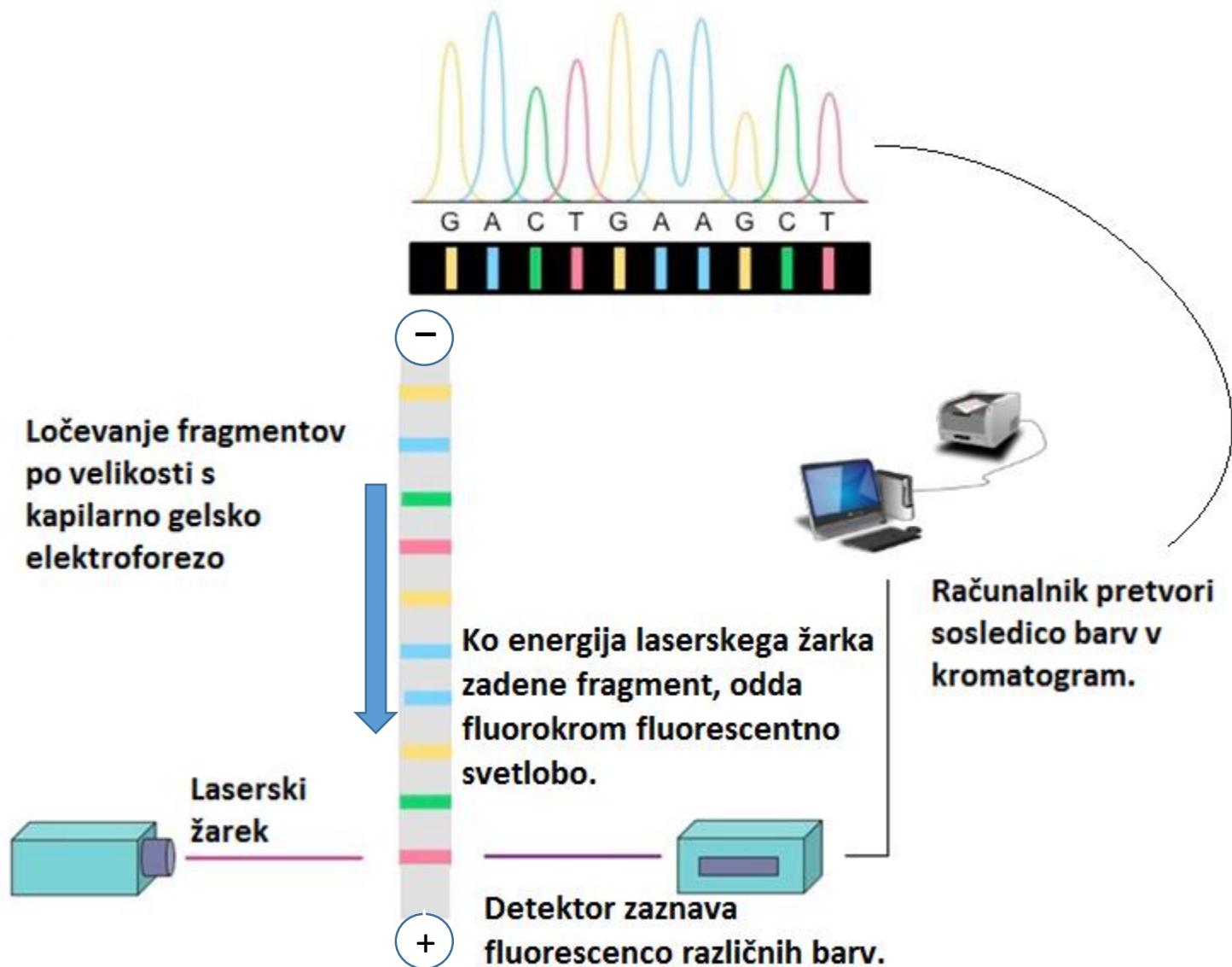


Določanje nukleotidnega zaporedja Sangerjeva metoda

5. Pripravimo **gel za elektroforezo** in ga vstavimo **v stekleno kapilaro**.
6. **Vse** dobljene **fragmente** damo **v kapilaro z gelom** in izvedemo **kapilarno elektroforezo**. **Fragmenti** se bodo ločili po **velikosti**.



Ločevanje fragmentov po velikosti s kapilarno gelsko elektroforezo



Aparatura za PCR



Prof. Danja Bregant - Znanstveni lice | Simon Gregorčič - Gorica
Šolsko leto 2016/17

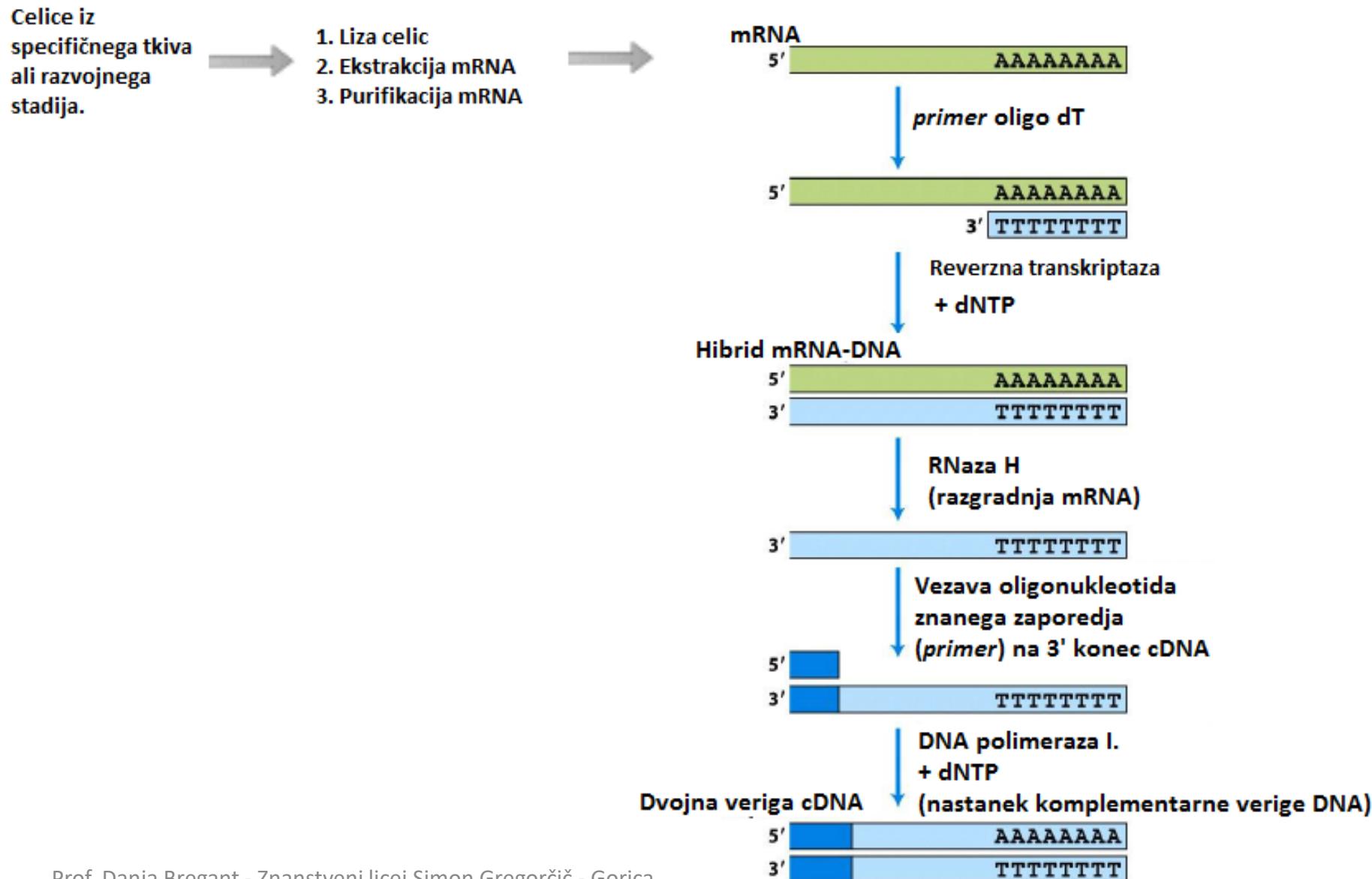
cDNA knjižnice

- cDNA molekule so molekule DNA, ki so komplementarne mRNA.
- cDNA molekule **ne vsebujejo intronov**, zato so **bolj uporabne** pri molekulskega kloniranju zapisov za proteine **kot genomska DNA**.
- cDNA knjižnice so **zbirke** molekul cDNA in so zelo **koristne** za **ekspresijo specifičnih genov posameznih tkiv**.

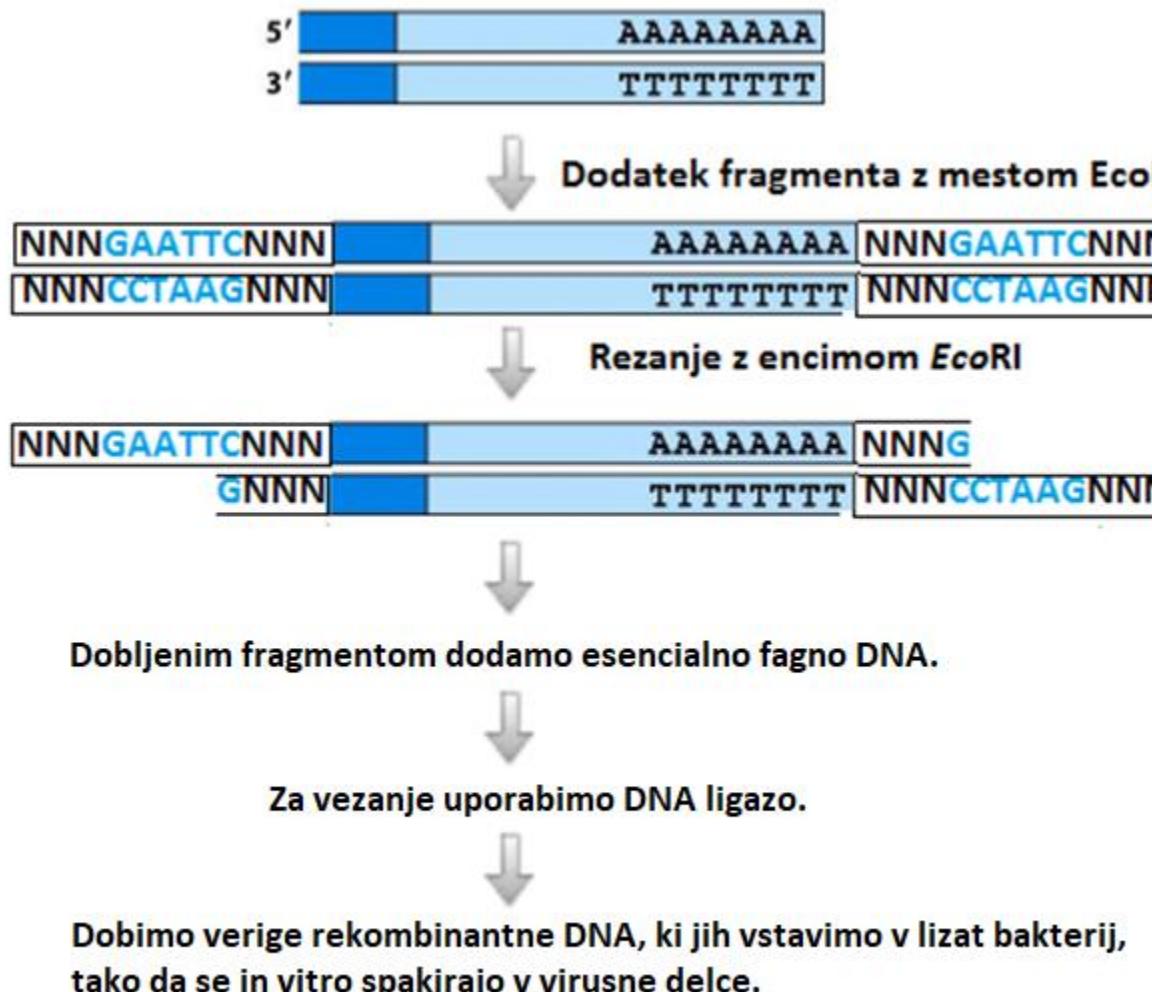
Sinteza cDNA

- Evkarijontske mRNA se lahko ločijo od ostalih molekul RNA, ker imajo **rep poli A**.
- Da se RNA lahko prepiše v dvočleno DNA, potrebujemo encim **reverzno transkriptazo**.
- Temu encimu kot matrica služi RNA, potrebuje pa tudi začetni oligonukleotid (**primer**).
- Najprej pride do nastanka **hibrida mRNA-DNA**.
- Potem **RNaza H** (encim, ki cepi samo RNA v hibridu z DNA) **razgradi RNA verigo**.
- Dodatek *primerja* na 3' konec cDNA.
- Sledi **sinteza komplementarne DNA** s **polimerazo DNA I**.

Sinteza cDNA

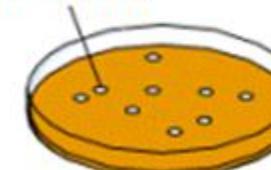


Kloniranje cDNA v vektorju (npr. v fagu λ)



Vključitev cDNA v fag λ in inficiranje *E.coli*.
Prenos na plošče s hraniščnim agarjem.

Klon λ cDNA



Izolacija klonov v liznih plakih.

Biotehnologije aplikacije rekombinantne DNA

Področja uporabe biotehnologij

- Odkrivanje
 - Določanje genetskih profilov
- Farmacevtika
 - Genska terapija
- Kmetijska biotehnologija
 - Transgene živali
 - Transgene rastline
- Okolje
 - Bioremediacija
 - Biogoriva

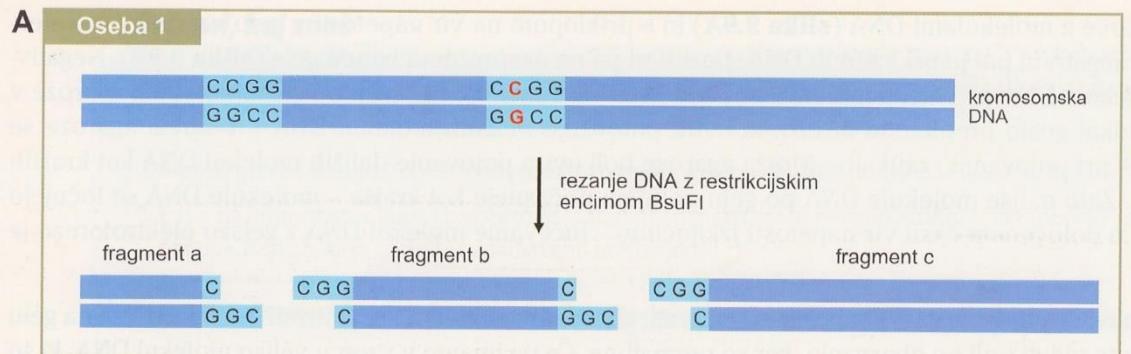
Določanje genetskega profila osebe

- Včasih rečemo, da se ljudje razlikujejo po **DNA prstnih odtisih (fingerprinting)**, saj je **zaporedje DNA** vsake osebe **edinstveno, kot njeni prstni odtisi**.
- Strokovno pa rečemo, da osebe razlikujejo po **genetskih profilih**.
- **Določanje genetskih profilov** uporablja:
 - v **forenzični** (sodni) **medicini** za določanje **identitete storilcev** kaznivih dejanj in identitete **posmrtnih ostankov**;
 - za **ugotavljanje očetovstva** in drugih **sorodstvenih odnosov** med osebami;
 - za ugotavljanje **izvora hrane** (npr. če ikre v kaviarju pripadajo vrsti ribe, ki je označena na nalepki);
 - za ugotavljanje prisotnosti **tkiv ogrožene živalske vrste** v nekem izdelku (npr. maščoba kita v lepotni kremi,...).

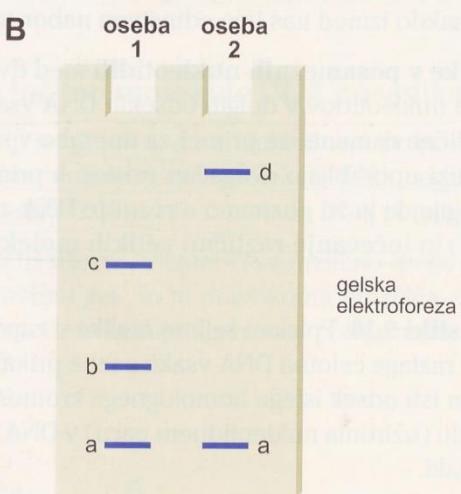
Ugotavljanje razlike DNA med dvema osebama

- Za to nalogu nam **ni treba določiti** natančnega **zaporedja** nukleotidov (analiza je možna, a predraga in dolgotrajna).
- Dovolj je da **DNA razrežemo** znotraj specifičnih zaporedij z **restriktijskimi encimi** in **ločimo** različno velike **fragmente** z gelsko elektroforezo.

Ugotavljanje razlike DNA med dvema osebama



- DNA oseb 1 in 2 se na prikazanem odseku kromosoma **razlikuje le po enem nukleotidu**, ki je prikazan **rdeče**.
- DNA obeh **razrežemo** z restričijskim encimom **BsuFI**, ki prepozna specifično zaporedje nukleotidov v molekuli DNA.
- Pri **osebi 1** sta **zaporedji za encim BsuFI dve**, pri **osebi 2** pa le **eno**.
- Pri **osebi 1** razreže encim DNA na **tri fragmente**.
- Pri **osebi 2** razreže encim DNA na **dva fragmenta**.
- Fragmente obeh oseb nanesemo na gel in izvedemo **gelsko elektroforezo**.
- Dve **osebi se razlikujeta** po **vzorcu lis** na gelu.



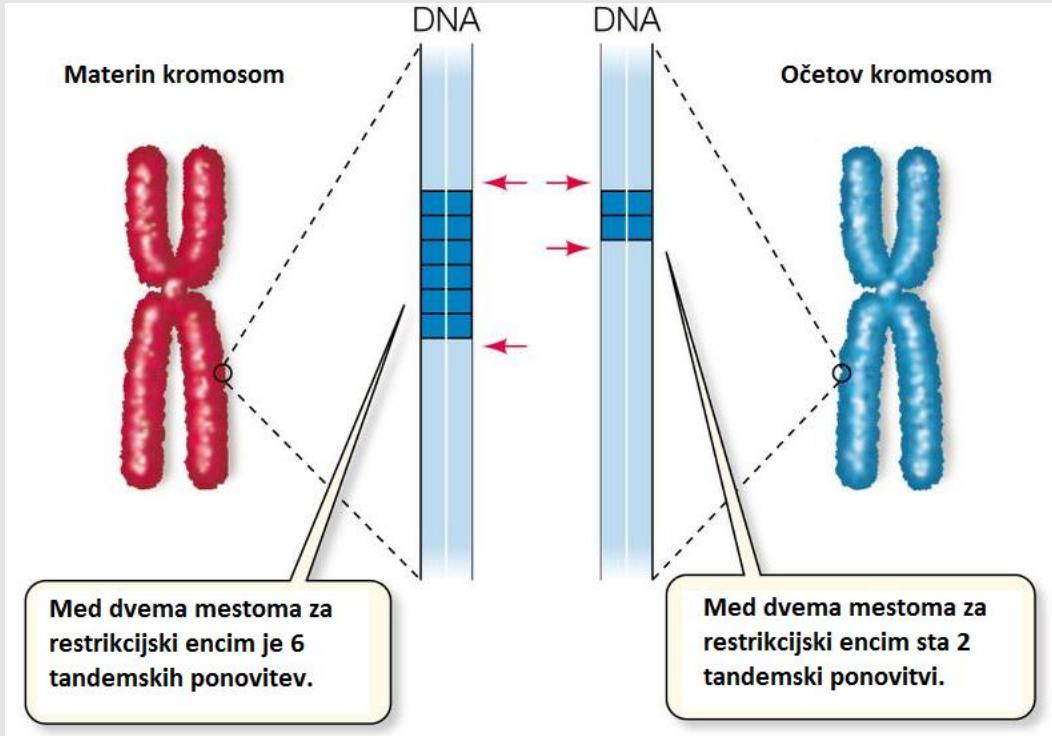
Ugotavljanje razlike DNA med dvema osebama (novejša metoda: razlika v tandemskih ponovitvah)

- Novejša metoda za razlikovanje oseb na podlagi njihovih genetskih profilov temelji na dejstvu, da se ljudje razlikujejo po dolžini določenih odsekov DNA, ki jih imenujemo **kratke tandemse ponovitve** (*STR – short tandem repeats*) ali mikrosateliti (npr.: GATA|GATA|GATA|GATA, ali ACAT|ACAT|ACAT|ACAT|ACAT).
- Tandemske ponovitve so **2 – 5 bp** dolga zaporedja v DNA, ki so na določenih mestih v genomu nanizana drugo za drugim v različnem številu ponovitev.
- Mesta v genomu, ki vsebujejo tandemse ponovitve, imenujemo **genetski označevalci**.



- Ljudje se razlikujejo po številu kratkih tandemskih ponovitev znotraj genetskih označevalcev.
- Genetski označevalci imajo torej izrazit polimorfizem po dolžini (=v različnih osebah so posamezni označevalci različno dolgi, ker vsebujejo različno število tandemskih ponovitev), zato jih lahko uporabimo za razlikovanje genetskega profila dveh oseb.

Ugotavljanje razlike DNA med dvema osebama (novejša metoda: razlika v tandemskih ponovitvah)

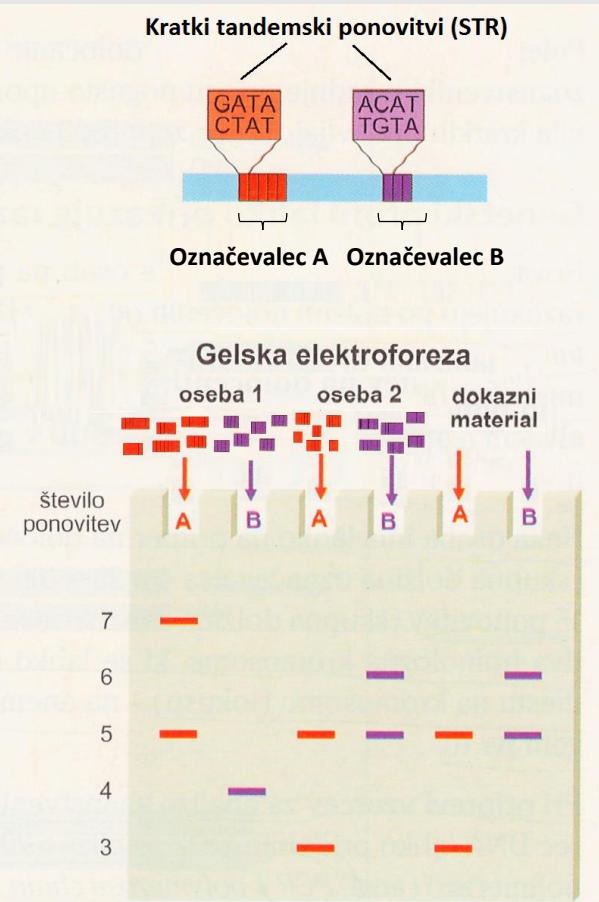
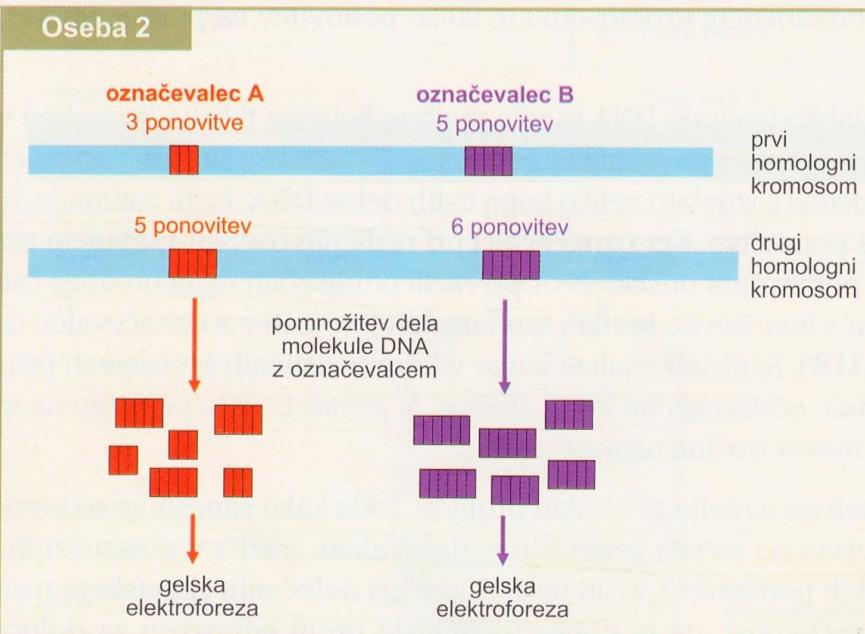
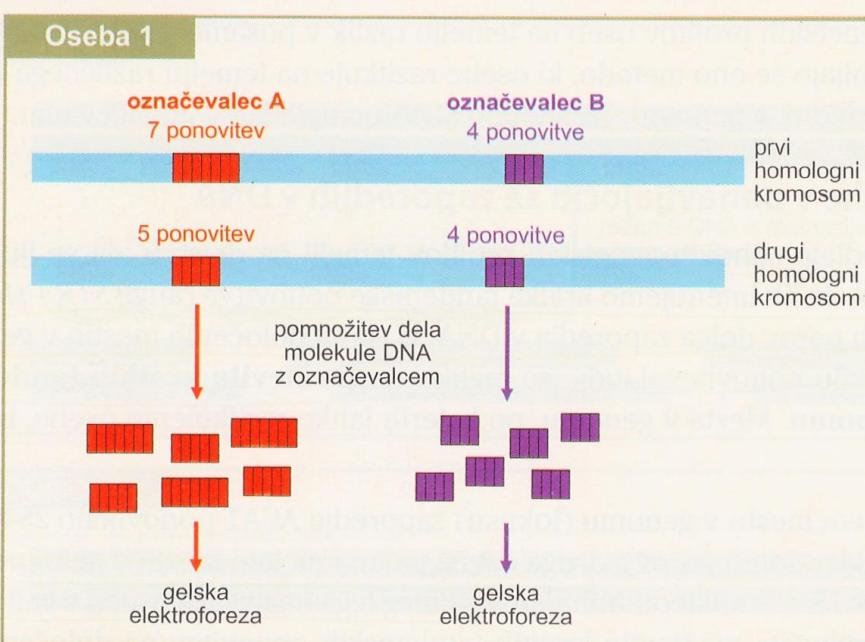


- Neka oseba ima lahko npr. na enem locusu določenega kromosoma zaporedje GATA ponovljeno 6-krat, na istem locusu homolognega kromosoma pa 2-krat.
- Druga oseba ima pa npr. na istem locusu zaporedje GATA ponovljeno 3-krat, na homolognem kromosому pa 5-krat.

Primer uporabe genskih označevalcev v forenziki

- Iz celičnega vzorca **dokaznega materiala** in iz celičnih vzorcev **osumljencev izoliramo DNA**.
- Vsak vzorec damo v **eno epruveto**.
- Z **restriktijskimi encimi izrežemo** 16 različnih označevalcev v celotnem genomu.
- Vsaka oseba ima po dva označevalca iste vrste na homolognih kromosomih.
- Z verižno reakcijo s polimerazo (**PCR**) **pomnožimo** dobljene **označevalce**.
- Za določitev **dolžine** vsakega označevalca uporabljam **gelsko elektroforezo**.
- **Dolžine označevalcev** vsake osebe **primerjamo** z dolžino označevalcev **dokaznega materiala**.

Primer uporabe genskih označevalcev v forenziki



Oseba 2 ima za oba označevalca enako število ponovitev kot dokazni material. Iz tega sledi, da izvira dokazni material iz njenih celic.

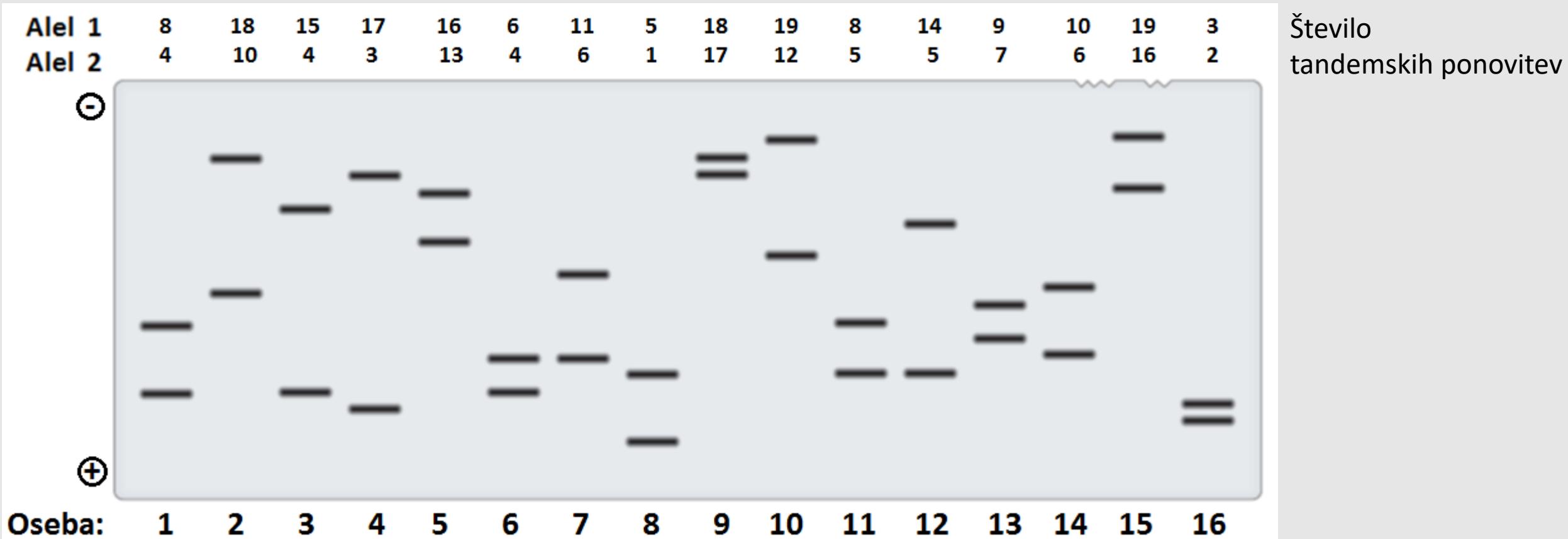
Oseba 1 je homozigot za označevalca B, zato se pojavi ena sama lisa.

Primer obravnava dva označevalca, A in B, ki ležita na istem kromosому.

Zanesljivost identifikacije

- Zanesljivost identifikacije je odvisna od števila genetskih označevalcev, ki jih uporabljam.
- Če uporabljam npr. 13 označevalcev, je verjetnost, da bi imeli dve osebi enak genetski profil med 1 proti 10 milijard in 1 proti več 1.000 milijard.

DNA fingerprinting (=genetski profil) 16 oseb

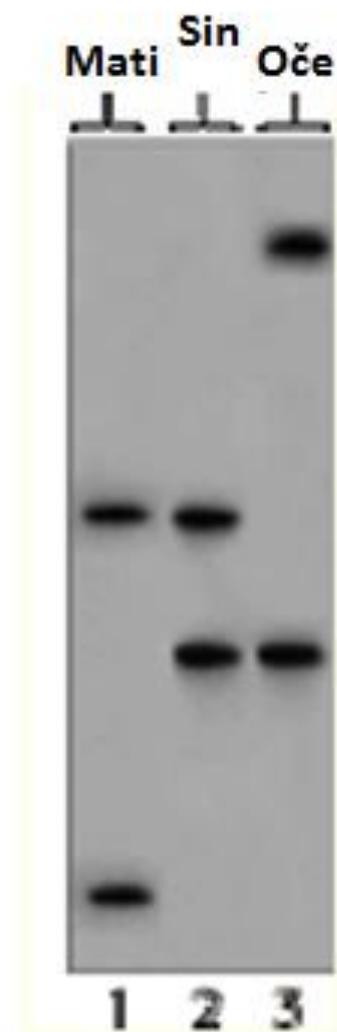


- Fingerprinting 16 oseb, ki niso v sorodu in se razlikujejo po številu tandemskih ponovitev STR izbranega označevalca.
- Gelska elektroforeza evidentira 19 različic STR od najkrajše (1) do najdaljše (19).
- V vzorcu niti dve osebi nimata enakega števila tandemskih ponovitev.

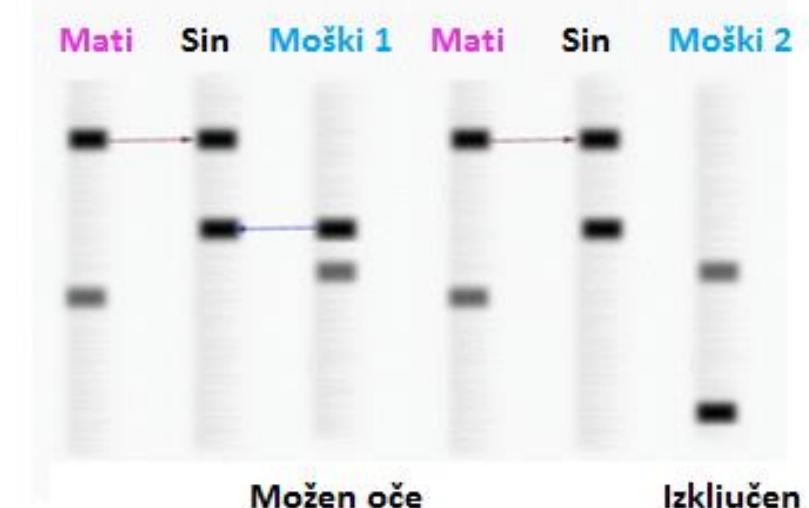
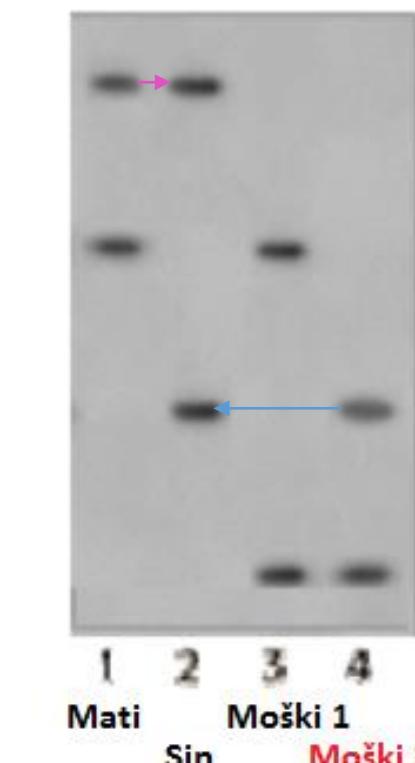
Primerjava genetskih profilov za dokazovanje očetovstva

- Genetski profili omogočajo tudi **zelo zanesljivo dokazovanje očetovstva**.
- **Včasih** so očetovstvo ugotavljali na temelju **primerjave krvnih skupin**, vendar so bile **tovrstne metode** dokaj **nezanesljive**.
- Pri primerjavi genetskih profilov **upoštevamo**, da **otrok polovico kromosomov** prejme **od matere, polovico pa od očeta**.
- Zato ima **polovico genetskih označevalcev enakih kot mati, polovico pa kot oče**.
- **S primerjavo vzorcev DNA otroka, matere in domnevnega očeta lahko zelo zanesljivo potrdimo ali ovržemo očetovstvo.**

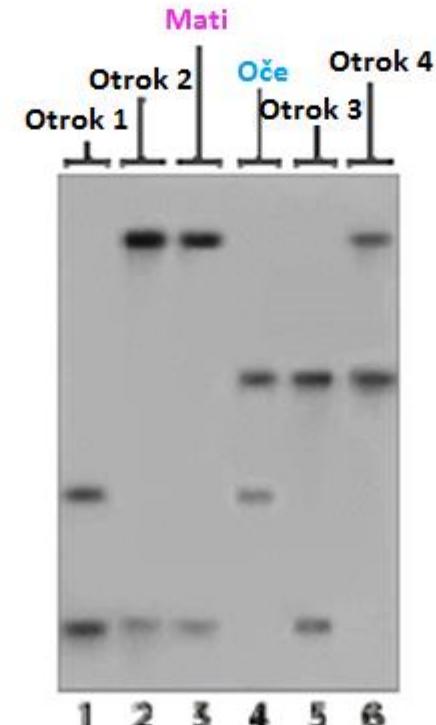
DOKAZOVANJE OČETOVSTVA



KATERI IZMED DVEH MOŠKIH JE MOŽEN BIOLOŠKI OČE?



GENETSKI PROFIL DRUŽINE S 4 OTROKI. KATERI OTROK JE POSVOJEN?



Odgovor:
Otroka 2 je oče posvojil

Projekt Človeški genom

- **Projekt Človeški genom** je bil uradno ustanovljen oktobra 1990 v ZDA.
- Gre za mednarodni javno financiran projekt, namen katerega je bil **določiti celotno zaporedje baznih parov človeškega genoma**.
- Projekt se je zaključil leta 2003, ko so razbrali celotno zaporedje haploidnega človeškega genoma (nad **3 milijarde baz**) ter določili okoli **1500 genov**, odgovornih za **različne bolezni**.
- Glavna **težava** pri odkrivanju povezave med geni in boleznimi je ta, da **običajno vpliva na eno bolezen več genov**.
- Za projekt se je doslej porabilo približno **10 milijonov ameriških dolarjev**.

Človeška genska terapija ponuja nove perspektive v zdravljenju genetskih bolezni

- Genska terapija je ena izmed novih metod zdravljenja, ki jih znanstveniki še razvijajo.
- Genska terapija je zdravljenje pirojenih in pridobljenih gensko pogojenih bolezni z:
 - nadomestilom okvarjenega gena z zdravim
 - popravilom gena
 - inaktivacijo gena (vključitev onkosupresorjev v rakaste celice, ki bi povzročili apoptozo)

Izvajanje genske terapije

- Do sedaj se genska terapija **izvaja samo na somatskih celicah v fazi delitve** ali v fazi mirovanja.
 - Če hočemo, da bodo **učinki genske terapije trajni**, moramo **vnesti normalni alel** v tiste celice, ki se delijo vse življenje.
- Zaradi **možnosti zlorabe**, predvsem pa zaradi **nedostopnosti celic** se genska terapija **ne izvaja na zarodnih celicah**.

Genska terapija somatskih celic

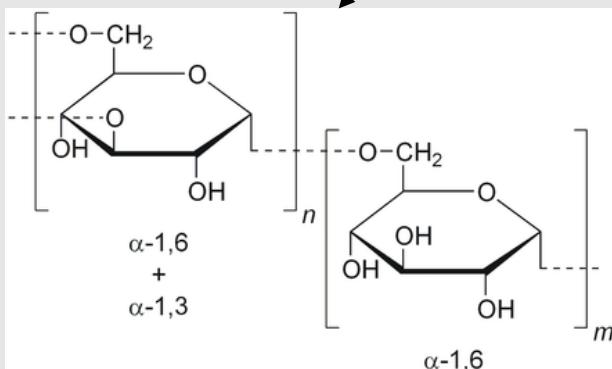
- **Genska terapija somatskih celic** je lahko dveh vrst:
 - *ex vivo*
 - Celice odvzamemo iz telesa, jih spremenimo s pomočjo virusnega ali nevirusnega vektorja, jih gojimo v kulturi in reimplantiramo v telo.
 - *in vivo*
 - Celic ne odvzamemo iz telesa, pač pa jih spremenimo v telesu s pomočjo virusnega ali nevirusnega vektorja .

Genska terapija *ex vivo*

- Izvaja se v vseh primerih, kjer celice lahko vzamemo iz telesa, jih gojimo in jih reimplantiramo v telo (npr. celice kostnega mozga, krvne celice).
- Gen vključimo v celično kulturo
 - z metodo **transfekcije**
 - s pomočjo **virusa** ali drugega **nanodelca**.

Vključitev gena s transfekcijo

- **Transfekcija** je **metoda direktne vključitve DNA v celično kulturo**. Izvaja se na različne načine:
 1. DNA najprej pomešamo s **$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$** in **DEAE dekstranom**, nato vse skupaj dodamo celični kulturi.
 - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ fluidificira celično membrano in tako omogoči endocitozo
 - DEAE dekstran nevtralizira negativni naboj membranskih beljakovin.
 - *Ex vivo* je sistem učinkovit, *in vivo* pa ne.

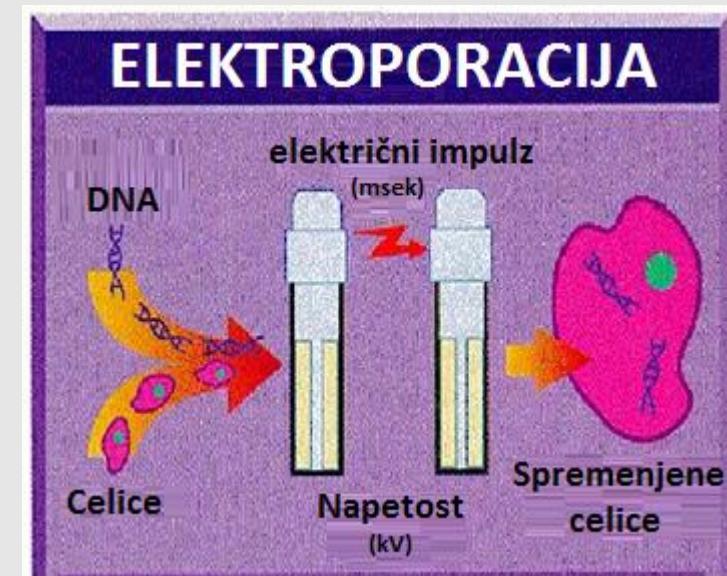


Vključitev gena s transfekcijo

2. DNA vbrizgamo v celico z **mikroinjekcijo**
(nekatere celice so za to opravilo premajhne).

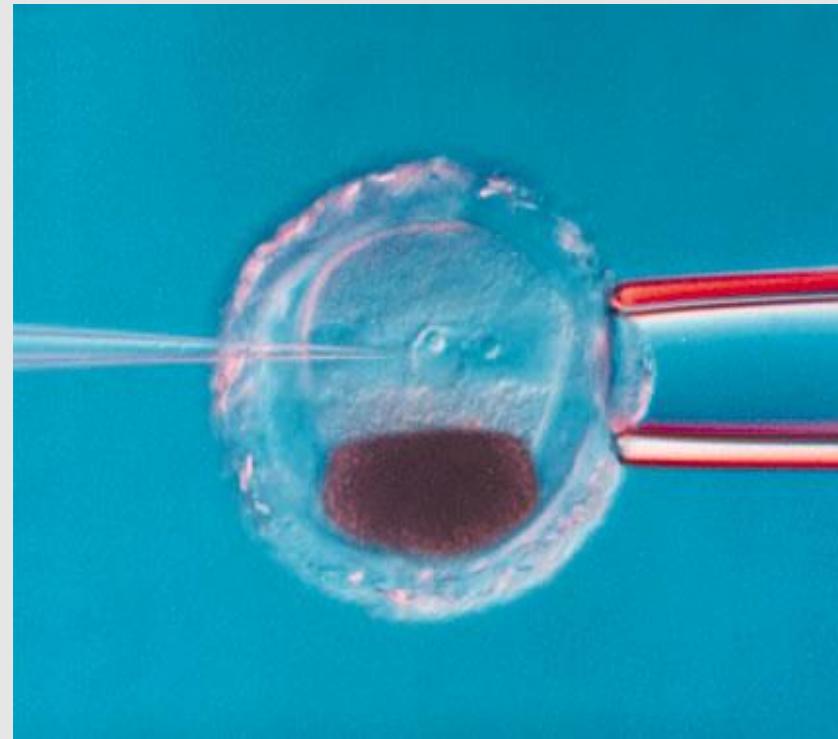


3. S pomočjo **električnega toka** povzročimo v celičnih membranah nastanek **hidrofilnih por**, skozi katere bo DNA vstopila (**elektroporacija**).
 - Nekateri raziskovalci trdijo, da lahko **elektroporacija** celico trajno poškoduje in tako povzroči **težko predvidljive kolateralne učinke**.



Genska terapija *in vivo*

- Izvaja se v vseh primerih, kjer celic ne moremo odvzeti iz telesa, jih gojiti in jih reimplantirati v telo (npr. **možganske celice**, **srčne celice**, **celice večine notranjih organov**).
- Metoda je ekonomsko dostopna, a je njen izvajanje težavno.
- Gen vključimo v **viruse** ali druge **nanodelce** (liposome, polikatione).
- **Viruse ali nanodelce injiciramo v organizem**.



Liposom z vključenim genetskim materialom

Vrste vektorjev in njih uporaba

- **Vektor** je **najpomembnejši člen** v genski terapiji in doslej še vedno **predstavlja največji problem**.
- Najbolj uporabni so **virusni vektorji**, ki jim pred vgradnjo terapevtske DNA iz genoma odstranimo gene, ki jih virus potrebuje za svojo replikacijo.
- Uporabljamo torej **nepopolne viruse**.
- Virus pa mora **ohraniti sposobnost infekcije celice in izražanja heterolognega gena**, kar pomeni, da virusni genom pride v jedro tarčne celice, da se prepiše in prevede.

Značilnosti dobrega vektorja

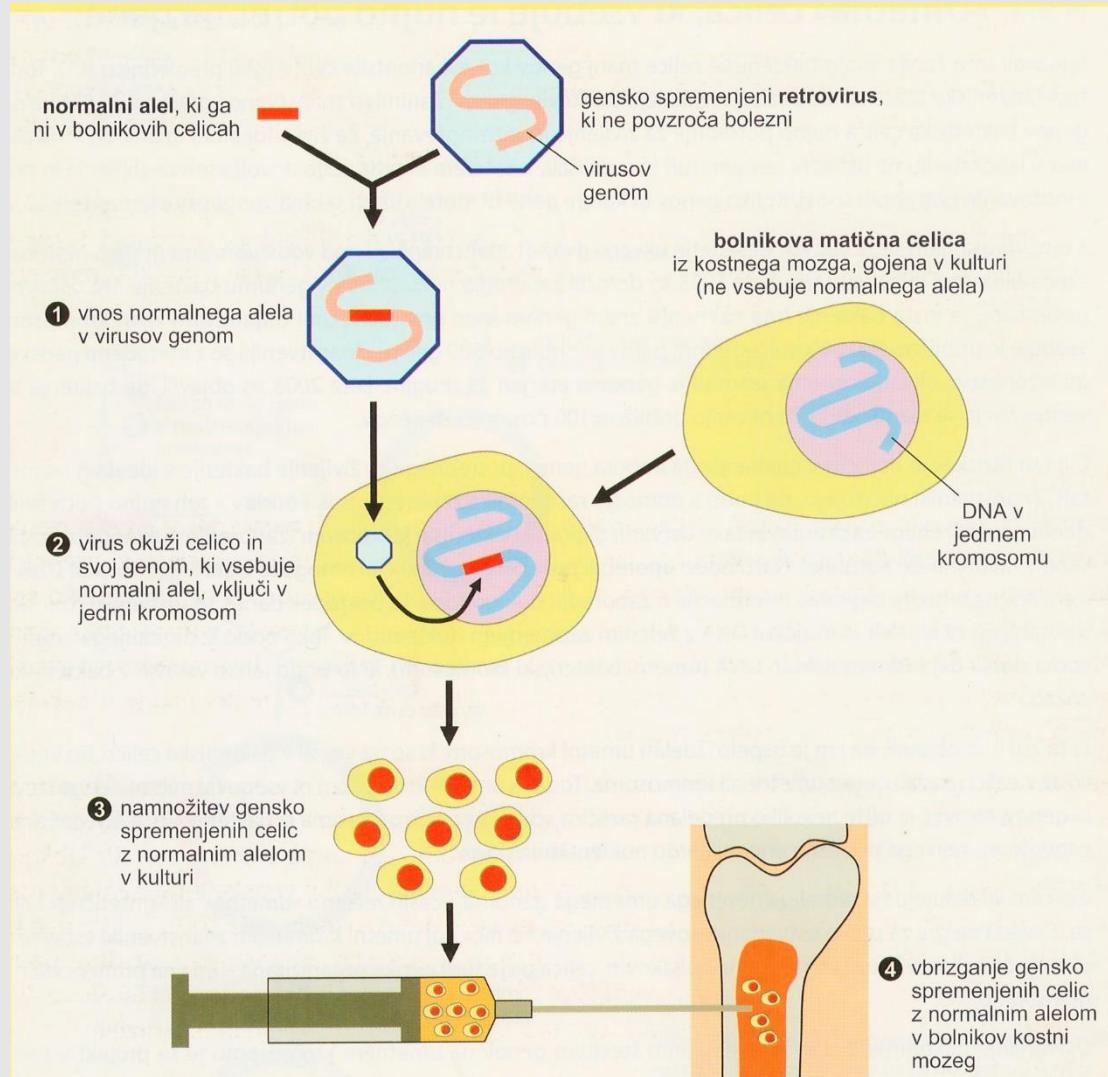
1. **Stabilnost**: možnost vgraditve terapevtskega gena v vektor.
2. **Tropizem**: sposobnost vezave na tarčno celico.
3. **Selektivnost**: visoko specifičnost izbiranja tarčnih celic.
4. **Neimunogenost**: ne sme sprožiti imunskega ali vnetnega odgovora.
5. **Velikost**: mora biti sposoben vezati zadostno količino terapevtskega dednega materiala.
6. **Neekspresivnost**: ne sme replicirati svojega lastnega genoma.
7. **Lahek dostop**: vektor mora imeti lahko dostopna mesta vstopa v organizem.

Primer genske terapije *ex vivo*:

Zdravljenje Deficita adenozin deaminaze (deficit ADA)

- **Deficit ADA** je huda otroška bolezen, ki ima za posledico popolno pomanjkanje imunitarne odpornosti.
- Gre za **recesivno avtosomno bolezen**, za katero je značilno **pomanjkanje gena ADA**, ki je odgovoren za proizvodnjo **encima ADA** v **limfocitih T**.
- Otrok lahko preživi samo v popolnoma sterilnem okolju.
- ADA je **edina bolezen**, ki so jo doslej **uspešno zdravili z gensko terapijo**.
- Možna postopka sta dva:
 - Odvzem kostnega mozga, **vnos normalnega gena** v matične celice, reimplantacija matičnih celic z normalnim genom.
 - **Odvzem krvi, vnos normalnega gena** v limfocite T, reimplantacija limfocitov T z normalnim genom.

Primer genske terapije *ex vivo*: Zdravljenje Deficita ADA



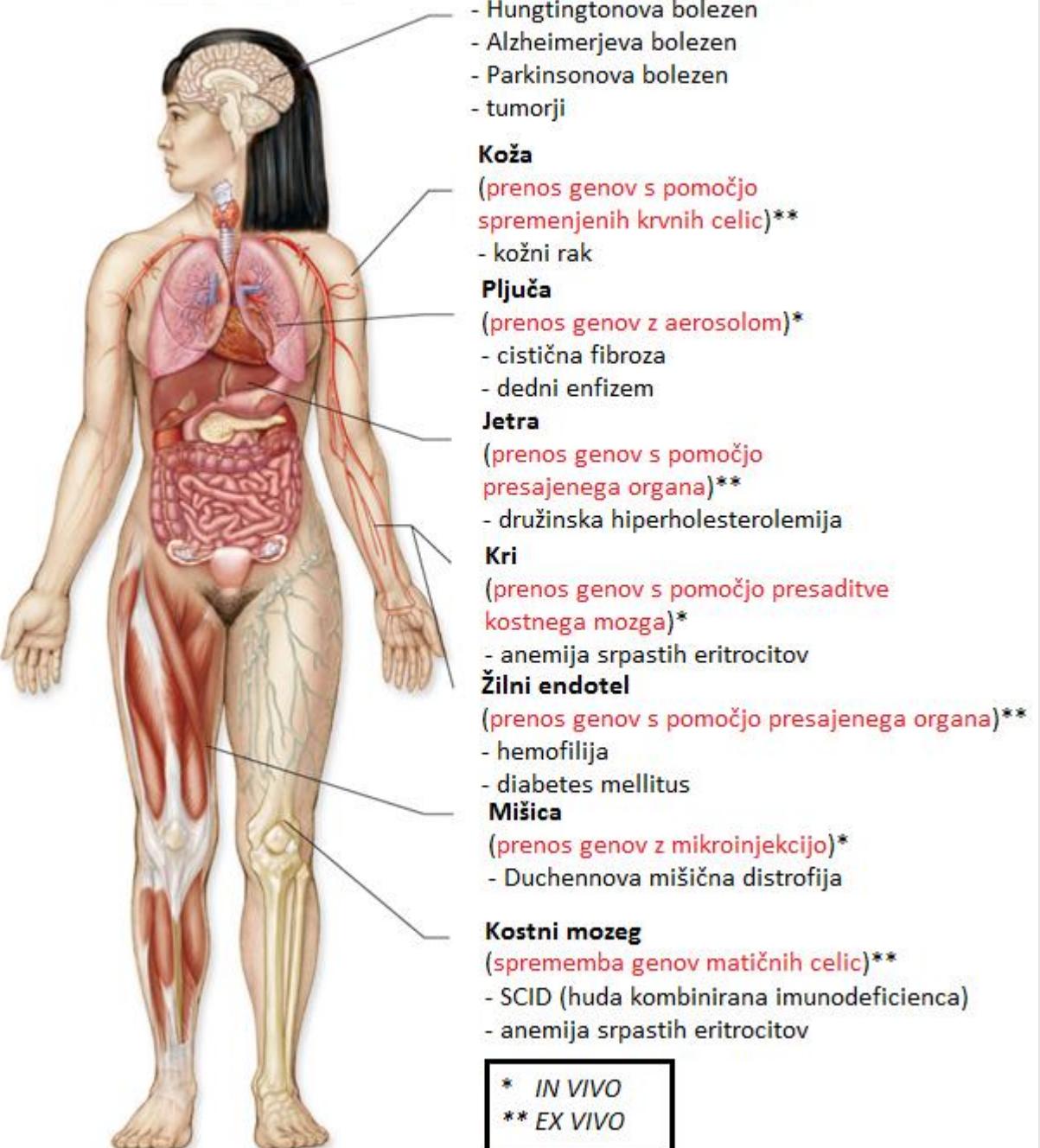
- Postopek:

- Vključitev normalnega alela v genom retrovirusa.
- Odvzem celic iz kostnega mozga.
- Okuženje celic z retrovirusom → rekombinacija → zamenjava nenormalnega alela z normalnim.
- Vbrizganje gensko spremenjenih celic v bolnikov kostni mozeg.

Pogoji za uspešnost genske terapije

- Genska terapija je **uspešnejša pri monogenskih boleznih**, se pravi pri tistih boleznih na katere vpliva en sam gen in je **vpliv okolja minimalen**.
- Pri bolj kompleksnih **poligenskih boleznih** in pri katerih je **vpliv okolja znaten** pa genska terapija zaenkrat **nima veliko uspeha**.
- Za uspešno gensko zdravljenje so potrebni naslednji pogoji:
 - terapevtski **gen** mora biti **kloniran**
 - **poznati** moramo njegovo **nukleotidno zaporedje**
 - **razumeti** moramo **način** njegovega **izražanja**
 - imeti moramo **primeren vektor**
 - **celice**, ki jih zdravimo morajo biti **dostopne**
 - **spremenjene celice** morajo imeti selektivno prednost pred nespremenjenimi: **večjo stabilnost** in **daljšo življenjsko dobo**

Potencialne možnosti zdravljenja z gensko terapijo v prihodnosti



Gensko spremenjene živali

- Znanstveniki razvijajo postopke, kako bi lahko razvili npr.
 - črede goveda, ki bi v mleko izločale zdravilne učinkovine
 - ovce, ki bi v mleko izločale faktorje za strjevanje krvi.
- Postopkom **izdelovanja zdravil** v živalskih farmah pravimo **pharming**.

Metode ustvarjanja gensko spremenjenih živali

- Za ustvarjanje gensko spremenjenih živali je potrebna **vključitev** ustreznega **gena v zarodek**.
- Postopek izvajajo na dva načina:
 - z **mikroinjiciranjem gena v zigoto**
 - z **implantacijo** spremenjenih zarodnih matičnih celic (ZMC) v **blastocisto**.

1. Mikroinjiciranje gena v zigoto

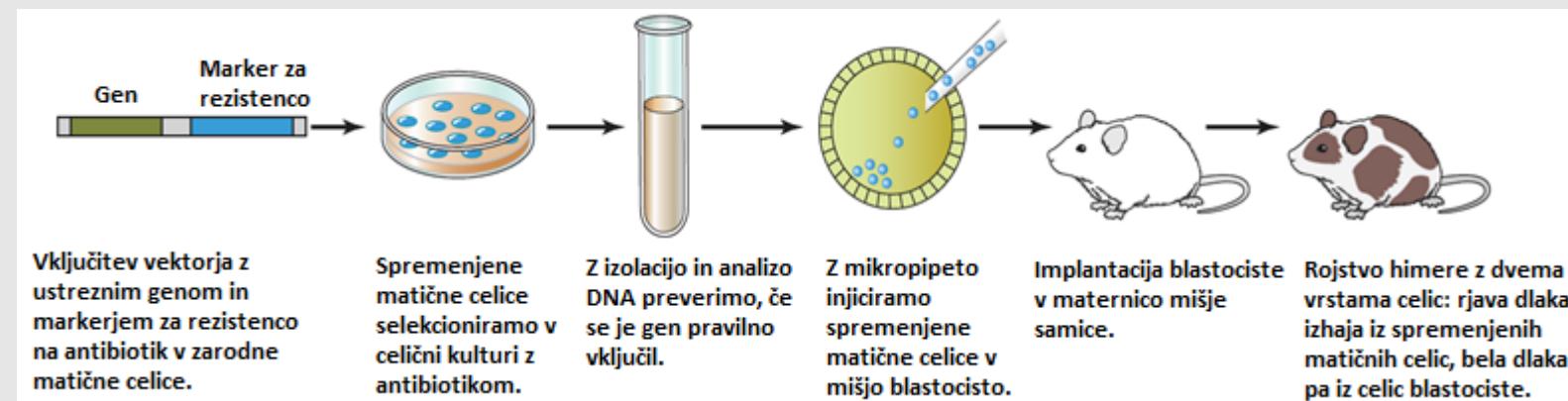
- Z **mikropipeto** vključimo vektor z ustreznim genom v jedro zigote.
- Gen se integrira v DNA zigote in bo prisoten **v vseh celicah organizma**.



- Iz zigote se razvije zarodek, ki ga implantiramo v maternico mišje samice, ki bo mladiča skotila.

2. Implantacija spremenjenih zarodnih matičnih celic (ZMC) v blastocisto

- Vektor z ustreznim genom in markerjem za rezistenco na antibiotik vključimo v **zarodne matične celice**.
- Spremenjene matične celice selekcioniramo v celični kulturi z antibiotikom.
- Potem ko smo izolirali in analizirali njihov DNA, injiciramo spremenjene matične celice v blastocisto, ki jo potem implantiramo v maternico mišje samice.



Transgene živali v raziskovalne namene

- Poskusnim živalim znanstveniki **deaktivirajo** kakšen **gen** zato, da bi spoznali njegovo vlogo. Te živali so znane pod imenom "**knock out**".
- Živalim z **dodanim genom** pa pravimo "**knock in**".
- Miške **knock out** in **knock in** omogočajo proučevanje **efekta genov na mnoge bolezni**, od genetskih bolezni do rakastih obolenj.
- Z vidika **ljubiteljev živali** je seveda **izkoriščanje živali v raziskovalne namene** etično nedopustna.

Gensko spremenjene rastline (GSO)

- Začetek razvoja GSO sega v 80. leta 20. stoletja.
- Prva komercialno gojena GS rastlina je bil paradižnik **Flavr Savr**, ki je prišel na tržišče v ZDA leta **1994**, čigar **plodovi se mehčajo počasneje** kot plodovi navadnega paradižnika (odstranitev gena za encim, ki razkraja celične stene).
- V naslednjih letih so začeli gojiti še **sojo**, **koruzo**, **bombaž**, **oljno repico**, **riž**, **pšenico**, **krompir**, **sončnico** in **peso**.



Pozitivne lastnosti GSO

- Izboljšanje **zoritvenih procesov** (npr. paradižnik Flavr Savr);
- odpornost na **herbicide**;
- odpornost na **stresne situacije** (mraz, slanost, suša);
- odpornost na **patogene** organizme (viruse, bakterije, glive);
- izboljšanje **hranilne vrednosti** (zlati riž z β -karotenom, GSO krompir vsebuje manj asparagina, aminokisline, iz katere se pri cvrtju tvori rakotvorni akrilamid);
- produkcija **rikombinantnih proteinov** (encimi, protitelesa, antigeni za cepiva).

Zlati riž

- V revnejših državah, v katerih je riž glavna hrana velikih skupin prebivalstva, je **pomanjkanje vitamina A resen zdravstveni problem**, ki **vsako leto povzroča oslepitev 500.000 otrok**.
- Riževa zrna namreč ne vsebujejo β -karotena, iz katerega človeško telo izdeluje vitamin A.
- Znanstveniki so z vnosom tujih genov vzgojili **zlati riž**, ki vsebuje **velike količine β -karotena**.



Kljub temu, da so nekatere lastnosti GS rastlin potencialno boljše, so dvomi o njihovi neoporečnosti na človeka in na okolje še zelo aktualni.

Zakaj je veliko ljudi proti uporabi GSO v kmetijstvu in prehrani?

- Ker jih skrbijo **nepredvidljivi stranski učinki uživanja GS** poljščin (predvsem **možnost alergijskih reakcij** zaradi sinteze novih beljakovin, ki jih telo ne prepozna).
- Ker **lahko GS rastline oplojujejo tudi običajne rastline**, s tem pa je **ogroženo semenarstvo in ekološko kmetovanje**.
- Ker so ti procesi neobvladljivi, saj **veter raznaša cvetni prah in semena kilometre daleč**.
- Ker njihovo razširjanje **omejuje biotsko pestrost na Zemlji**.
- Ker **škodljivi učinki GSO na človeka niso dolgoročno raziskani**.
- Ker **imajo od GSO koristi samo in izključno proizvajalci GSO, kmetje in potrošniki** nimamo nikakršnih koristi.

Zakaj je veliko ljudi, proti uporabi GSO v kmetijstvu in prehrani?

- Ker se je razvil **monopol velikih proizvajalcev GS semen**.
- Ker **ni mogoče predvidevati posledic**, ki jih lahko GSO povzročijo **okolju** (**toksin Bt**, ki nastaja v listih in omogoča **zastrupitev metuljevih gošenic**, **se sprošča tudi v zemljo**, česar znanstveniki niso predvideli in **lahko negativno vpliva na talne nevretenčarje**.

**Izjava dr. Marka Debeljaka,
predavatelja ekologije na Univerzi v Novi Gorici, sicer
zaposlenega na Institutu Jožef Stefan**

»Ljudi je strah stvari, ki jih ne poznajo, posebno, če čutijo, da jim te ogrožajo zdravje in okolje, v katerem živijo. Zato je pri odnosu splošne javnosti do gojenja gensko spremenjenih organizmov in do njihove uporabe v prehrani živali in ljudi povsem normalno, da pride do pojava splošnega dvoma in negotovosti ter do bolj ali manj prikritega strahu. To na žalost lahko pomeni dvoje: da znanost ni uporabila pravega pristopa pri obveščanju javnosti o GSO ali da ne razpolaga z dovolj trdnimi dokazi o zdravju in okolju neškodljivih vplivih GSO.«

Kaj je res o GSO – Kaj ni res o GSO

Vir: knjižica Boruta Bohanca in Miša Alkalaja, ki jo je nedavno izdala Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani

GSO vsebujejo gene za odpornost proti antibiotikom

- Ti geni bi lahko iz rastlin preskočili v bakterije ter tako izničili uporabnost antibiotikov za zdravljenje vrste bolezni. Ta trditev vsebuje kanec resnice: nekatere gensko spremenjene rastline prve generacije dejansko vsebujejo (poleg funkcionalno vgrajenih genov) še gen za odpornost proti antibiotiku kanamicin. Vendar, pri novejših tehnologijah za gensko manipulacijo vključevanje teh tako imenovanih selekcijskih genov ni neizogibno oziroma so na voljo številni nesporni selekcijski geni, tako da se lahko vsaj v Evropi ugovor nanaša le na že starejše GSO. Posebna znanstvena skupina Evropskega urada za varnost hrane (EFSA) je že leta 2004 uradno analizirala posledice pridelovanja tovrstnih GSO in v svojem poročilu ugotovila, da imajo te gensko spremenjene rastline »13-letno zgodovino varne uporabe za prehrano«. Ampak, v istem dokumentu (pa tudi drugje) najdemo podatek, ki tezo o nevarnosti možnega prenosa gena za odpornost proti antibiotikom postavi v povsem drugačno luč: »odpornost proti tem vrstam antibiotikov je splošno razširjena pri vrsti naravno prisotnih mikrobov, pri ljudeh in v okolju nasploh«. Selekcijski geni, ki so jih uporabljali v genski tehnologiji, niso umetno ustvarjene tvorbe, kakršne se v naravi ne bi pojavljale – taki geni so v povsem naravnih organizmih prisotni že milijone let! Dejansko je verjetnost prenosa takega gena med vrstami zelo majhna – ampak, tudi če se lahko zgodi, se lahko pojavlja povsem naravno in se je pojavljala že davno pred človeško uporabo genskih tehnologij, zato uporaba GSO tveganja nič ne poveča.

Kaj je res o GSO – Kaj ni res o GSO

Vir: knjižica Boruta Bohanca in Miša Alkalaja, ki jo je nedavno izdala Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani

GSO so povezani s celiakijo

- Kot mnoge podobne tudi ta trditev ne temelji na nikakršni znanstveni raziskavi, ki bi bila objavljena v recenzirani reviji. Vir je samo članek na spletnih straneh ameriške nevladne organizacije IRT (Institute for Responsible Technology), ki zagovarja popolno prepoved GSO. Sklep članka temelji na zelo čudni logiki: v zadnjih dveh desetletjih se je povečalo število alergij (kar je res), in prav tako se je povečala količina hrane, ki jo zaužijemo iz GS virov (kar je tudi res); tej sočasnosti pripisovati vzročno povezavo pa je logično neutemeljeno – v zadnjih letih se je povečalo tudi število osebnih računalnikov, pa najbrž nihče ne bo trdil, da to povzroča celiakijo. Trditev je še toliko bolj absurdna, saj nikjer na svetu ni odobrena nobena GS sorta pšenice, ki je sicer poglavitni vzrok z glutenom povezanih težav. »Študijo« IRT je zavrnila celo ameriška Fundacija za celiakijo (Celiac Disease Foundation).

Kaj je res o GSO – Kaj ni res o GSO

Vir: knjižica Boruta Bohanca in Miša Alkalaja, ki jo je nedavno izdala Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani

Toksini iz GSO so bili odkriti v krvi nosečnic in fetusov

- Najprej je treba pripomniti, da množina (»toksini«) v tej trditvi ni povsem upravičena. Medijski članki, ki izrazito poudarjajo to domnevno škodljivo lastnost GSO, se namreč sklicujejo na eno samo raziskavo »Maternal and fetal exposure to pesticides associated to genetically modified foods in Eastern Townships of Quebec, Canada« Aziza Arisa in Samuela Leblanc (Reproductive Toxicology, 2011). Dejansko sta avtorja opisala detekcijo samo ene (za žuželke) toksične beljakovine Cry1Ab ter njen izvor pripisala GSO, ki vsebujejo gen iz *Bacillus thuringiensis* (npr. koruza MON810). Članek je doživel vrsto ugovorov, najpomembnejši je, da sta avtorja za merjenje koncentracije toksina v ljudeh uporabila metodo ELISA, ki za ta namen ni bila primerna. Avtorja tudi ne navajata podatkov o prehrani preiskovanih subjektov, zato je neupravičena trditev, da v študiji zaznani Cry1Ab izhaja prav iz GSO – povsem naravno ga namreč vsebuje v zemlji zelo pogosta bakterija *Bacillus thuringiensis*; živi sevi te bakterije so tudi dovoljeno sredstvo za zatiranje škodljivih žuželk v ekološki pridelavi zelenjave! A celo če bi bil članek znanstveno povsem korekten – kar ni – ostaja dejstvo, da so bile detektirane koncentracije Cry1Ab prenizke (povprečje 0,19 ng/ml) celo za to, da bi škodile žuželkam – človeški organizem pa sploh nima receptorjev za to beljakovino. Različne snovi pač različno delujejo na organizme: npr. češnje so strupene za pse, mačke in konje, ne pa za ljudi.

Kaj je res o GSO – Kaj ni res o GSO

Vir: knjižica Boruta Bohanca in Miša Alkalaja, ki jo je nedavno izdala Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani

DNK iz GSO se lahko prenesejo na ljudi, ki jedo tako hrano

- Študija, ki jo nasprotniki GSO citirajo, ne trdi, da se to lahko zgodi samo z geni GSO, ampak da je mogoče gene iz vsake zaužite hrane najti tudi v človeškem organizmu. Vendar se tji geni ne vgradijo v človeške genetske strukture, ampak jih je mogoče najti v krvi. Študija, ki je to ugotovila, si je zaslužila mnogo pripomb, saj je sicer potrjeno, da so strukture DNK kemično precej nestabilne in hitro razpadejo že v blago kislem okolju (npr. v človeškem želodcu), hkrati pa jih razgradi tudi pepsin. Ampak vseeno sprejmimo, da je tako. Kar preprosteje povedano pomeni, da lahko v človeški krvi najdemo gene iz Bt koruze ali iz govejega mesa, če jih jemo. Vendar še nikomur, ki je pojedel goveji zrezek, niso zato zrasli rogovi. Možnost, da bi na tak način v človeka vgradili kakšno gensko strukturo iz GSO, je enako neverjetna. Horizontalni prenosi genov – torej med povsem različnimi vrstami – se v naravi dogajajo, a so zelo redki. Lahko, da je bil pri katerem mehanizem tudi prenos skozi hrano, a kot kaže vrsta raziskav, vsebujejo genomi (tudi naš) obsežno zaščito proti prevzemu tujega gena. In sploh, kot kaže zgodovina evolucije, tak horizontalni prenos ni omejen na gene iz GSO.

Kaj je res o GSO – Kaj ni res o GSO

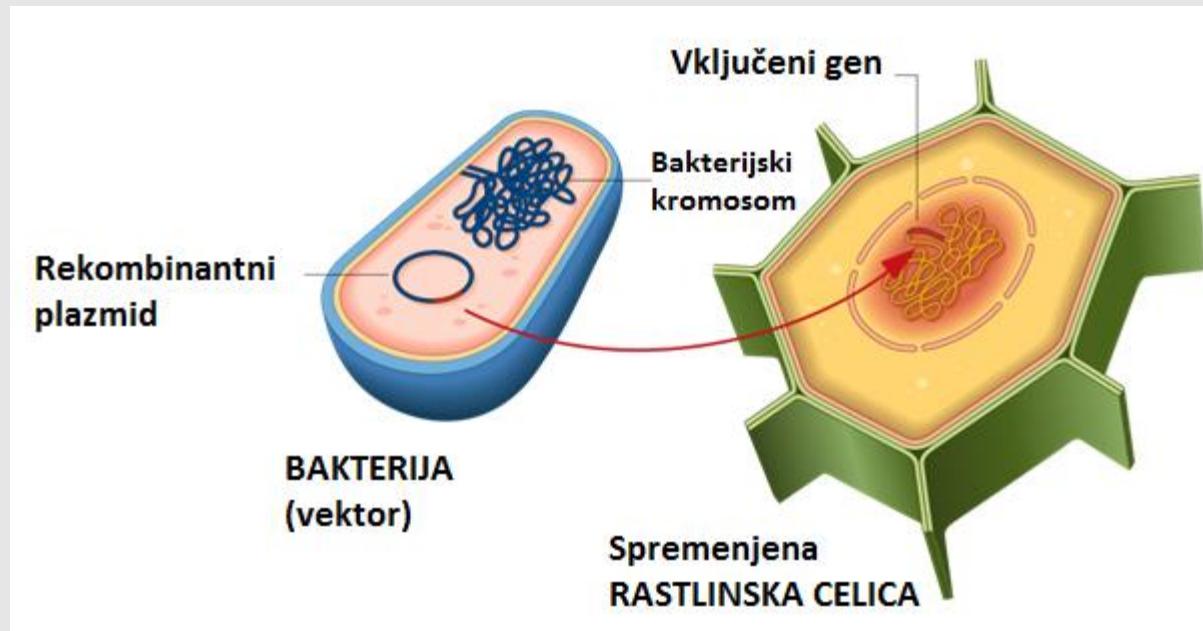
Vir: knjižica Boruta Bohanca in Miša Alkalaja, ki jo je nedavno izdala Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani

Plodovi GSO povzročajo alergije

- Take trditve se pojavljajo vedno znova in nemogoče je na vse odgovoriti. Zato si oglejmo le dva znana primera. Koruza starlink evropskega podjetja Aventis povzroča alergijo pri ljudeh. Sploh ne. Koruza starlink je bila prvotno razvita in odobrena samo za prehrano živali. Vendar so okoljevarstvene organizacije »na osnovi lastnih raziskav« ugotovile, da se je GS koruza znašla tudi v človeški hrani, predvsem v (v ZDA) priljubljenem koruznem čipsu, in da povzroča alergije. Zaradi intenzivne medejske kampanje poklicnih okoljevarstvenikov je več deset ljudi dejansko prijavilo alergične reakcije, domnevno povzročene s koruznim čipsom – vendar so klinične študije to domnevo, kot tudi tezo o alergenosti koruze starlink, ovrgle. Kot drugi si oglejmo primer brazilskih oreškov in soje. Domnevni »dokaz«, ki ga nasprotniki GSO citirajo, je samo poročilo o raziskavah na GS soji podjetja Pioneer, ki so ji zato, da bi imela bolj ugodno beljakovinsko sestavo, dodali gen iz brazilskega oreška. Kljub temu, da so GS sojo razvijali samo za prehrano piščancev, so nadaljnji razvoj ukinili, ko so ugotovili, da bi dodani gen lahko povzročal alergično reakcijo pri ljudeh – »sporna« soja torej nikoli ni bila pridelovana niti kot hrana za živali. Primer lepo ilustrira izjemno visoko stopnjo previdnosti, ki je prisotna prav pri testiranju GSO. Če bi takšna sorta soje vendarle prišla v pridelavo, bi torej lahko povzročila alergijsko reakcijo le pri ljudeh, ki so sicer alergični na brazilske oreške, kajti alergena snov bi bila povsem enaka. Omenimo še, da brazilski oreški, ki preučevano alergeno snov vsebujejo povsem naravno, niso nikjer prepovedani.

Proizvajanje GSO

- Nekatere bakterije lahko prenašajo plazmide tudi v evkariotske celice.
- Takemu prenosu pravimo **transfekcija**.



Transfekcijo so odkrili s študijem naravnega primera genskega inženiringa



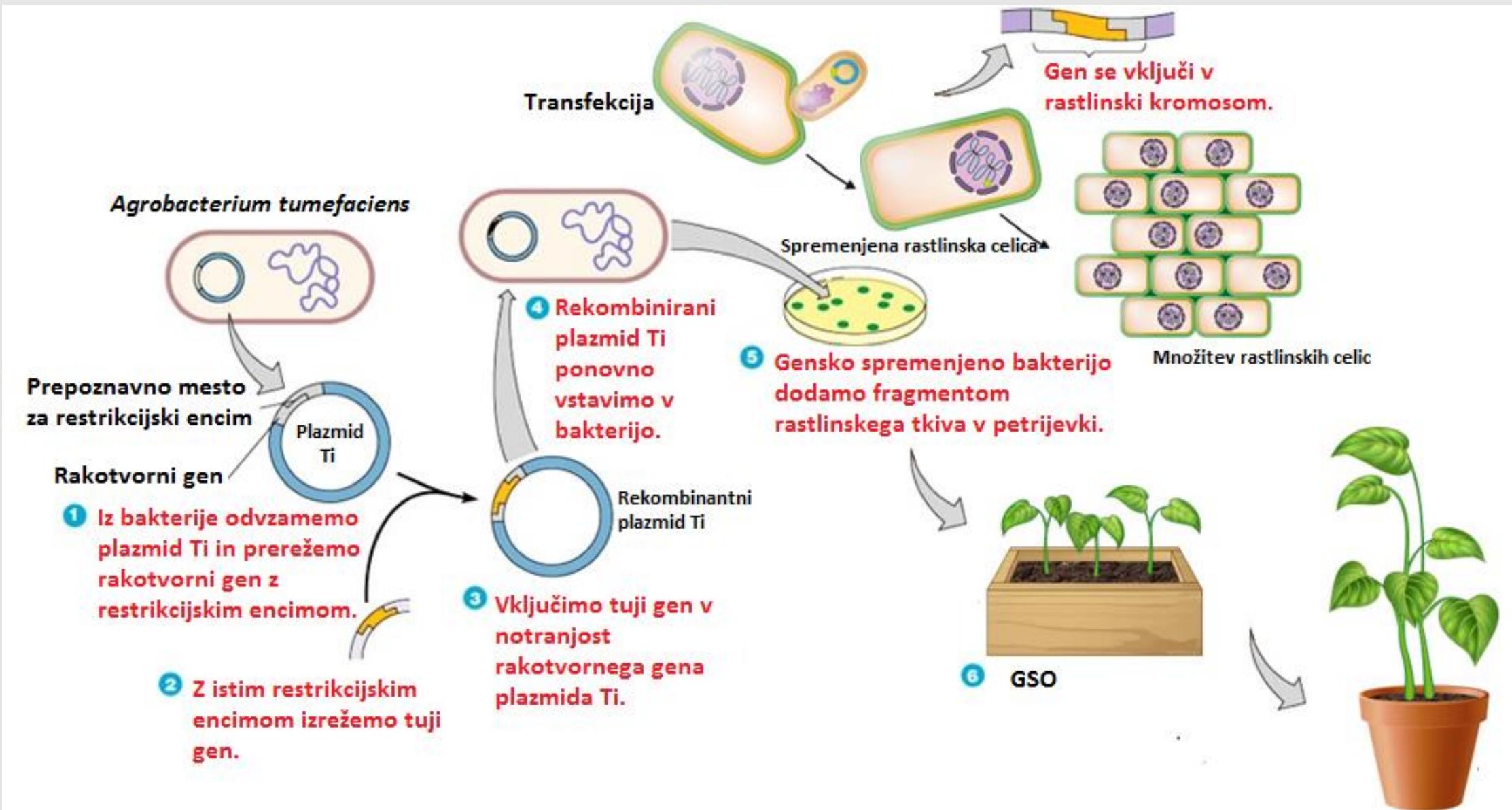
Bakterija *Agrobacterium tumefaciens* povzroča nastanek **rakastih izrastkov** na številnih rastlinah.

Bakterija prenese v rastlino del svoje DNA in tako omogoči nastanek **gensko spremenjene rastline**.

Proizvajanje GSO

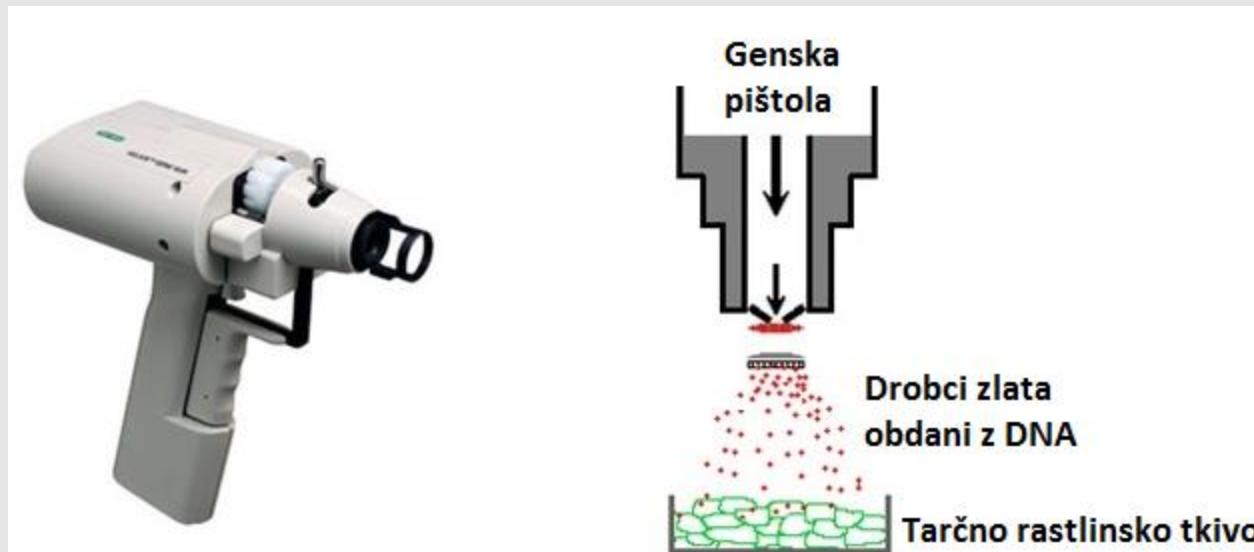
- S pomočjo bakterije *Agrobacterium tumefaciens* lahko vključimo katerikoli gen v celice dvokaličnic.
- Iz bakterije odvzamemo plazmid T_i , ki vsebuje rakotvorni gen.
- V notranjost rakotvornega gena vključimo želeni gen.
- V bakterijo ponovno vstavimo spremenjeni plazmid T_i .
- Rastlino okužimo z bakterijo.
- Gen se vključi v rastlinsko DNA.

Proizvajanje GSO



Proizvajanje GSO

- Za proizvajanje GS **enokaličnic** uporabljajo **biobalistično metodo**:
- Rastlinske celice bombardirajo z **mikronaboji** iz **zlata** ali **tungstena**, ki so **obdani z molekulami DNA**, ki jih hočejo vključiti.

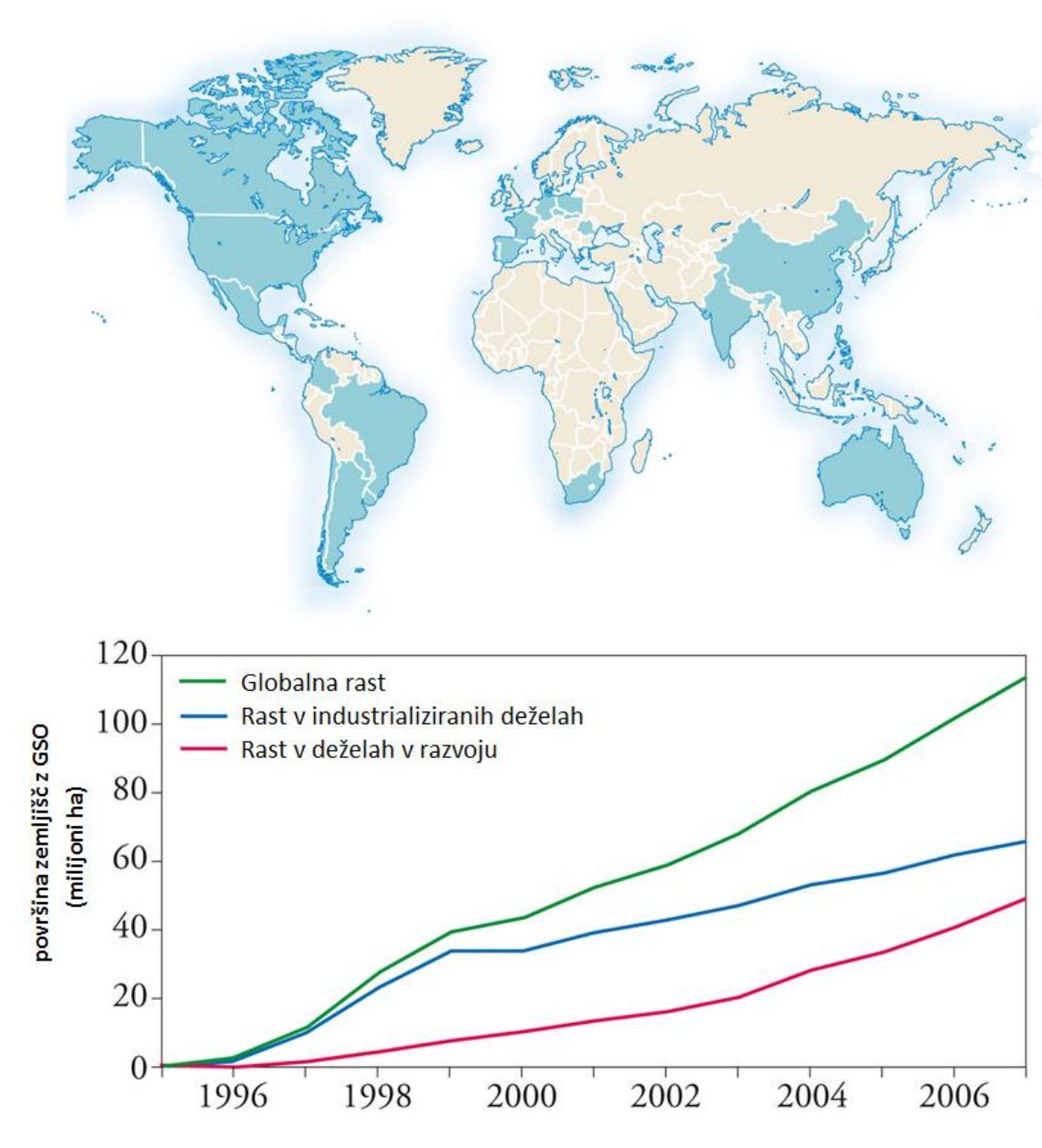


Zakonodaja, ki ureja uporabo GSO

- **Zakonodaja, ki ureja gojenje GSO** je od države do države različna.
- V **Evropi** je bolj **restriktivna** kot v ZDA.
- V **Italiji** in **Sloveniji** je **gjenje GSO dovoljeno samo v znanstvene namene**, na pa za pridelovanje poljščin.
- Dovoljeno pa je **uvažanje GSO pridelkov**.

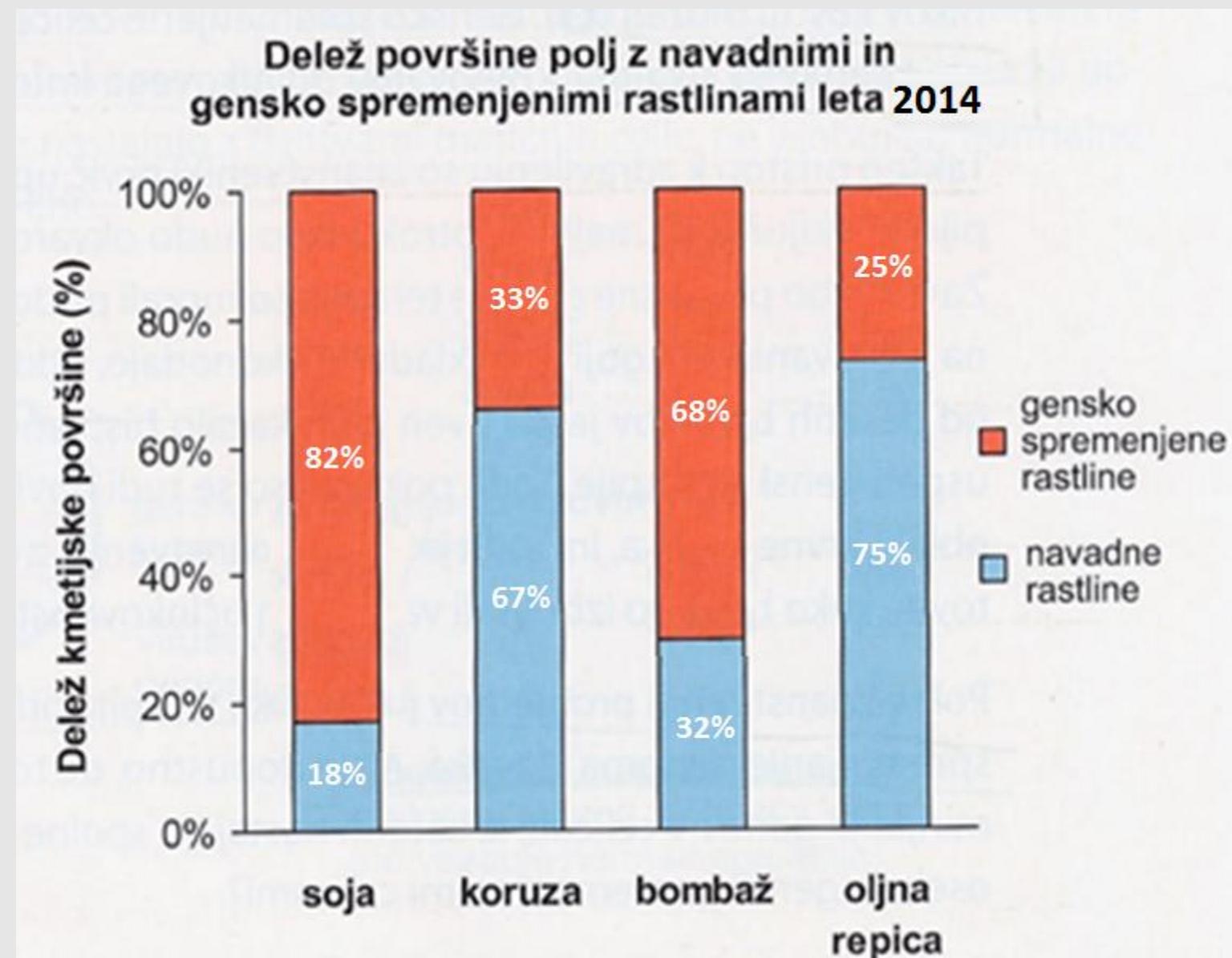
Naraščanje površine zemljišč, na katerih gojijo GSO

- Od leta **1996** (1,7 milijonov ha) do leta **2014** (181 milijonov ha) se je površina zemljišč, na katerih gojijo GSO več kot 100-krat povečala.
- Vsekakor se naraščanje nanaša samo na 28 držav na skupnih 198.
- Zabeležiti gre tudi, da se **v skoraj vseh 28 državah** čedalje bolj širijo protesti zoper gojenje GSO.

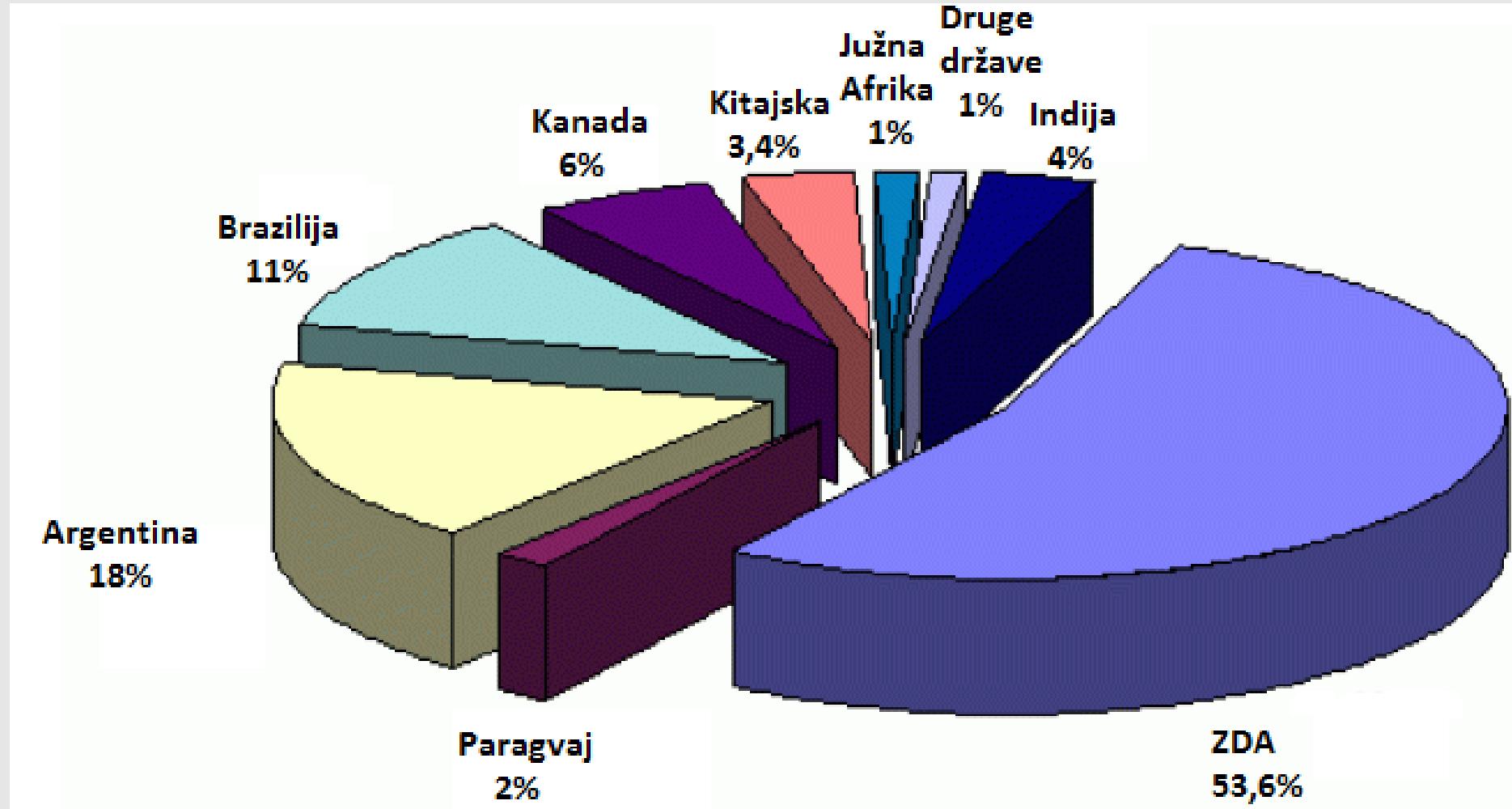


V svetovnem merilu je bilo leta 2014 gensko spremenjenih

- 33% koruze,
- 25% oljne repice,
- 68 % bombaža
- in kar 82 % soje.



Svetovna razporeditev pridelovanja GSO



GSO v Evropi

- V Evropi je GSO precej manj, saj jih trenutno (le koruzo MON810) pridelujejo le **v petih državah**:
 - Španiji (največ),
 - Portugalski,
 - Romuniji,
 - Češki
 - Slovaški.

Okoljska biotehnologija

Biotehnološke metode lahko uporabljamo tudi za:

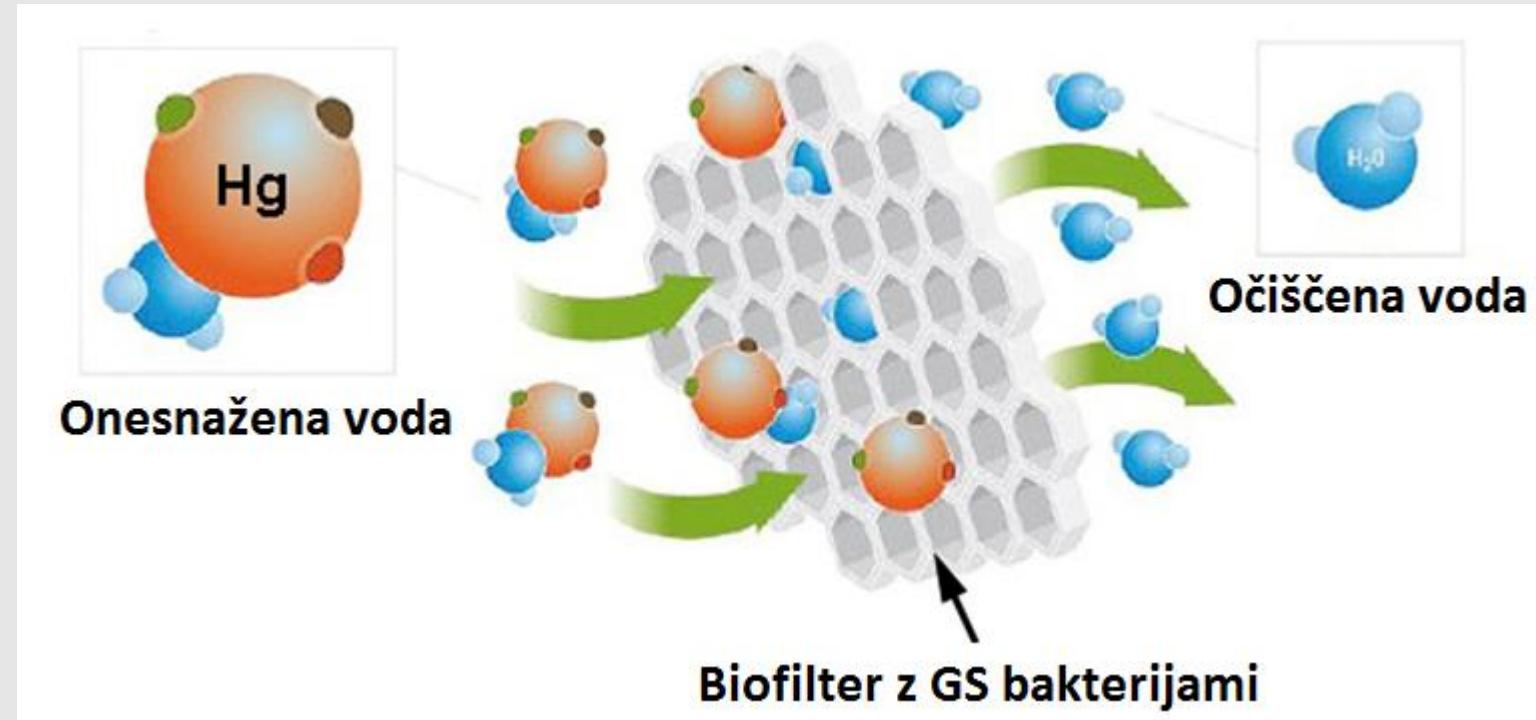
- **bioremediacijo** (biotehnološke procese za čiščenje vode in tal)
- **proizvajanje biogoriv.**

Bioremediacija

- Bioremediacija je postopek, pri katerem **gensko spremenjeni mikroorganizmi** razgradijo **onesnaževalce** okolja v **neškodljive** ali **biološko razgradljive** končne produkte.
- Bioremediacija temelji na naravnih procesih **osidacije** in **redukcije**.
- Bioremediacija je za svojo **nizko ceno** izredno učinkovita metoda odstranjevanja nečistoč, v nekaterih primerih pa je to **edina praktična rešitev za čiščenje**.
- **Primeri bioremediacije:**
 - Absorbcija težkih kovin (Hg, Cr, Pb, As)
 - Razgradnja ogljikovodikov (nafte) in **industrijskih organskih odpadkov**
 - Spremembra **plastike** v biološko razgradljivo snov.

Absorcija težkih kovin

Z gensko spremenjeno bakterijo *E. coli* lahko proizvajamo **biofiltre** za **odtegovanje Hg iz onesnažene vode**.



Biogoriva

- Svet je preplavila ideja o nadomestitvi bencina z biogorivom (**etanol, biodizel**).

- **Etanol** pridobivajo s fermentcijo rastlin, ki so bogate na ogljikovih hidratih (**koruza, slatkorni trs, pšenica, ječmen**).

- **Energija fosilnega goriva**, porabljena za izdelavo **koruznega etanola** v primerjavi z energijo, ki jo da koruzni etanol, je **1:1,3**. Koruzni etanol **izpušča v zrak 22 % manj toplogrednih plinov** kot bencin.
 - **Energija fosilnega goriva**, porabljena za izdelavo **etanola iz slatkornega trsa** v primerjavi z energijo, ki jo da etanol, je **1:8**. Etanol slatkornega trsa **izpušča v zrak 56 % manj toplogrednih plinov** kot bencin.



Biogoriva

- **Biodizel** pridobivajo iz **oljnatih rastlin (soja, palma, oljna repica)**.
 - **Energija** fosilnega goriva, **porabljena za izdelavo** biodizla v primerjavi z **energijo**, ki jo da **biodizel** je **1:2,5**.
 - Biodizel izpušča v zrak **91 % manj toplogrednih plinov** kot bencin.
 - **Največja pomanjkljivost** biodizla so **visoki stroški pridelave**.



Zagovorniki biogoriv

- **Zagovorniki** pravijo, da bi biogoriva lahko **rešila umirajoče podeželsko gospodarstvo**, omogočila **neodvisnost od Srednjega vzhoda** in, kar je najpomembnejše, **zmanjšala vsebnost toplogrednih plinov v ozračju**.
 - Z razliko od starega ogljika, ki ga v zrak spuščamo z izgorevanjem fosilnih goriv, **izhaja ogljik v biogorivih iz ozračja**, saj ga **rastline** skladiščijo s fotosintezo v času rastne sezone (**črpajo iz ozračja CO_2**).
 - Z biogorivi bi prišlo do **nevtraliziranja bilance CO_2** : črpanje bi se izenačilo z izločanjem.
- V nasprotju s premogom in nafto so biogoriva **obnovljiva** in v celoti **biorazgradljiva**.

Nasprotniki biogoriv

- **Okoljevarstveniki** se bojijo, da bodo naraščajoče cene koruze in soje vodile kmete v obdelavo obrobne kmetijske zemlje, ki so sedaj namenjene ohranjanju prsti in divjih živali in bi se potencialno tudi na območju neobdelanih zemljišč spuščalo v zrak CO_2 .
- **Neprijetna resnica** je tudi ta, da bi bilo v trenutnem stanju razvoja mogoče pridelati zadostne količine surovin, ki bi bile z ekonomskega stališča zanimive za proizvodnjo biogoriv, samo z intenzivnim kmetijstvom (ki vključuje porabo velike količine umetnih škropiv, gnojil in vode).

Nasprotniki biogoriv

- Biogoriva **porabljajo pridelke**, ki bi lahko služili prehrani.
- Nedavno **poročilo Združenih narodov** zaključuje, da kljub temu, da so potencialne koristi velike, bi **širjenje proizvodnje** lahko **zmanjšalo prehransko varnost** in **povečalo cene hrane** na območjih, kjer vsak dan zaradi lakote umre 25.000 ljudi.
- **Potreba po obeh, gorivu in hrani**, naj bi se do sredine stoletja **podvojila**; mnogo znanstvenikov se pa boji, da bodo **podnebne spremembe** v naslednjih desetletjih **spodkopale kmetijsko proizvodnjo**.
- **Čarobnega pridelka**, ki bi rešil naše energetske težave, **ne da bi škodoval okolju, ni**.

Druge vrste biogoriv

- V skupino **lesne biomase**, ki jo je smotrno uporabljati v energetske namene, uvrščamo:
 - manj kvaliteten les iz gozdov,
 - les iz površin v zaraščanju,
 - les iz kmetijskih in urbanih površin,
 - lesne ostanke predelave lesa,
 - **odslužen (neonesnažen) les.**
- **Lesna biomasa** se kot vir energije uporablja v obliki **polen**, **lesnih sekancev** in **lesnih pelet**.



Druge vrste biogoriv

- Bioplín (CH_4) pridobivajo v anaerobnih razmerah iz organske biomase (koruza, trava, detelja, krmna pesa, listi sladkorne pese, sončnice, ogrščica), iz hlevskega gnoja in gnojevke ter iz komunalnih odplák.
- Bioplín lahko uporabimo za proizvodnjo toplote in električne energije ter kot pogonsko gorivo za kmetijsko mehanizacijo, za čistilne naprave in za industrijo.
- Bioplín prispeva k zmanjševanju onesnaževanja vode in degradacije tal.
- V Sloveniji uporaba bioplina še ni razširjena.
 - Bjoplin pridelujejo npr. na prašičji farmi Ihan in v čistilnih napravah (Škofja Loka, Domžale, Kranj, Jesenice).
 - Država spodbuja energetsko izrabo bioplina z zagotovljenim odkupom in ugodno odkupno ceno električne energije.



<http://casopis.kmeckiglas.com>



www.gh-holding.si

Druge vrste biogoriv

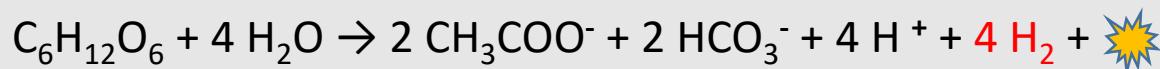
- **Biovodik** je **privlačna alternativa** tudi kot **pogonsko avtomobilsko gorivo**, ki se lahko uporablja v motorjih z notranjim izgorevanjem.
- Obstajajo trije tipi mikroorganizmov, ki so sposobni proizvodnje vodika:
- **Cianobakterije**:



- **Fotoheterotrofne bakterije** (halofilne arhibakterije ter škrlatne in zelenе nežveplove bakterije) ki **pretvarjajo organske substrate**, npr. organske kisline v vodik in druge snovi **s pomočjo svetlobne energije**.



- **Kemoheterotrofne bakterije**, ki v temi pretvarjajo **organske odpadke v vodik** in druge snovi **s pomočjo kemijске energije** v organskih snoveh. Postopku, ki poteka v striktno **anaerobnih pogojih** in v prisotnosti **zadostne količine vode**, pravimo **temna fermentacija**.



Varnostne prednosti in slabosti biovodika

- Ob razlitju se bo **vodik**, ker je **lažji**, hitreje razširil kot metan in se bo **hitro razpršil po prostoru**.
- To je na prostem verjetno vodikova **največja varnostna prednost**.
- **Visoka vnetljivost** vodika in njegovih mešanic z zrakom predstavlja **slabost** v primerjavi z ostalimi gorivi.

Mnenje večine znanstvenikov o načinu produkcije biogoriv

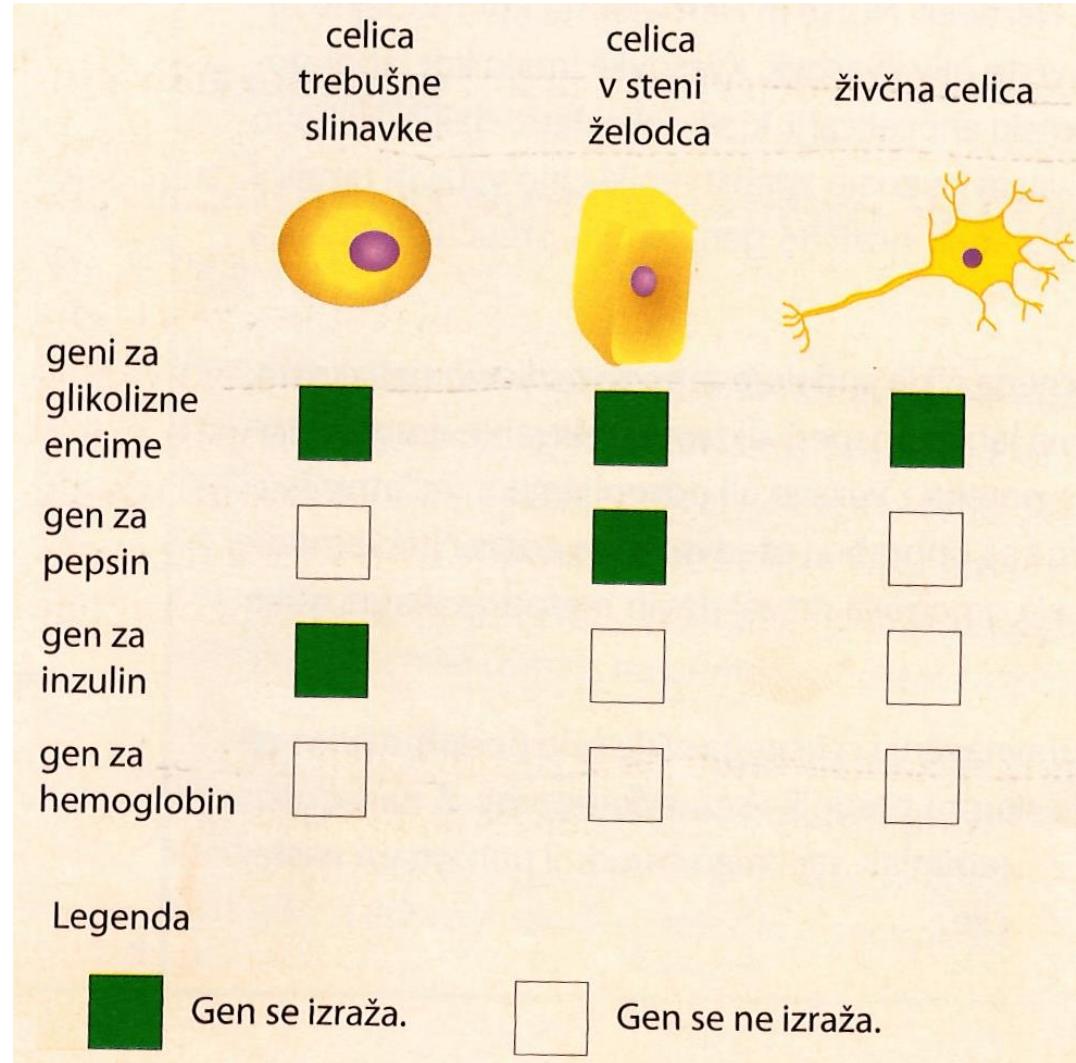
- Večina znanstvenikov meni, da naj bi bile **najboljša možnost alge**, enocelični vodni organizmi, saj **rastejo v odpadni vodi, tudi morski**, in za uspevanje **zahtevajo le svetlobo in CO₂**.
- Medtem ko korozo in sojo žanjejo enkrat letno, lahko **alge uporabljamо vsak dan**.

GSO za proizvodnjo biogoriv

- Znanstveniki zagovarjajo tudi **uporabo** gensko spremenjenih organizmov (**GSO**) za **proizvodnjo biogoriv**.
- V ta namen načrtujejo produkциjo **GS poljščin**:
 - s povečanim **deležem ogljikovih hidratov in olj**
 - s povečano **odpornostjo**
 - s povečano **fotosintetsko sposobnostjo**
 - s povečano **sposobnostjo pobabe atmosferskega dušika**
- Načrtujejo tudi produkциjo **GS bakterij**, ki bi bile sposobne:
 - proizvajati **biodizel**
 - **izboljšati že poznane procese pridobivanja biovodika.**

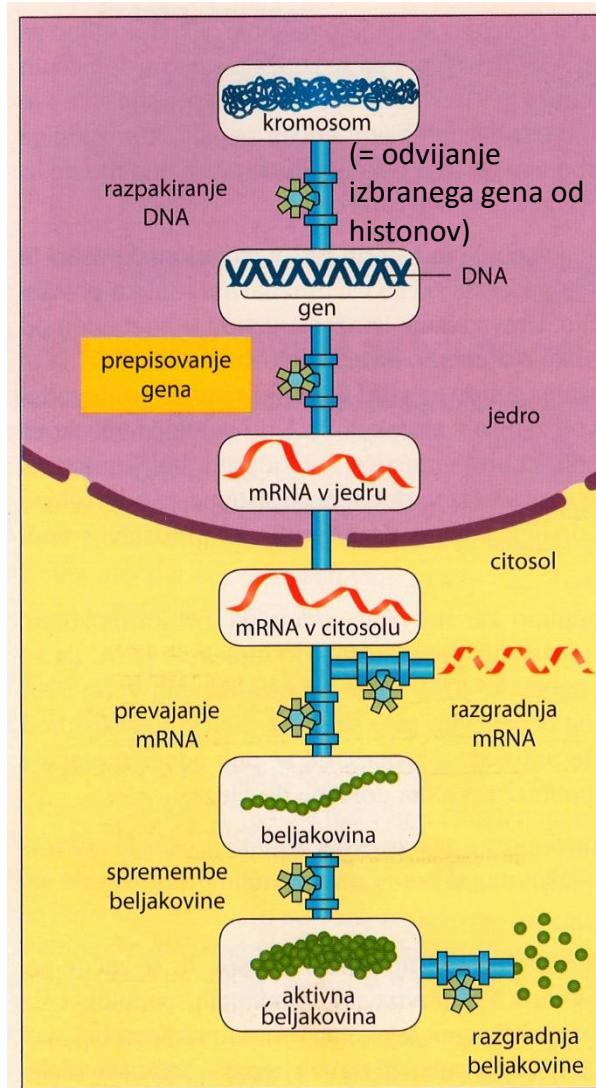
Uravnavanje genskega izražanja

Izbirno izražanje genov



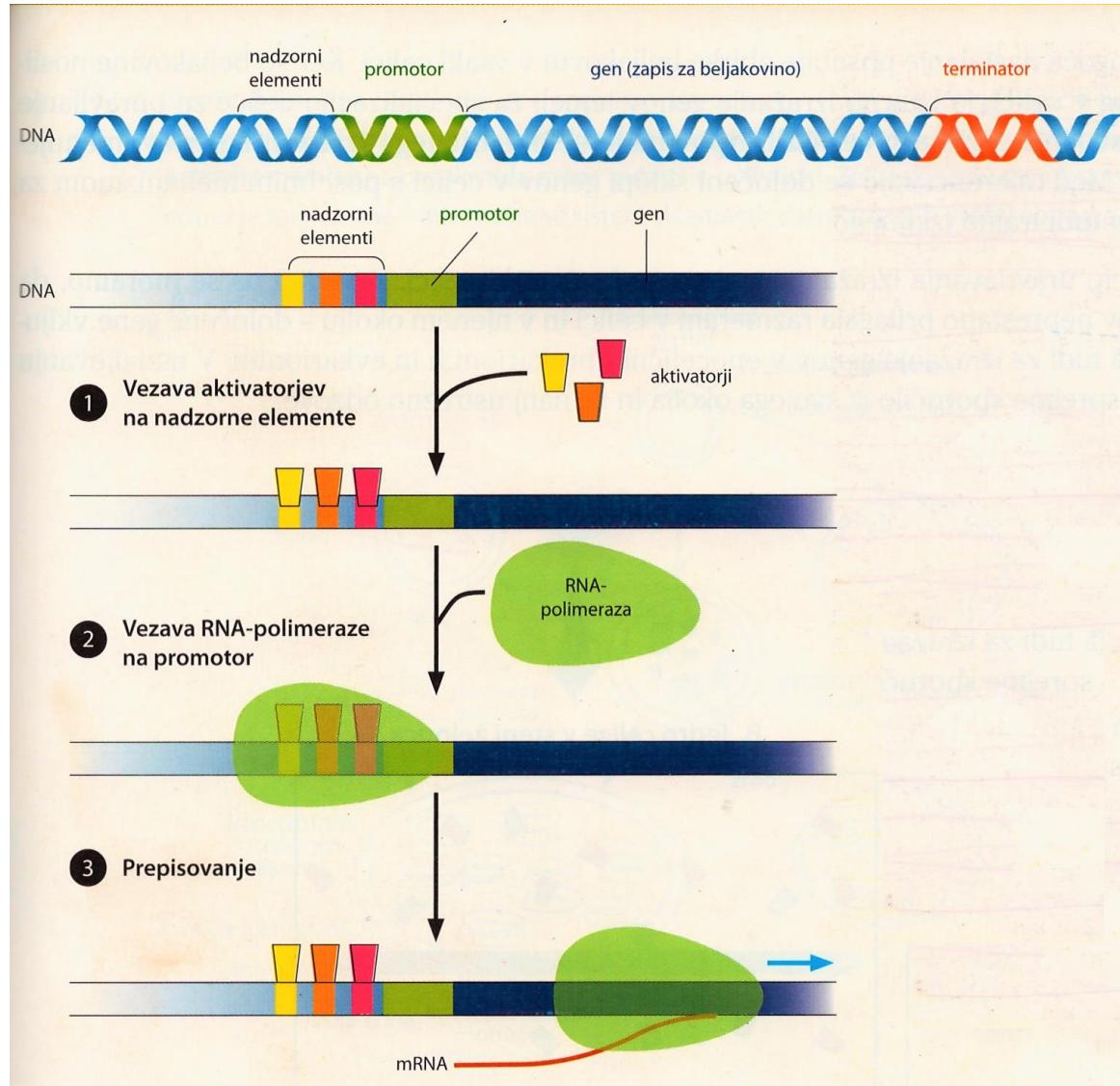
- Zakaj so v različnih tkivih celice različne, če vse vsebujejo enake molekule DNA?
- V različnih celičnih tipih se geni različno izražajo (prepisujejo in prevajajo).
- Različne celice torej vsebujejo različne komplete beljakovin.

Uravnavanje izražanja genov



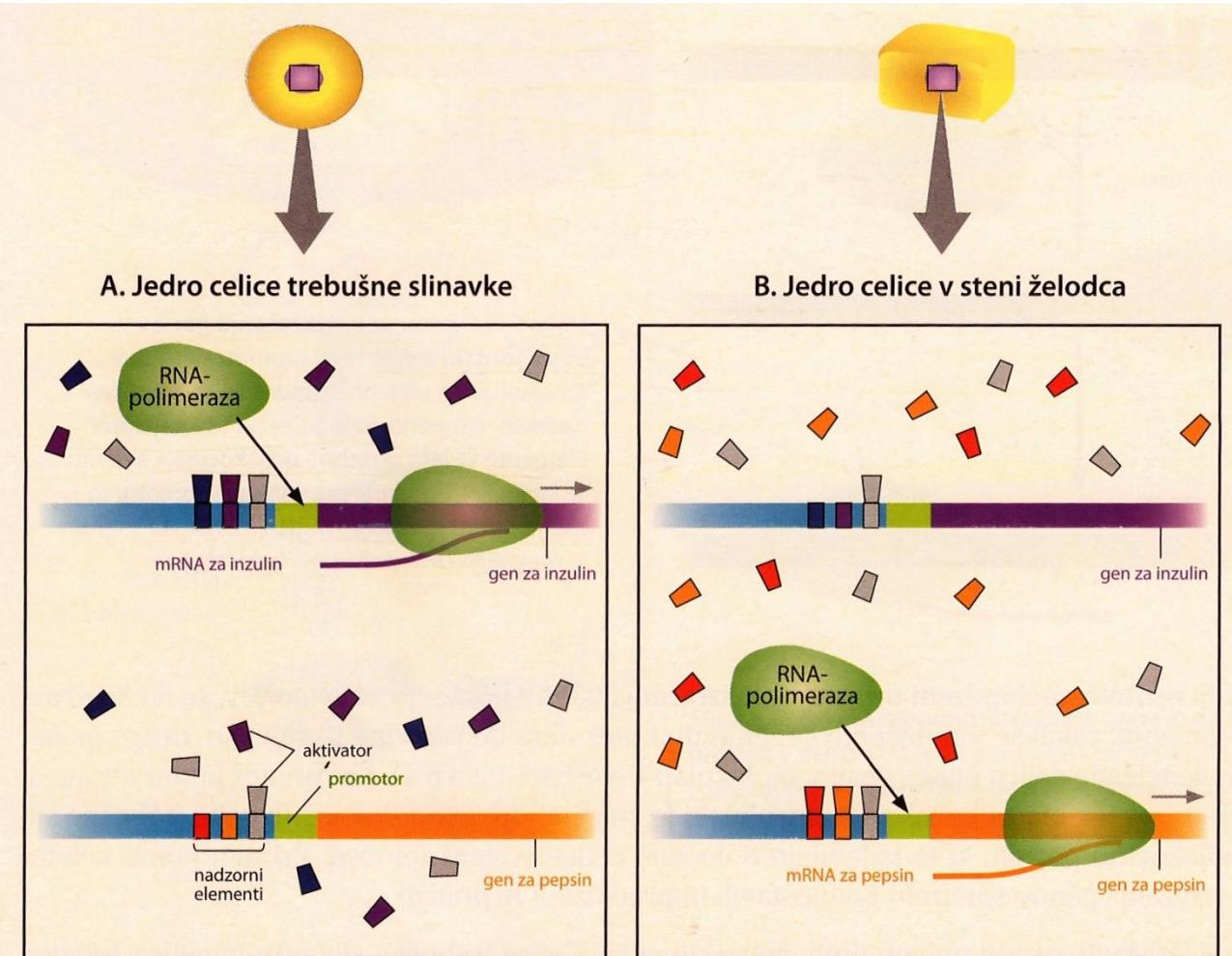
- V evkariontski celici se izražanje genov uravnava **v več zaporednih stopnjah**.
- **Uravnavanje izražanja genov** je prikazano kot **vodovodni sistem**.
- Vsak **ventil** predstavlja **nadzorno točko**.
- V celici se **m-RNA** in beljakovine neprestano izgrajujejo in razgrajujejo.
- **Celica** namreč **količino beljakovin prilagaja trenutnim potrebam**.
- Ko bi se m-RNA ne razgrajevala, bi se iz nje v nedogled prevajala ista beljakovina, ne glede na potrebe celice.

Uravnavanje prepisovanja genov



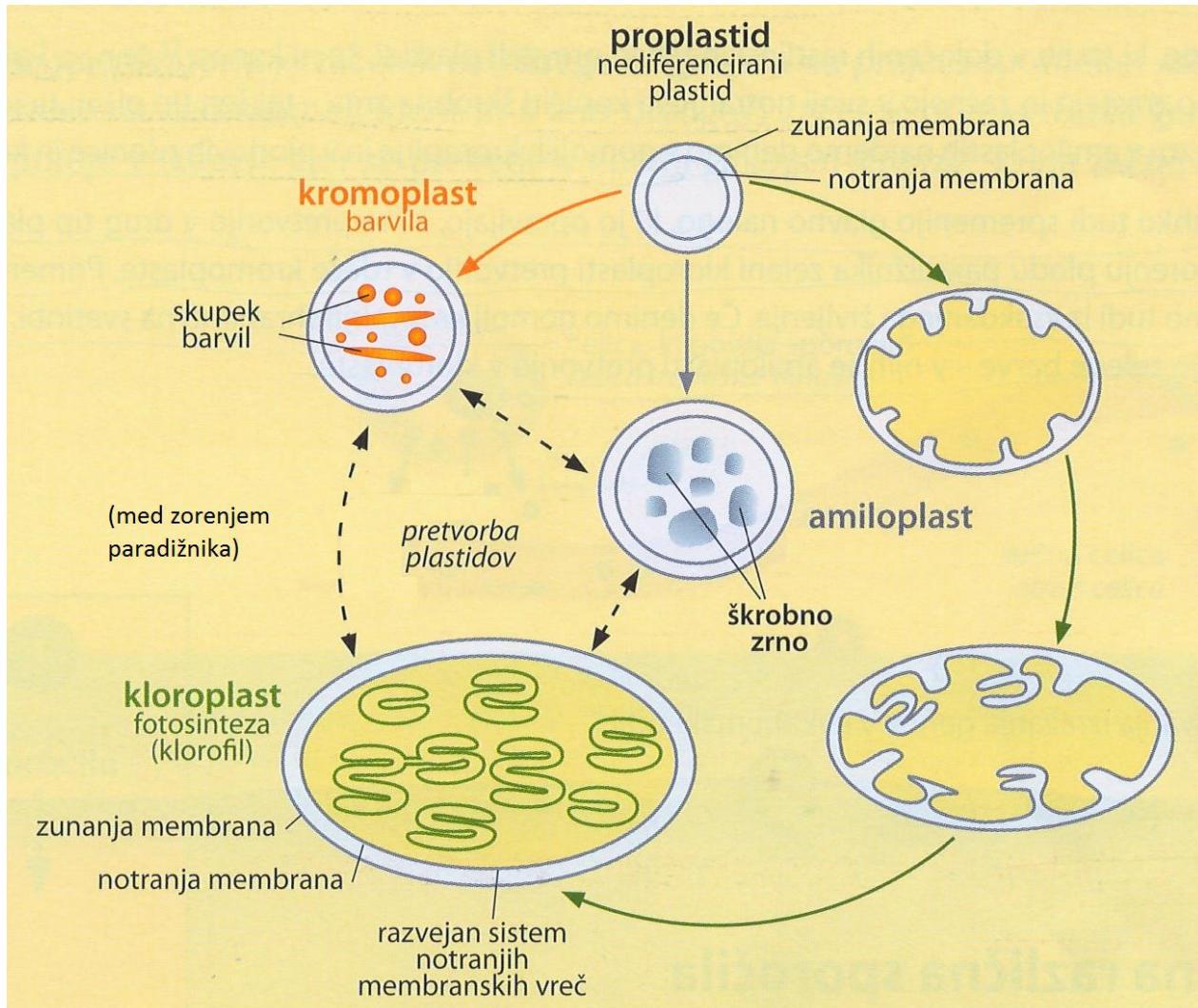
- Šele ko se na vse nadzorne elemente vežejo aktivatorji (=posebne beljakovine), se lahko RNA polimeraza veže na promotor in začne s prepisovanjem m-RNA z DNA.
- Tudi aktivatorji so beljakovine in njihovo nastajanje regulirajo drugi aktivatorji.

Celična diferenciacija



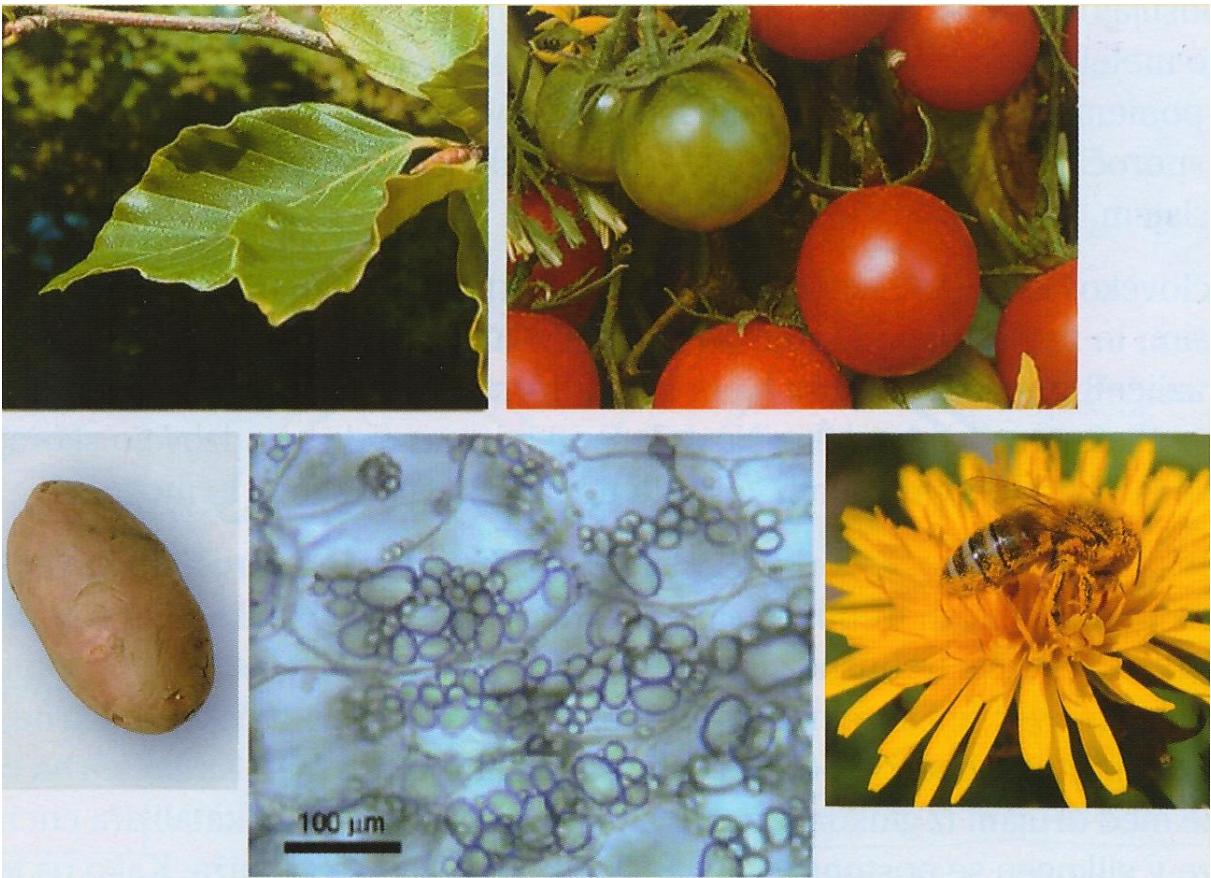
- Celična diferenciacija je proces nastajanja različnih celičnih tipov na temelju izbirnega izražanja genov.
- V vsaki celici je prisoten samo določen nabor aktivatorjev, zato se v specializirani celici večceličnega organizma izraža le majhen delež vseh genov.

Diferenciacija proplastida



- Proplastid se **v različnih tipih celic** diferencira v **različne tipe plastida (kloroplast, kromoplast, amiloplast)**, ki opravlja različne naloge.
- Vsi plastidi imajo **notranjo in zunanjo membrano**.
- V **kloroplastu** nastajajo **skladovnice membranskih vreč** z **uvihavanjem notranje membrane**.

Različno diferencirani plastidi z različnimi nalogami



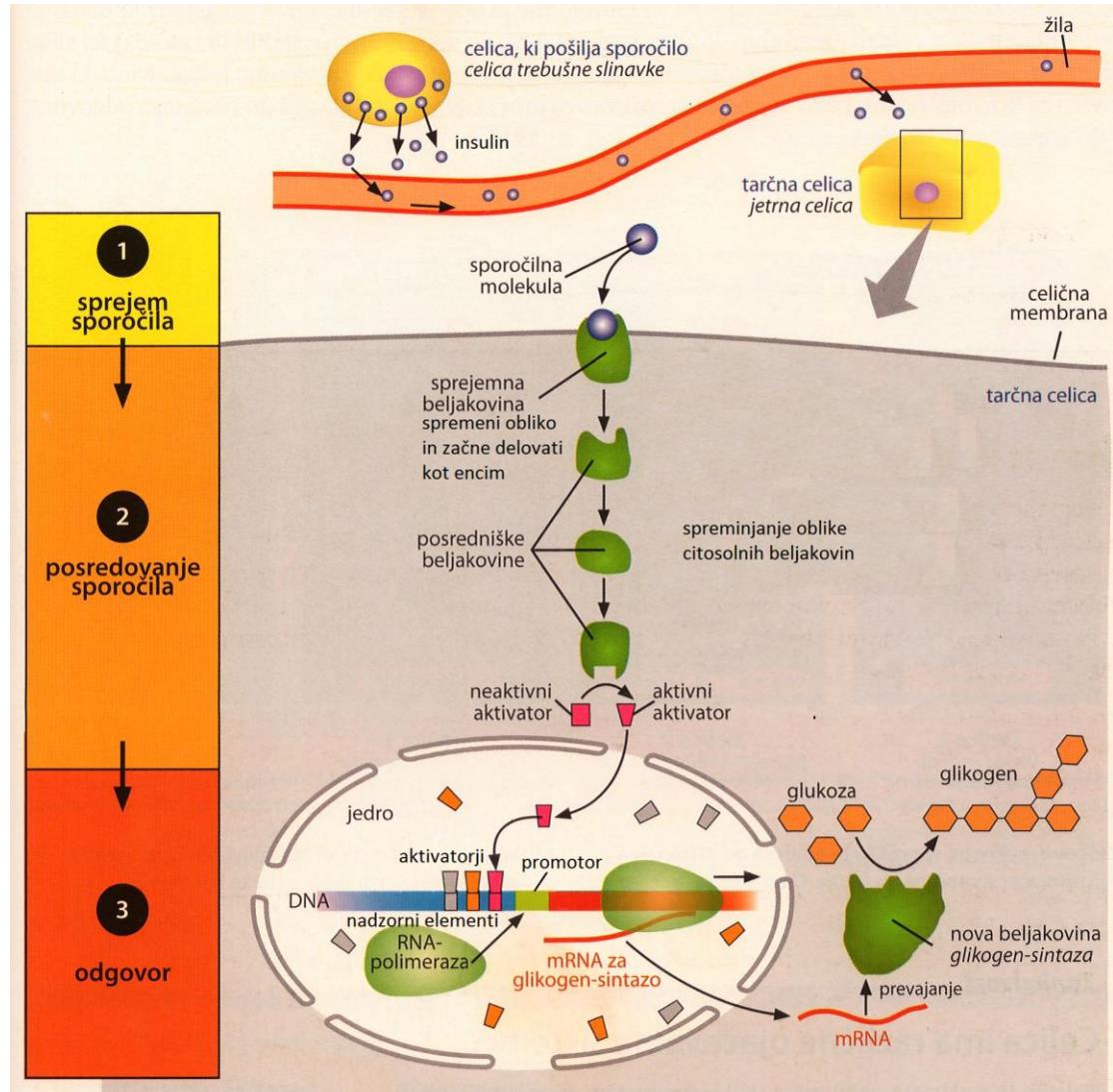
- V listu bukve kloroplasti opravljajo fotosintezo.
- V nezrelem paradižniku so kloroplasti, ki se med zorenjem pretvorijo v kromoplaste, ki vsebujejo veliko rdečega barvila likopena. Rdeča barva privablja raznašalce semen.
- V založnem tkivu v gomolju krompirja je veliko amiloplastov, v katerih so škrobna zrna.
- V socvetju regata kromoplasti v venčnih listih vsebujejo veliko rumenih barvil, ki privabljajo opaševalce.

Primere pretvorb plastidov poznamo tudi iz vsakdnjega življenja. Če gomolj krompirja shranimo na svetlobi, postanejo zunanje plasti celic zelene barve – v njih se amiloplasti pretvorijo v kloroplaste.

Odzivanje celic na sporočila iz okolja

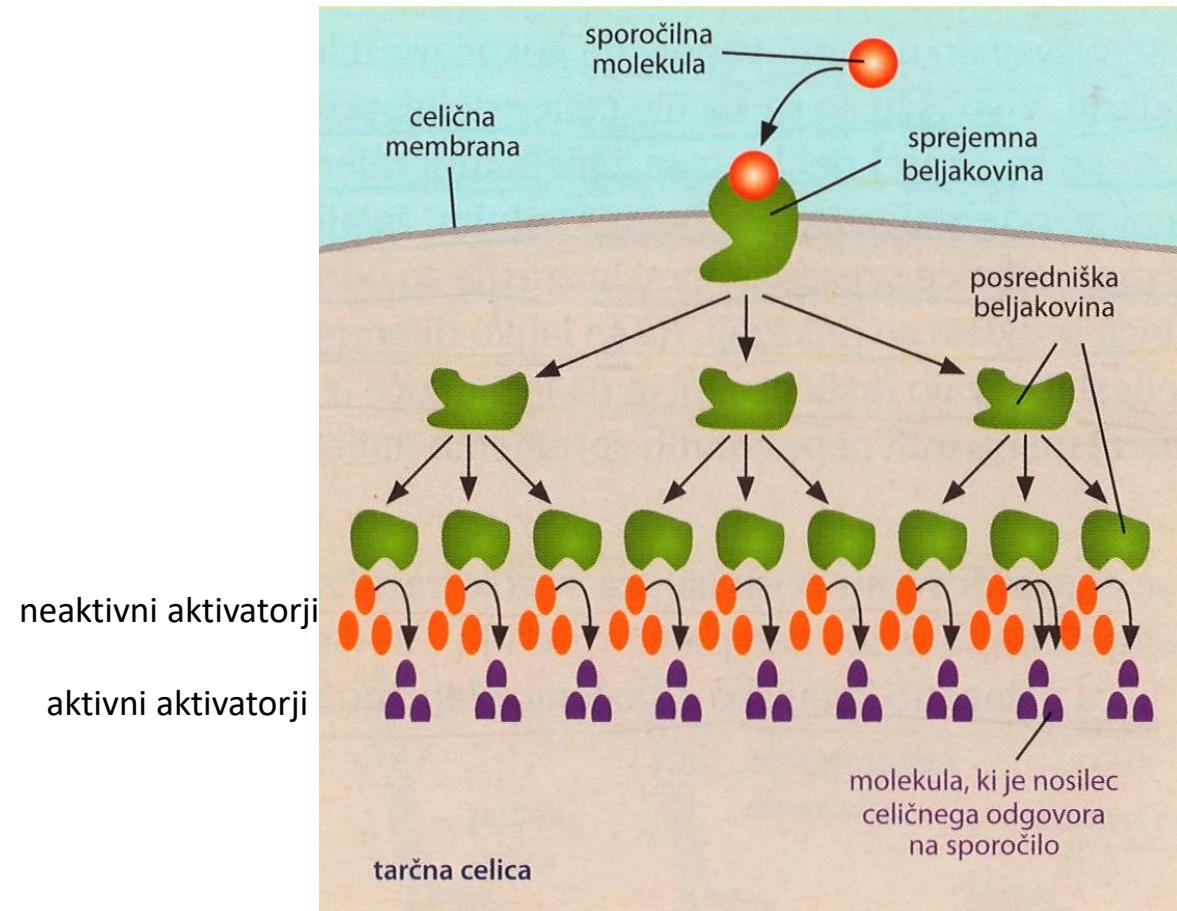
- Izbirno izražanje genov v celici povzroči tudi nastanek določenih sprejemnih beljakovin na celični membrani.
- Sprejemne beljakovine na celični membrani vežejo sporočilne molekule iz okolja (hormone).
- Posamezne celice sprejemajo določena sporočila iz okolja in se nanje odzivajo s spremembami svojega delovanja.

Odzivanje celic na sporočila iz okolja



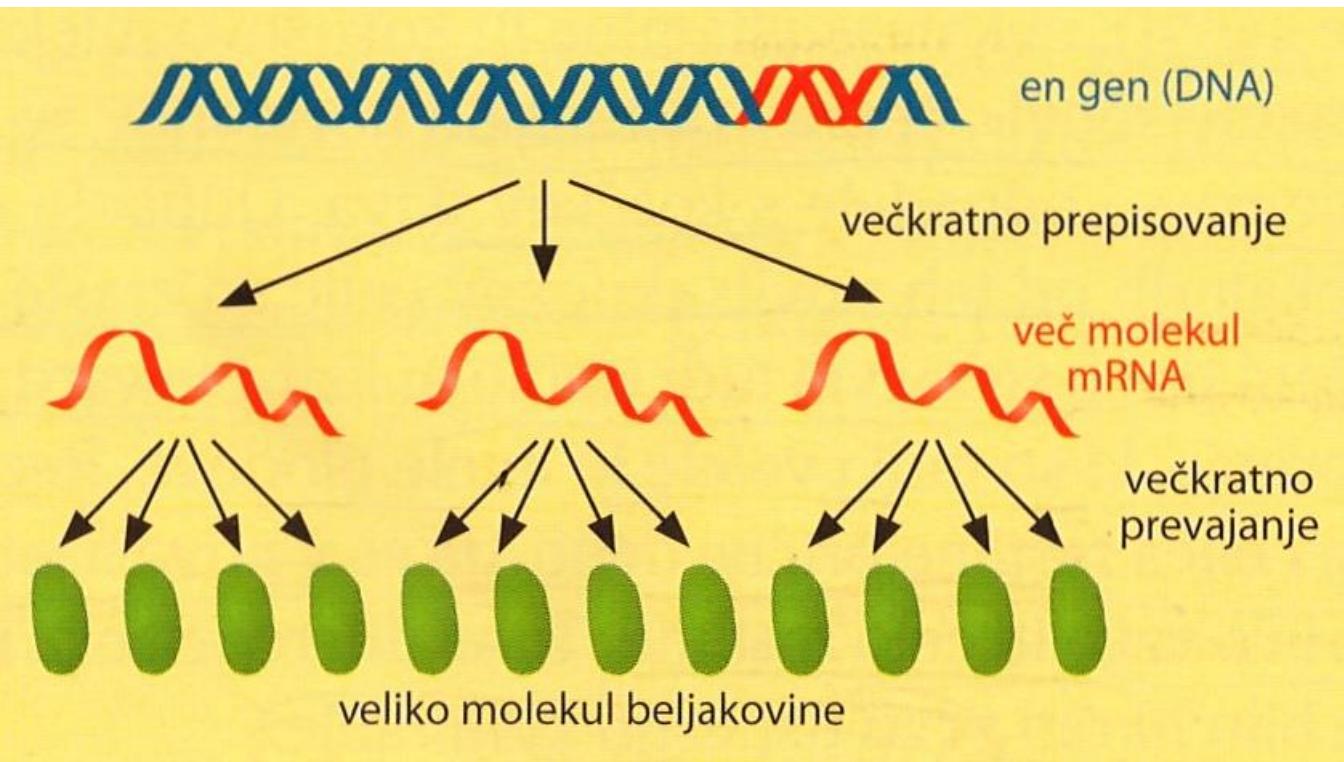
- Odziv jetrne celice na prisotnost hormona insulina.
- Vezava insulina na membrano jetrne celice je začetek zaporedja procesov, po katerih začne jetrna celica iz molekul glukoze izgrajevati glikogen.

Kateri je smisel verige posredniških beljakovin?



- Veriga posredniških beljakovin deluje kot **ojačevalni sistem**:
- Vsaka naslednja beljakovina v verigi ne spremeni oblike le eni, pač pa **mnogim posredniškim beljakovinam**.
- Tako nastane v celici v razmeroma kratkem času veliko število aktivnih aktivatorjev, kar zagotavlja **učinkovit odgovor na sporočilo**.

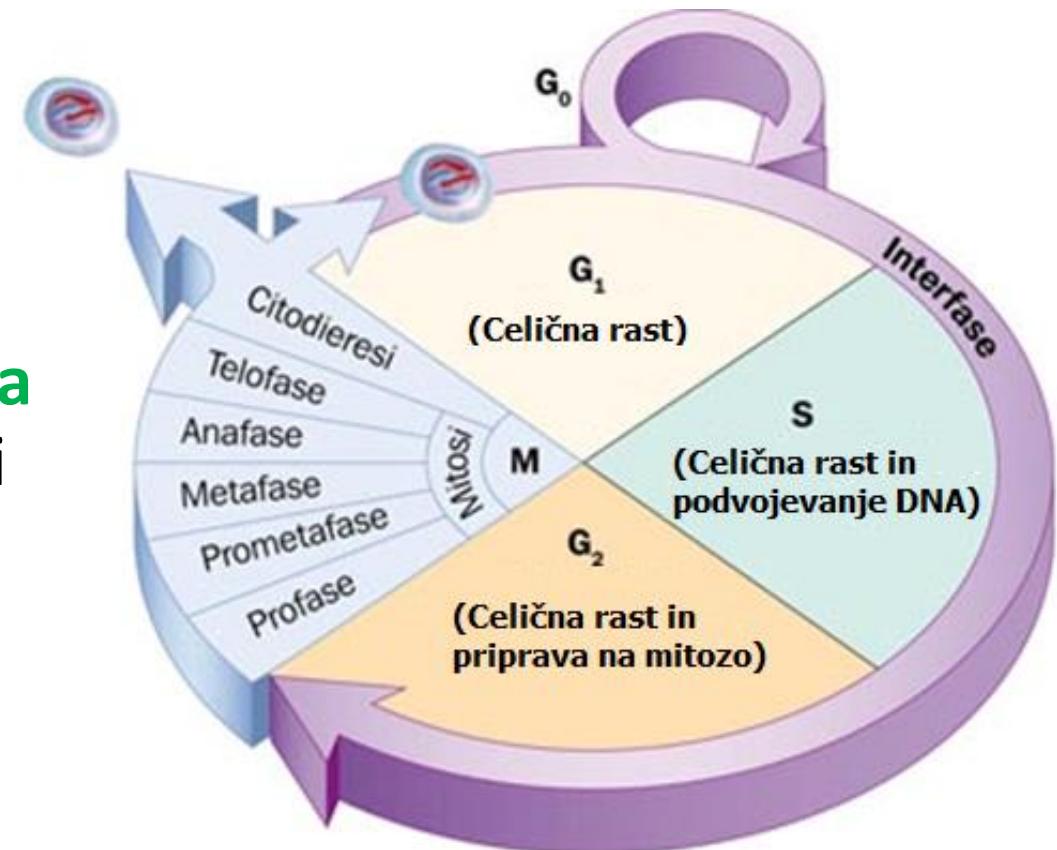
Ojačevalni sistem pri izražanju genov



- Ojačevalni sistem uporablja celica tudi pri izražanju genov.
- Iz enega gena v DNA lahko celica prepiše več kopij mRNA, vsako molekulo mRNA pa lahko ribosomi večkrat prevedejo.
- Tako lahko iz ene kopije gena v kratkem času dobimo veliko kopij beljakovine.
- Ta ojačevalni sistem omogoča npr. hitro izgradnjo mnogih molekul glikogen-sintaze in s tem hitro vezavo molekul glukoze v glikogen.

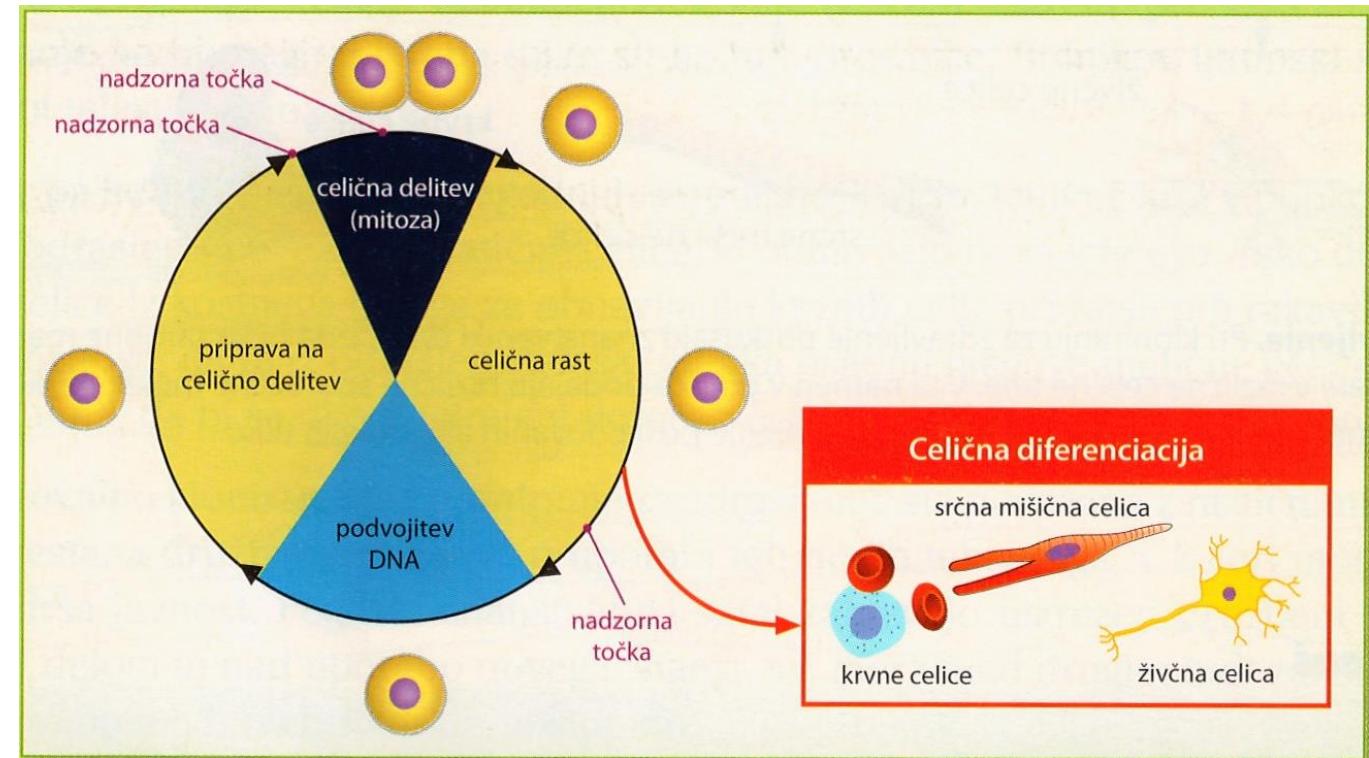
Diferenciacija zarodnih celic

- Celice v zgodnjem zarodku so nediferencirane.
- Pravimo jim **zarodne matične celice**.
- V njih **se izražajo geni**, ki so odgovorni **za celično delitev**, ne pa geni, ki so značilni za posamezne celične tipe.
- Zarodne matične celice se delijo po celičnem ciklu.



Diferenciacija zarodnih celic

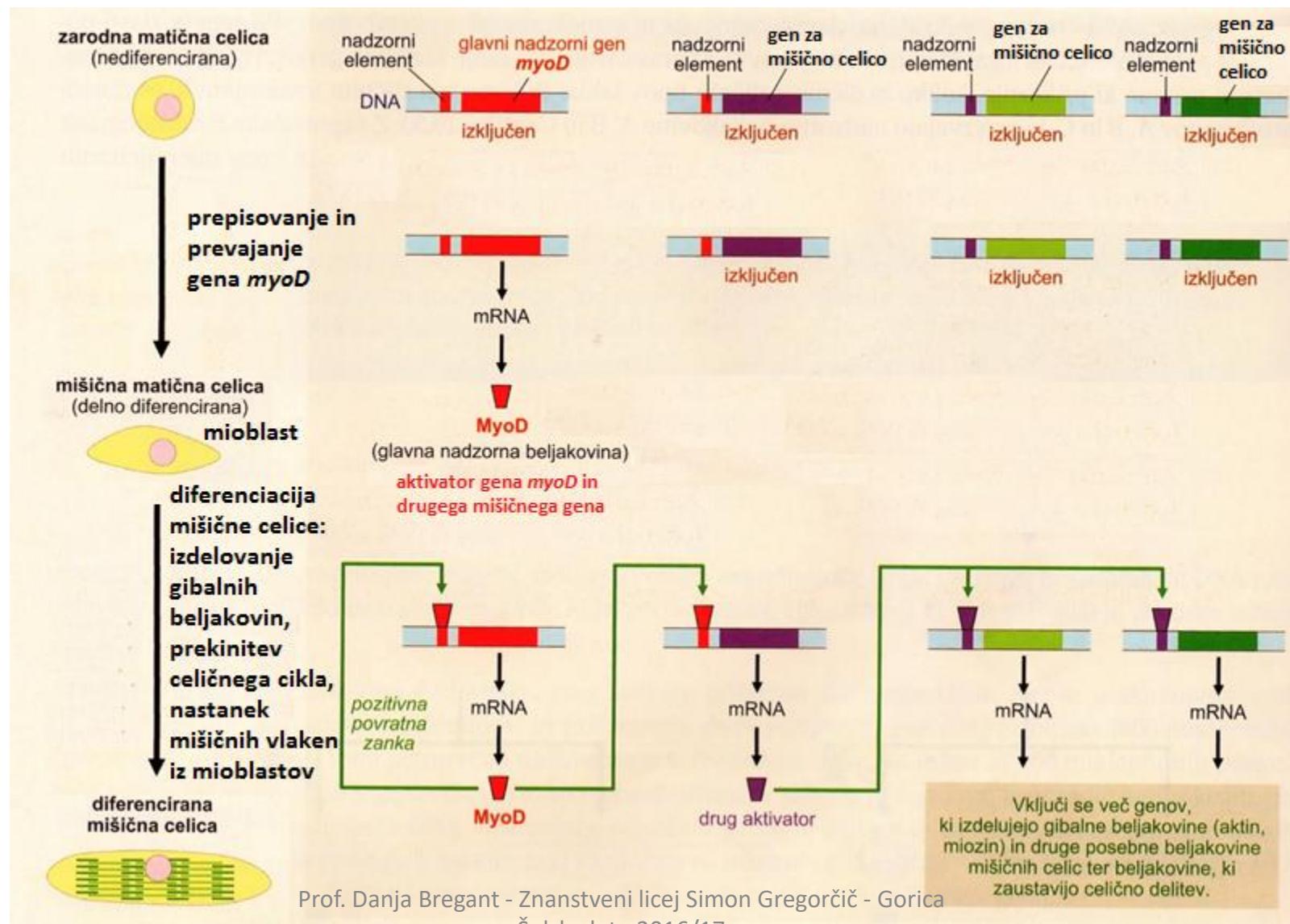
- V nadalnjem razvoju zarodka se nekatere zarodne matične celice še naprej delijo in proizvajajo nove celice, druge pa se prenehajo deliti in se začnejo **diferencirati** v različne celične tipe (npr. **mišične**, **živčne**, **hrustančaste**,...), ker se v njih začnejo izražati različne **skupine genov**.
- Procesu specializiranja celice pravimo **celična diferenciacija**.



Diferenciacija skeletne mišične celice med razvojem človeškega zarodka

- V nekaterih **zarodnih matičnih celicah**, se pod vplivom **sporočil** iz drugih celic, prepiše **gen *myoD*** in začne proizvajati **beljakovino *myoD***.
- Beljakovina *myoD* deluje kot **aktivator gena *myoD*** (pozitivna povratna zanka) in drugega **specifičnega gena** za mišične celice.
- Prisotnost beljakovine *myoD* pomeni **spremembo** zarodne matične celice v **mišično matično celico** (mioblast), ki je delno diferencirana in se še vedno deli.
- Ko začne mišična matična celica (mioblast) proizvajati še druge mišične beljakovine, se spremeni v **diferencirano mišično celico**, ki nima več sposobnosti celične delitve.

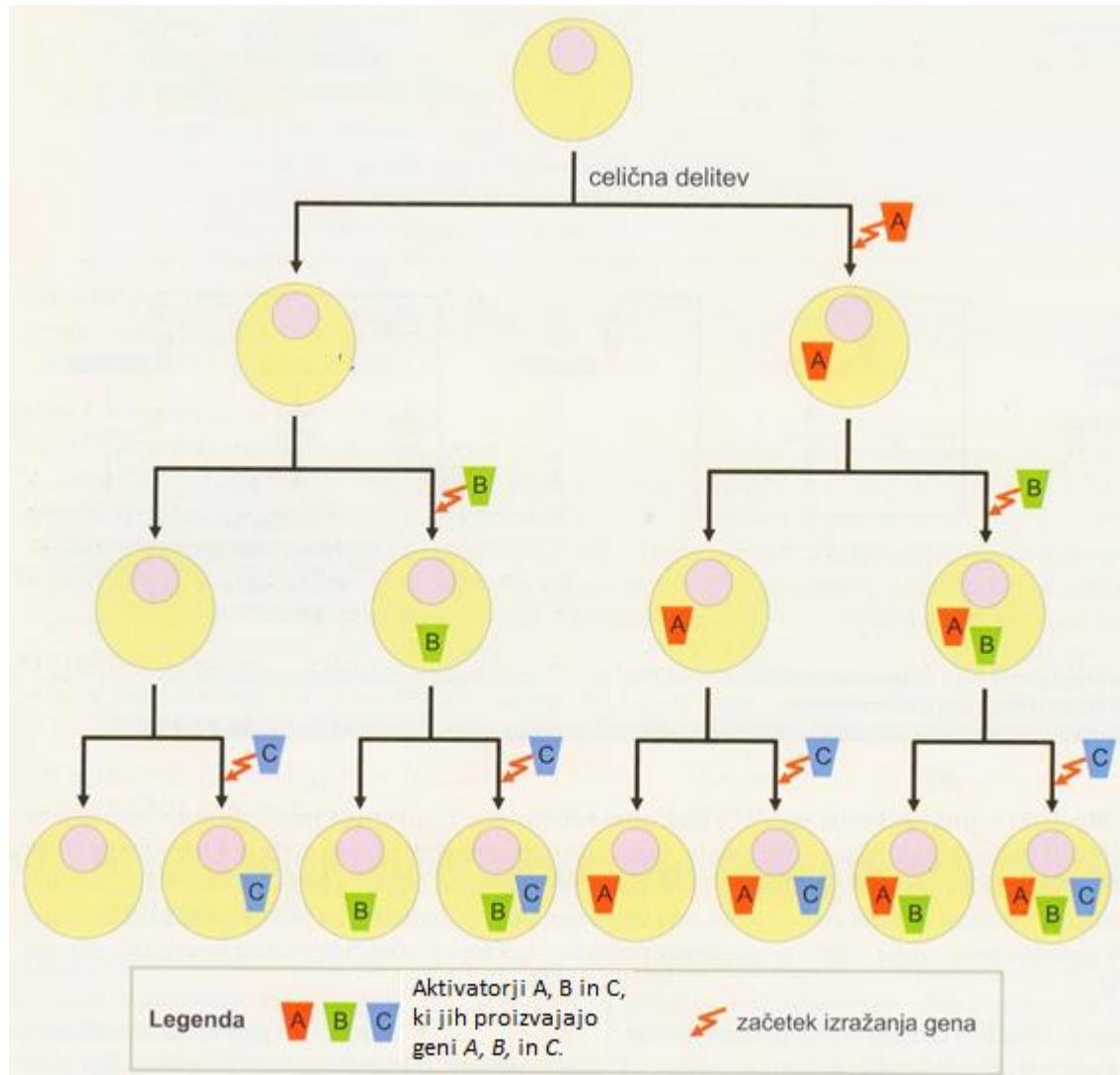
Diferenciacija skeletne mišične celice med razvojem človeškega zarodka



Obnavljanje mišičnih celic v odraslem človeku

- V mišicah odraslega človeka nekaj celic ni do konca diferenciranih, temveč ostanejo na stopnji mišične matične celice.
- V njih je celična delitev zaustavljena.
- V primeru poškodbe mišičnih celic se mišične matične celice začnejo spet deliti.
- **Delitev je asimetrična:** ena hčerinska celica ostane mišična matična celica, druga se diferencira.
- **Novo nastale celice** se diferencirajo v mišične celice in **nadomestijo** poškodovane mišične celice v mišici.

Obnavljanje mišičnih celic v odraslem človeku

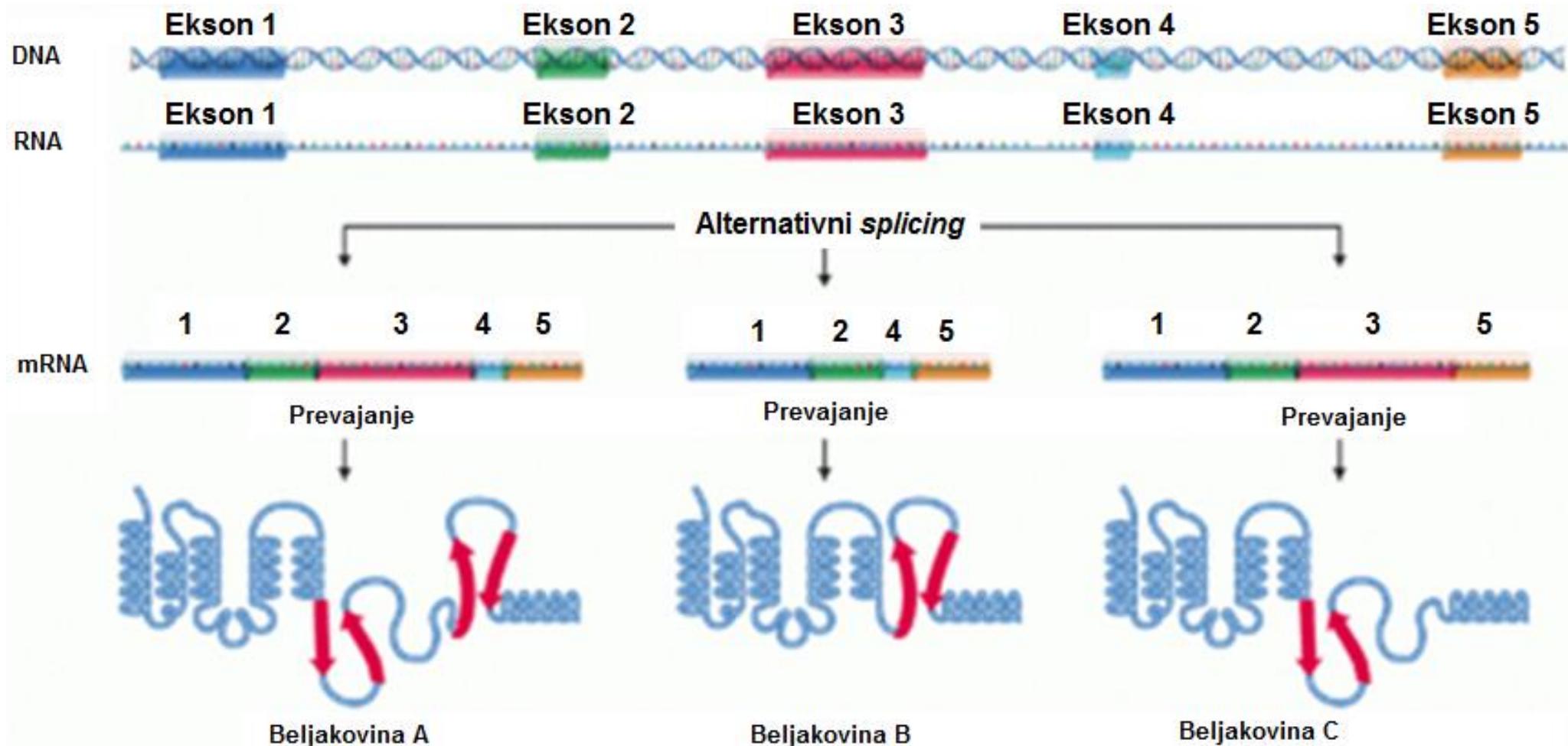


- Ob vsaki delitvi **ena celica** ohrani značilnosti izvorne celice, druga se diferencira.
- Na koncu dobimo **več različnih diferenciranih celic**.
- Med temi je tudi **ena matična mišična celica**, ki se bo v primeru druge poškodbe spet aktivirala.

Različni načini izrezovanja intronov omogočajo nastanek različnih beljakovin

- V različnih tkivih se odvija različno izrezovanje intronov (***alternativni splicing***):
→ iz enega gena lahko nastanejo različni končni m-RNA in torej različni proteini.
- Znanstveniki ocenjujejo, da lahko poteka *alternativni splicing* pri več kot polovici človeških genov.
- *Alternativni splicing* močno povečuje število različnih beljakovin, ki jih lahko izdelajo človeške celice.
- **Primer:** z *alternativnim splicingom* lahko človeško telo sintetizira 10^{15} različnih protiteles.

Alternativni *splicing*

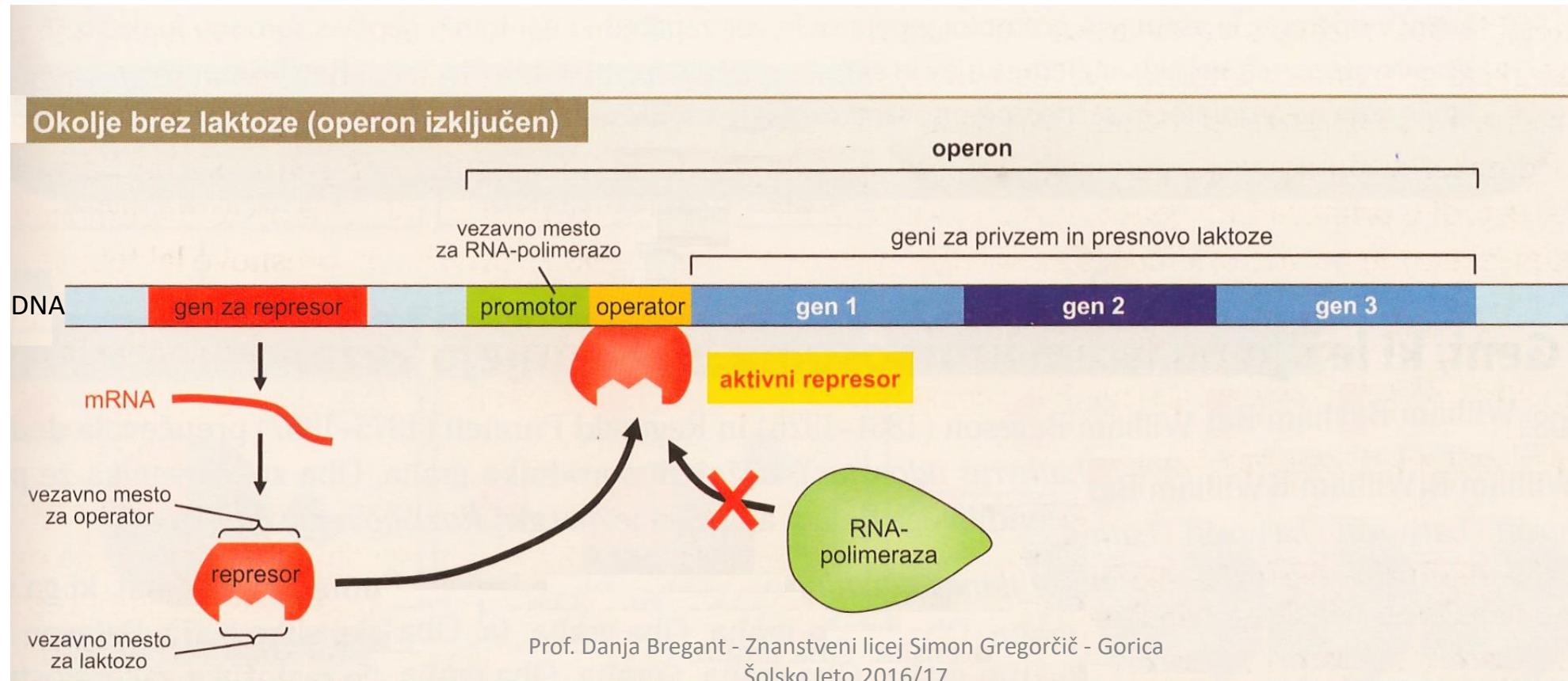


Uravnavanje genskega izražanja v bakterijah

- Pri evkariontih ima **vsak gen svoj promotor**, pri bakterijah pa ima pogosto **več genov skupni promotor**.
- Med promotorjem in geni je še poseben odsek DNA, **operator**.
- Operator deluje kot **nadzorno stikalo** za vklop ali izklop genov.
- Skupino zaporedno nanizanih genov skupaj z njihovim **promotorjem** in **operatorjem** imenujemo **operon**.

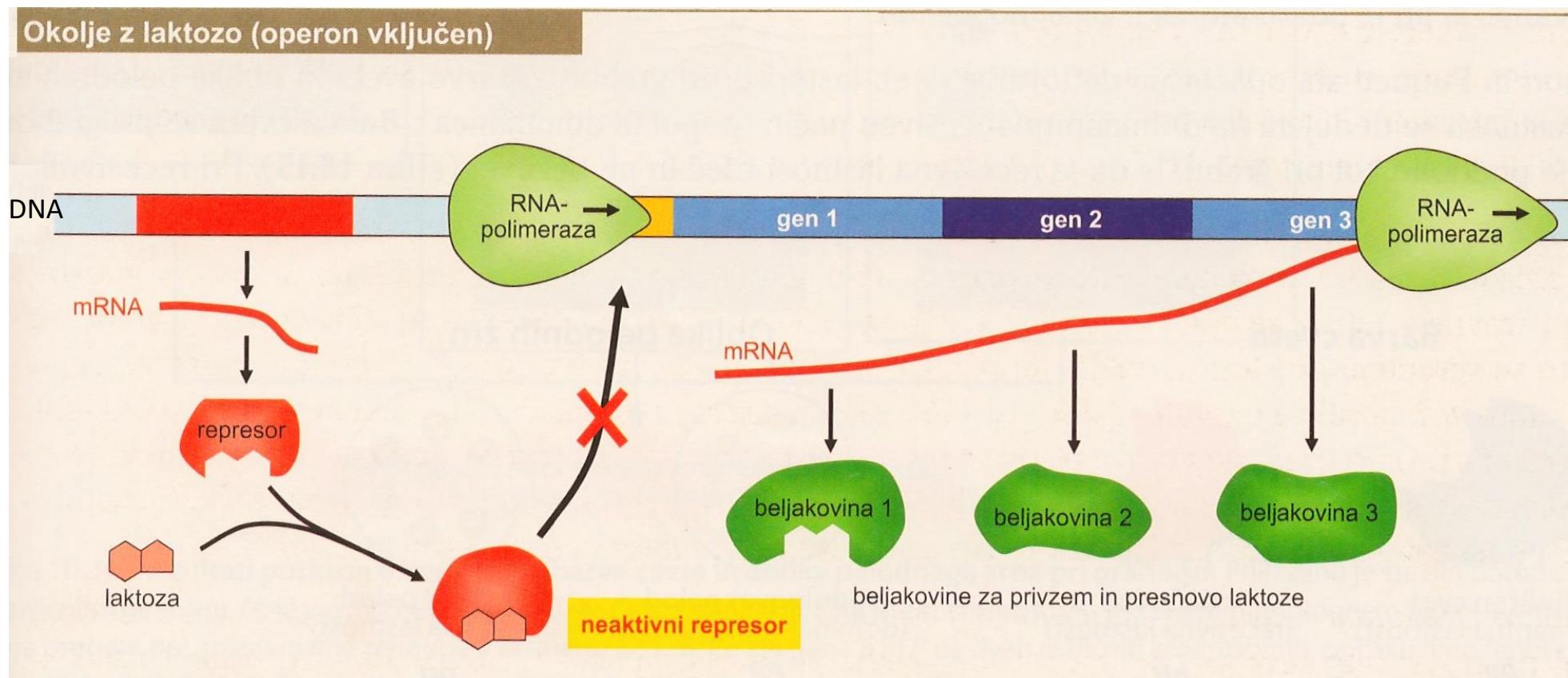
Uravnavanje izražanja genov v *lac*-operonu

- V okolju brez laktoze se represor veže na operator in onemogoči prepis genov 1, 2 in 3 za privzem in presnovo laktoze.



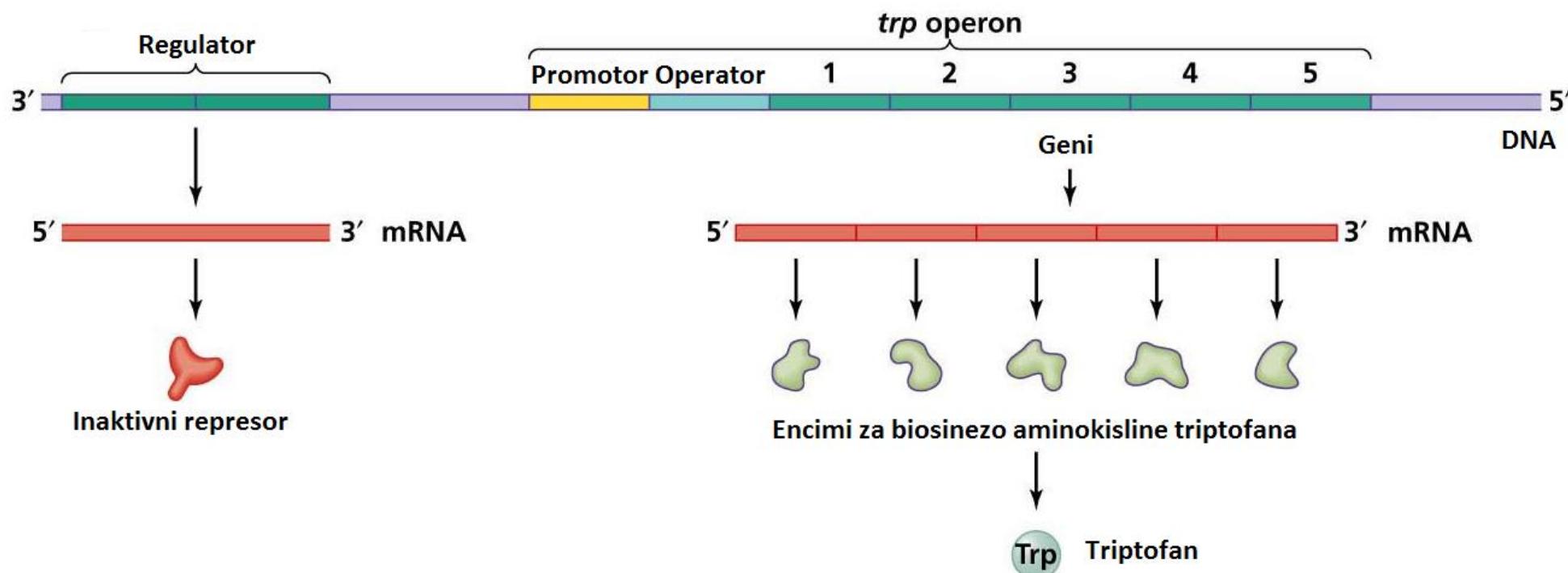
Uravnavanje izražanja genov v *lac*-operonu

- V okolju z laktozo se laktoza veže na represor in mu spremeni obliko.
- Represor se ne more vezati na operator.
- RNA polimeraza se veže na promotor in začne s preispisvanjem genov 1, 2 in 3 za privzem in presnovo laktoze.



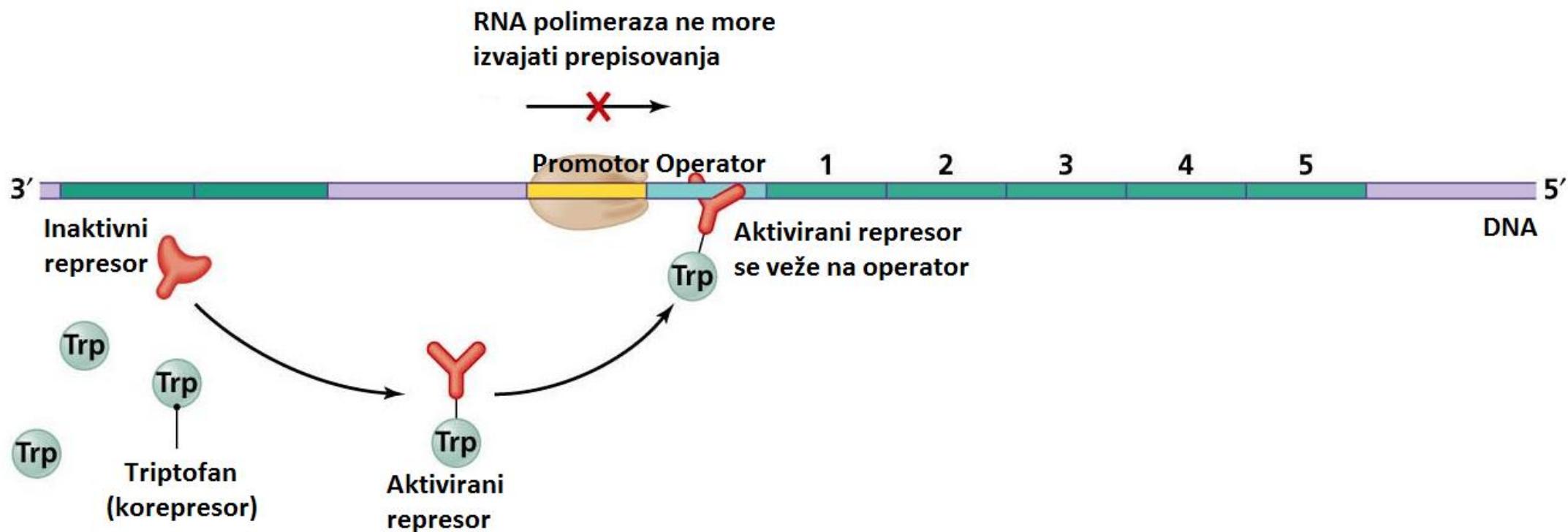
Uravnavanje izražanja genov v *trp*-operonu

- Triptofanski operon je iz petih genov z informacijami za pet polipeptidov, ki katalizirajo biosintezo aminokisline triptofana.
- Ko **triptofana ni v okolju**, je represor inaktiv, zato prepis steče in nastanejo encimi za biosintezo triptofana.



Uravnavanje izražanja genov v *trp*-operonu

- Ko je triptofan prisoten, se veže na inaktivni represor in ga aktivira.
- Aktivirani represor se veže na operator, zato prepis ne steče.

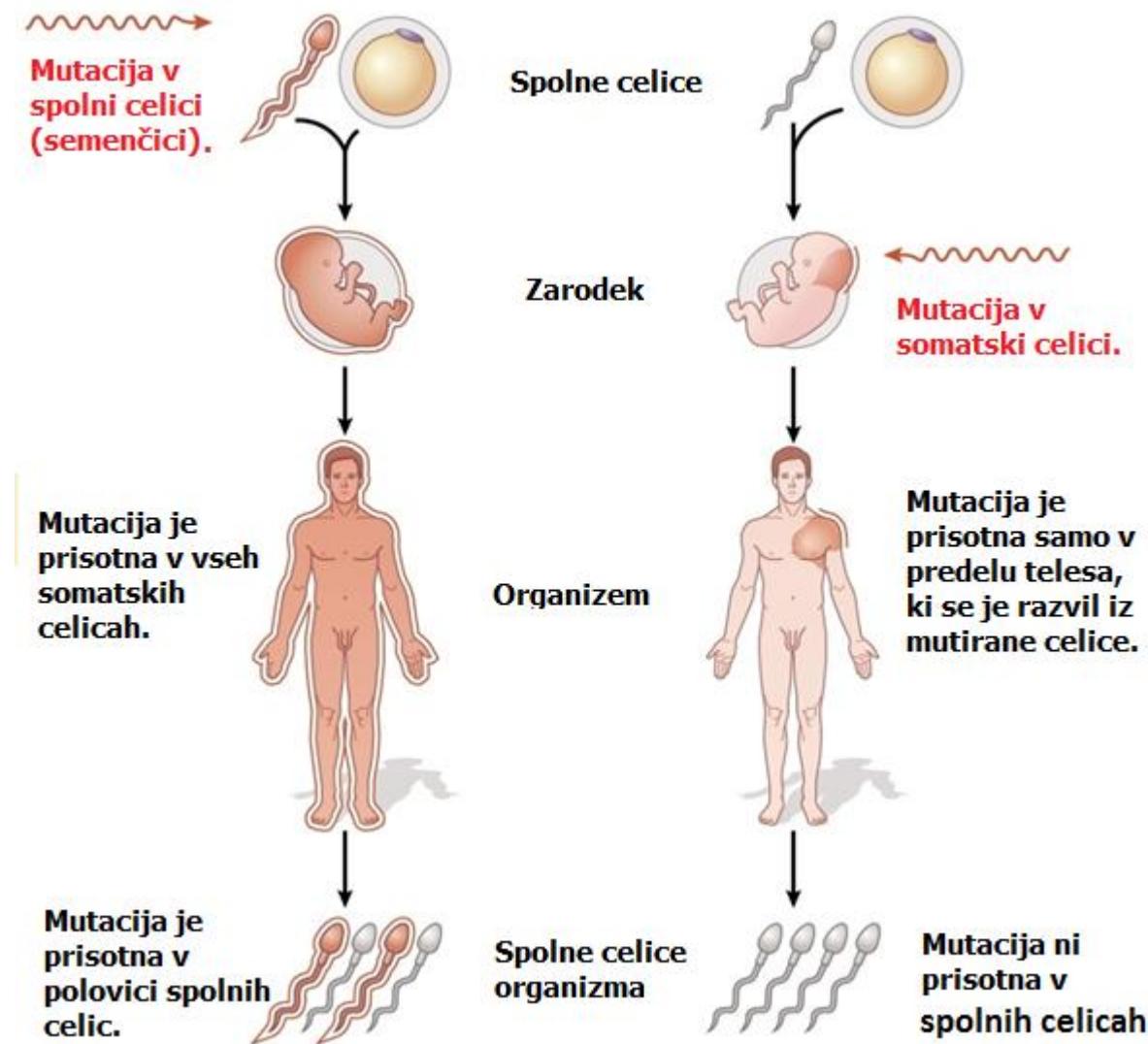


MUTACIJE SPREMINJAJO POMEN GENOV

Mutacija je sprememba zaporedja ali števila nukleotidov v DNA

- Spremembra DNA povzroča spremembo v delovanju določene dejavnosti.
- V DNA so sicer prisotni geni, ki so odgovorni za popravljanje mutacij, a če se pojavi mutacija tudi v teh genih, popravljalni mehanizmi ne delujejo več.
- Mutacije delimo na:
 - Somatske mutacije: nastajajo v somatskih celicah in niso dedne;
 - Zarodne mutacije: nastajajo v spolnih celicah in so dedne.

Somatske in zarodne mutacije



Mutacije lahko povzročijo nastanek tumorja

- Če se pojavi **mutacija v genih**, ki **kontrolirajo delitev celic**, se bodo začele celice nenadzorovano deliti, kar pomeni nastanek **tumorja**.
- Geni, ki **kontrolirajo delitev celic** so:
 - **proto-onkogeni** – aktivirajo **fiziološko delitev celic** (rast, celjenje ran, zamenjava odmrlih celic)
 - **onkosupresorji** – stimulirajo **apoptozo spremenjenih celic**.

Vrste mutacij

- Razlikujemo tri tipologije mutacij:
 - **točkaste mutacije** – sprememba samo enega nukleotida;
 - **strukturne kromosomske mutacije** – sprememba strukture kromosoma;
 - **številčne kromosomske mutacije ali genomske mutacije** – sprememba števila kromosomov.

Točkaste mutacije

- Poznamo dve vrsti točkastih mutacija:
 - **zamenjava** nukleotida
 - **vrijenje** ali **izbris** nukleotida.

Točkaste mutacije - zamenjava nukleotida

■ Smiselna mutacija

- zamenjava aminokisline (npr. anemija srpastih eritrocitov)
- zamenjava aminokisline brez posledic (ker ni v katalitsko aktivnem centru)

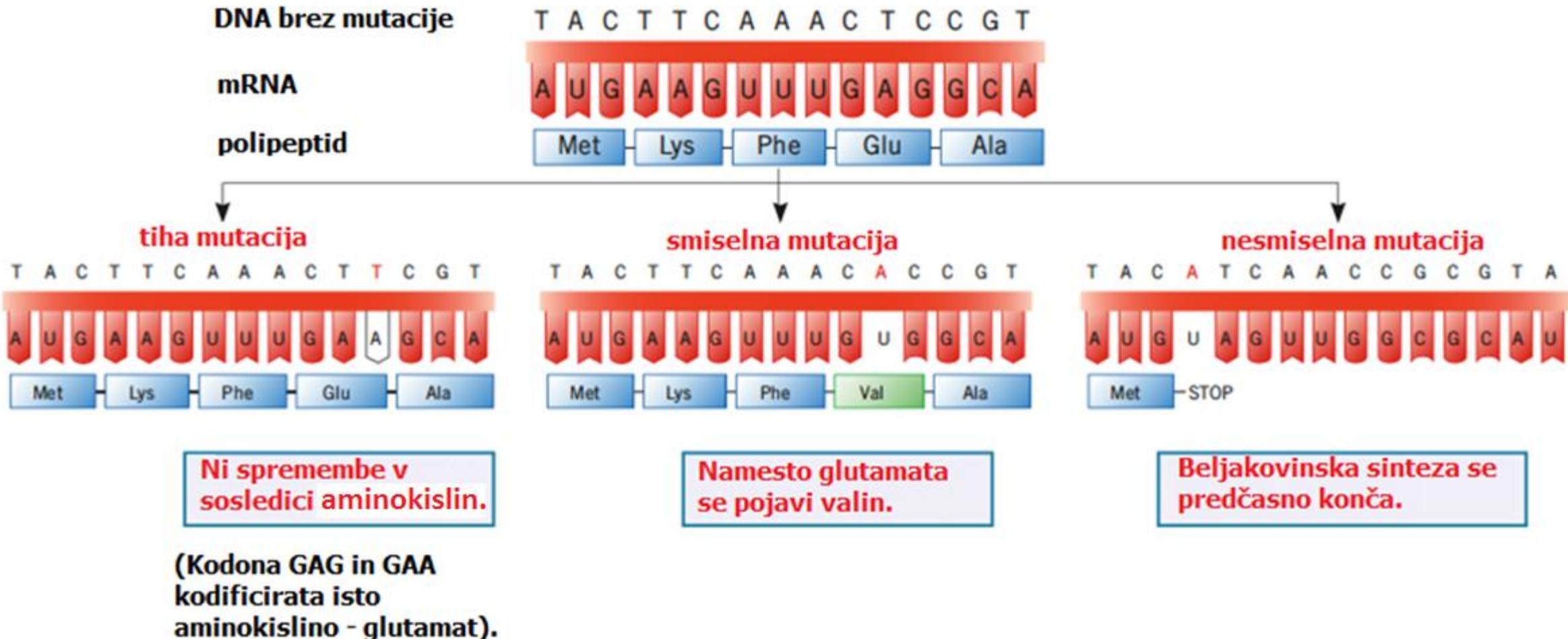
■ Nesmiselna mutacija

- nastanek STOP kodona: beljakovinska sinteza se predčasno konča: nastane nepopolna in nefunkcionalna beljakovina (npr. Duchenne mišična distrofija);

■ Tiha mutacija:

- aminokislina ostane ista (zaradi degeneracije genskega koda).

Točkaste mutacije - zamenjava nukleotida

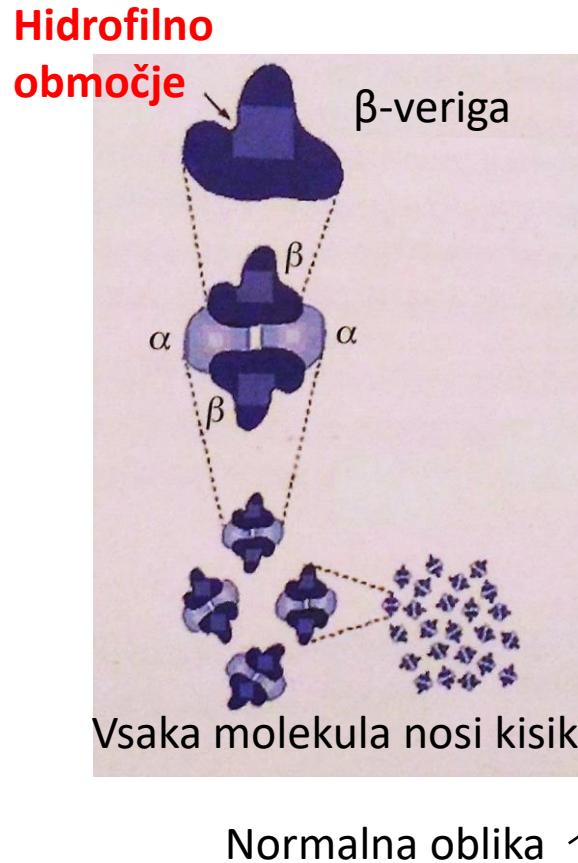


Posledica zamenjave ene aminokisline v β -verigi hemoglobina

Del normalne β -verige hemoglobina



Primarna zgradba
(zaporedje aminokislin)



Del β -verige hemoglobina v srpastih eritrocitih

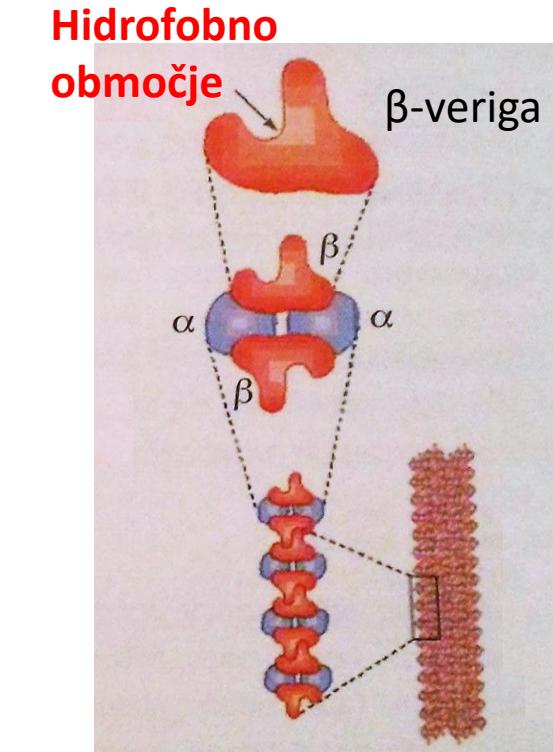


Sekundarna in terciarna zgradba
(zvita veriga aminokislin)

Kwartarna zgradba (štiri podenote)

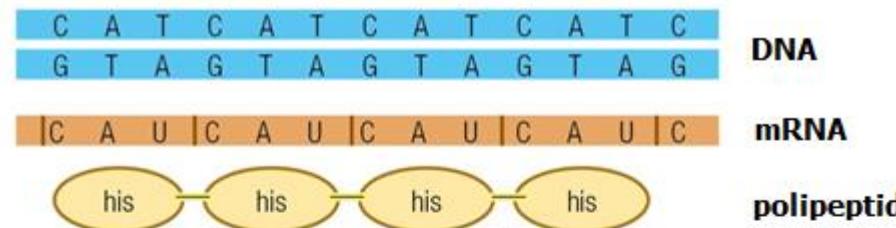
Delovanje

Oblika eritrocita

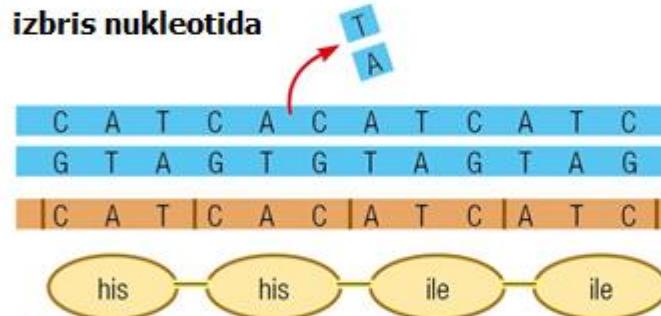


Točkaste mutacije – vrinjenje ali izbris nukleotida

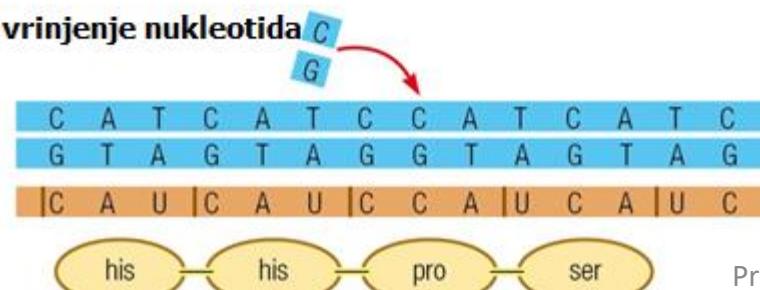
A normalna molekula DNA



B izbris nukleotida

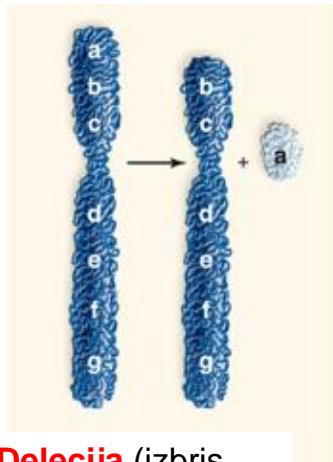


C vrinjenje nukleotida

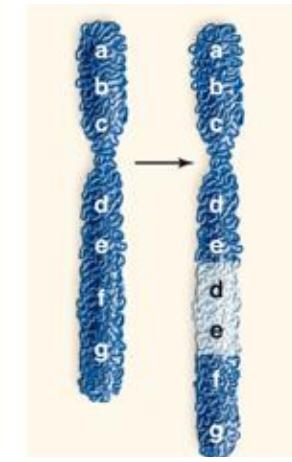


- Vrinjenje ali izbris nukleotida povzroči **spremembo čitalnega okvira**.
- Rezultat je popolnoma **različna** in **nefunkcionalna** beljakovina.

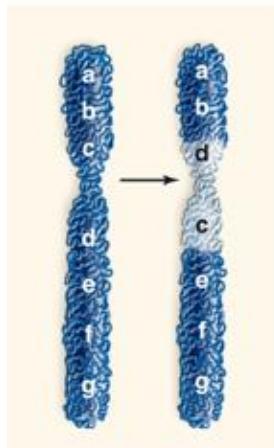
Struktурне kromosomske anomalije



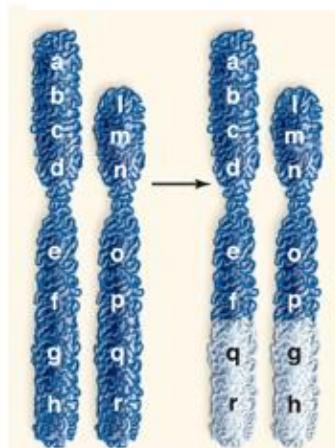
Delecija (izbris dela kromosoma)



Duplikacija (podvojitev dela kromosoma)



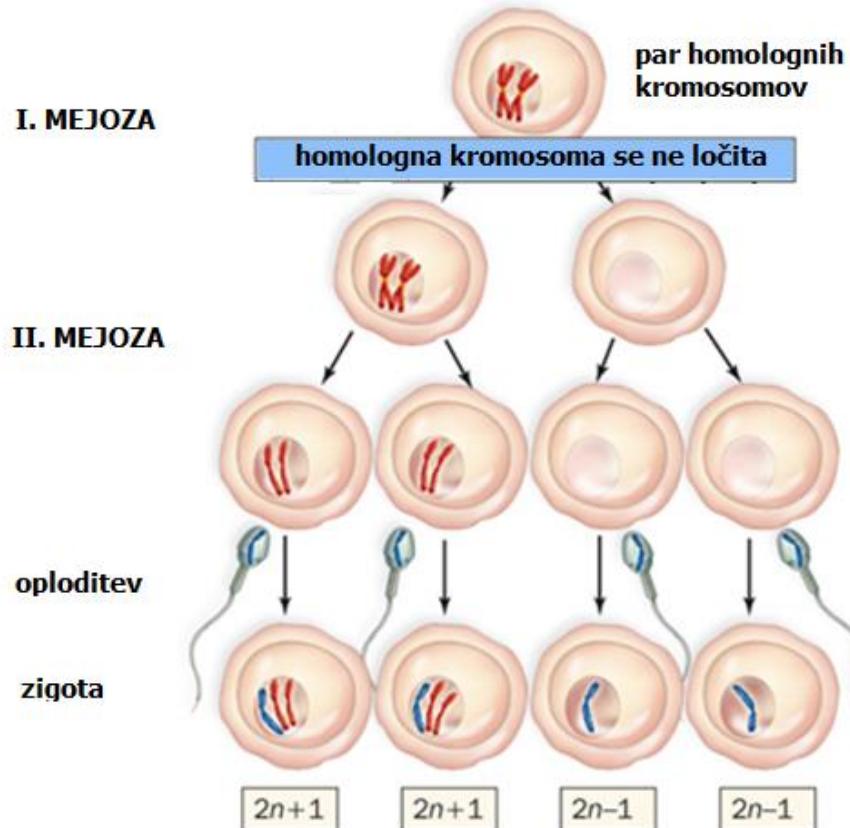
Inverzija (spremembra vrstnega reda delov kromosoma)



Trazlokacija (izmenjava delov kromosoma med dvema kromosomoma)

Slika prikazuje štiri možne mehanizme **struktturnih kromosomskeih mutacij**.

Številčne kromosomske mutacije



- Nepravilno število kromosomov je lahko posledica napake v *mejozi*.
- Ko ima organizem samo en kromosom določenega tipa, govorimo o **monosomiji** ($2n-1$).
- Kadar ima organizem tri kromosome določenega tipa, govorimo o **trisomiji** ($2n+1$).
- Najbolj verjeten razlog za te anomalije je **pomanjkanje ločitve** homolognih kromosomov med I. mejozo.
- Lahko pride tudi do pomanjkanja ločitve sester kromatid med II. mejozo.

Primeri številčnih kromosomskih mutacij pri človeku

- Za **Downov sindrom** je značilna **trisomija 21** (=dodaten kromosom 21). Z **naraščanjem starosti matere (nad 35 let)** se močno povečuje verjetnost, da bo imel otrok Downov sindrom.
 - Značilnosti: okrogel obraz, s kožno gubo v notranjem kotičku očesa, sploščen nos, nepravilni zobje, nizka postava, okvare srca, duševna zaostalost.
- **Turnerjev (X0) in Klinefelterjev (XXY, XXXY, XXYY) sindrom** sta posledica nepravilnega števila spolnih kromosomov.
 - **Turnerjev sindrom**: ženska z nizko postavo, sterilna, brez menstruacije.
 - **Klinefelterjev sindrom**: sterilni moški z nenavadno majhnimi modi; pogosto ima povečane dojke, lahko je duševno prizadet.

Vzroki mutacij

Spontane mutacije (brez zunanjega vzroka)

- Napake DNA polimeraze pri podvojevanju DNA.
- Prosti radikali (produkti normalnih metabolnih procesov).
- Spremembe v strukturi nukleotidov → nepravilno parjenje med podvojevanjem DNA.
- Sprememba pH v celici → keto-enolna in amino-iminska tavtomerija dušikovih baz.
- Vključevanje transpozonov (kratkih odsekov DNA) v različne točke genoma.

Inducirane mutacije (mutagena sredstva)

- Kemijske snovi, npr. benzopiren v cigaretnem dimu.
- Žarki γ, X, UV.

Primer spontane točkaste mutacije: tavtomerija dušikovih baz

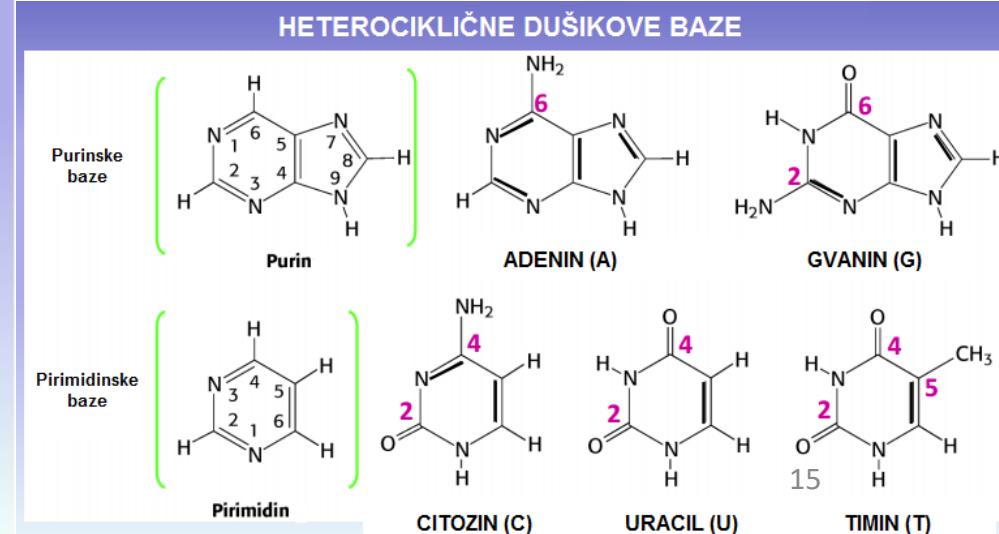
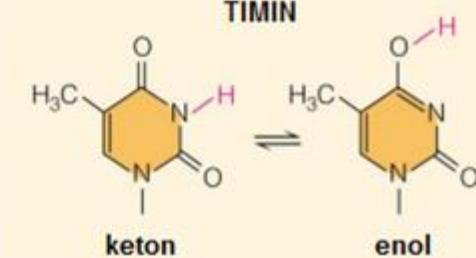
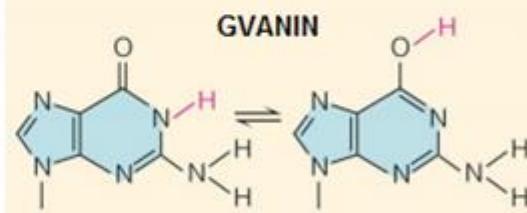
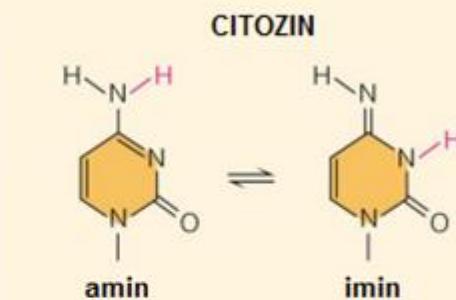
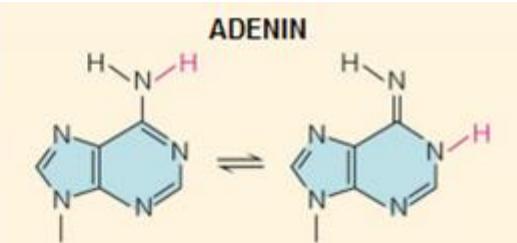
KETO-ENOLNA in AMINO-IMINSKA TAVTOMERIJA DUŠIKOVIH BAZ

ADENIN in **CITOZIN** lahko obstajata v dveh različnih oblikah: **aminski** in **iminski**.

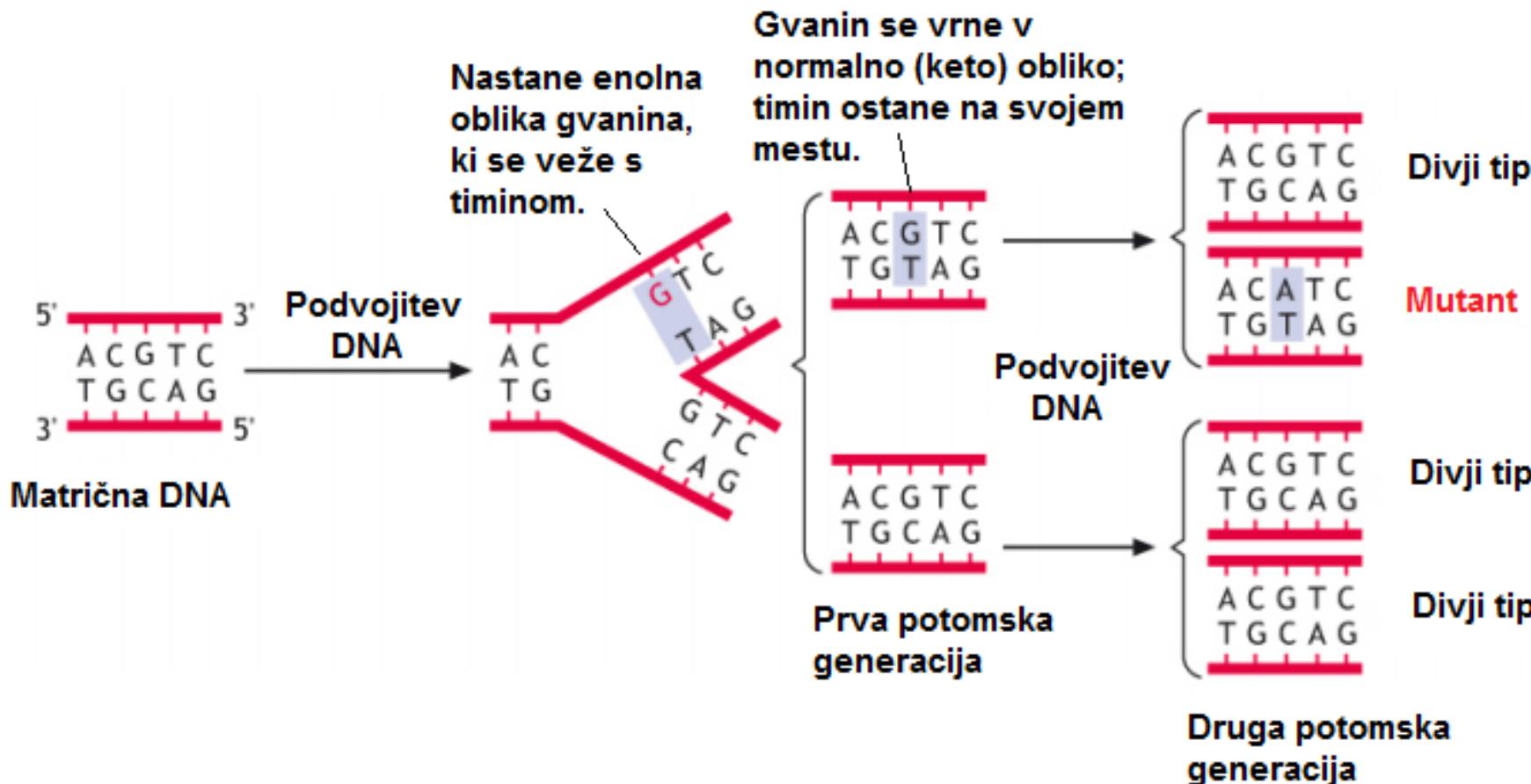
GVANIN in **TIMIN** lahko obstajata v dveh različnih oblikah: **ketonski** in **enolni**.

Ravnotežju med oblikama pravimo **TAVTOMERNO RAVNOTEŽJE**, oblikama pa **TAVTOMERA**. Sprememba ravnotežja odvisi od vrednosti pH.

V celicah je pH približno 7. Pri tem pH prevladujeta **aminska** in **ketonska** oblika.



Primer spontane točkaste mutacije: keto-enolna tautomerija gvanina



Transpozoni

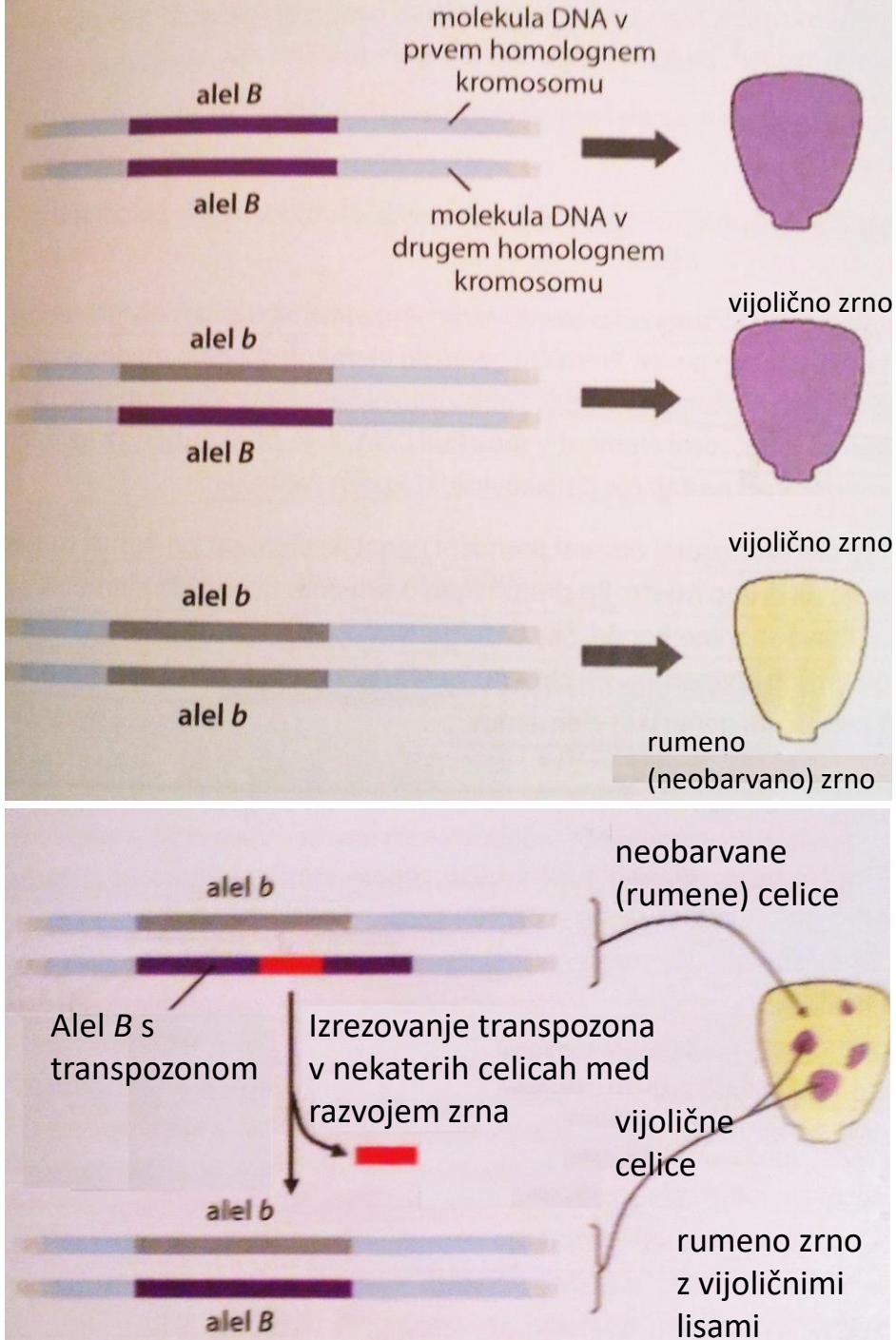
- Transpozoni ali „skakajoči geni“ so gibljivi genetski elementi, ki jih je leta 1944 odkrila Barbara McClintock.
- Transpozon je segment DNA, ki je sposoben transpozicije: lahko se premešča z enega na drugi konec istega kromosoma ali pa na drug kromosom.



- Transpozoni so povzročitelji spontanih mutacij:
 - lahko **zaustavijo prepisovanje genov**,
 - lahko povzročajo **struktурне kromosomske mutacije**.

Transpozoni

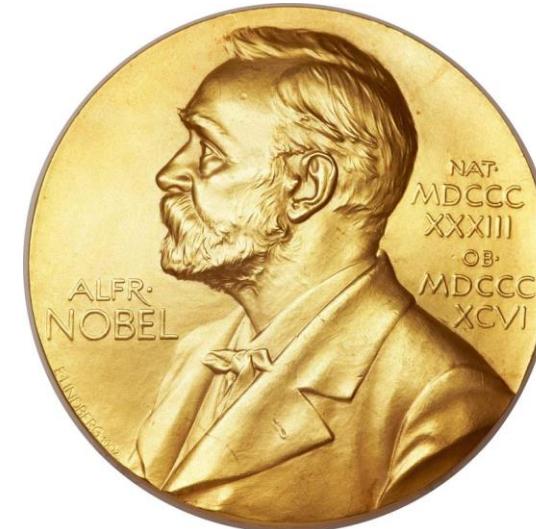
- Skakajoči gen se lahko vstavi v nek drug gen, nato pa se iz njega spet izreže.
- To je **Barbara McClintock** ugotovila pri opazovanju koruze:
- Koruza ima običajno vijolična zrna (dominantna lastnost), ali rumena zrna (recesivna lastnost).
- Barbara McClintock je pri nekaterih križancih opazila pojav rumenih zrn z vijoličnimi lisami.
- Prišla je do zaključka, da se je med razvojem zrna v nekaterih celicah pojavil transpozon v alelu za vijolično barvo, kasneje pa se je izrezal.



Barbara McClintock

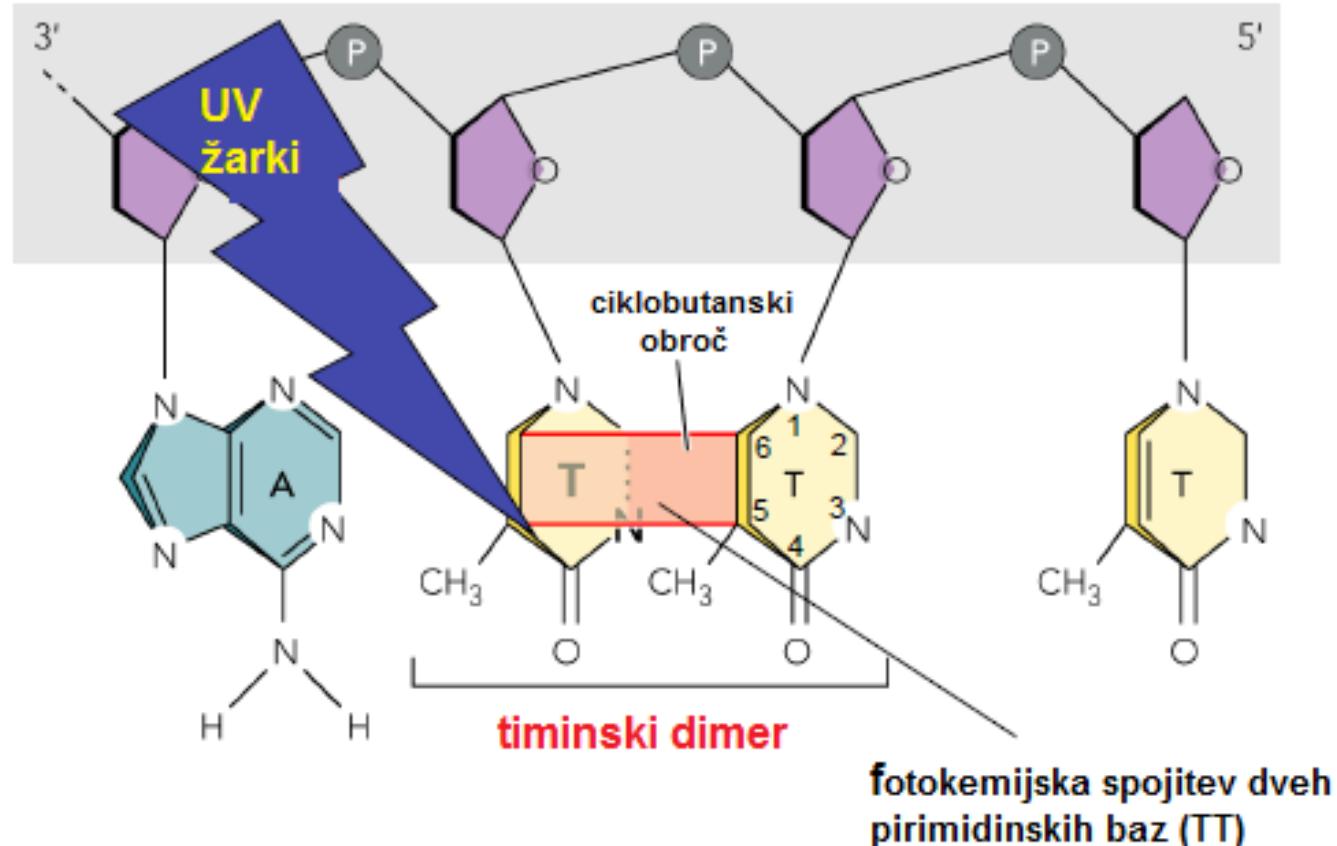


Agilent Technologies



Nobelova nagrada 1983

Primer inducirane mutacije: nastanek timinskega dimera zaradi obsevanja z UV



Timinski dimeri ne morejo tvoriti vodikovih vezi s komplementarnimi bazami, zato se podvojevanje DNA ali prepisovanje mRNA prekine.

Kopičenje mutacij in incidenca raka

- Za nastanek raka se mora nakopičiti več mutacij v celici:
 - incidenca raka narašča s starostjo;
 - mutacije se morajo kopičiti preden izbruhne rak;
 - pri rakih, ki jih povzročajo okoljski dejavniki, je časovni zamik od izpostavljenosti dejavnika do nastanka raka velik (pri kadilcu npr. 30 let);

Mutacije, ki privedejo do nastanka raka

- **Razvoj raka je večstopenjski proces.**
- Pri mnogih celicah so dokazali, da **se rak razvije** preko **hiperplazije** (proliferacije celic) in **adenoma** (polipa) v **karcinom** (maligni tumor).
 - Najprej pride do **mutacije gena APC**, kar privede do **hiperplazije**.
 - Potem pride do **aktivacije RAS onkogena**, kar privede do nastanka **adenomov**.
 - Po **izgubi tumorsko supresorskega gena p53** preide adenom v **karcinom**.

Dedni raki

- Za **dedne rake** je značilno, da **se pojavljajo pogosteje v določenih družinah** in da se pojavljajo raje **pri mlajših osebah**.
- To pa zato, ker so **te osebe že podedovale eno mutacijo** in imajo **več kot 85 % možnosti**, da bo prišlo še do **mutacije drugega alela**.
- Pri osebi, ki ni podedovala okvarjenega gena, mora priti najprej do ene spontane mutacije, po tem pa še do spontane mutacije v drugem alelu, kar je relativno redko.

Rak zaradi kajenja

- V tobačnem dimu je prisotnih več kot **60 različnih pro-kancerogenov**, ki se **ob vstopu v telo razvijejo v kancerogene dejavnike**.
- Po približno **15 pokajenih cigaretah** pride do **ene mutacije**, ki se vgradi v genom.
- Ob **zmerni izpostavljenosti kancerogenom**, lahko celice te mutacije **popravljajo**.
- Če pa so prisotne **prirojene/pridobljene napake popravljanja** se lahko razvije **rak**.

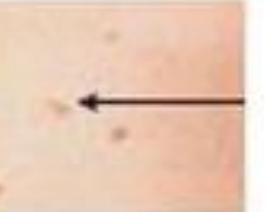
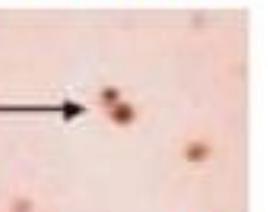
Nastanek melanoma

- Celice imajo sposobnost popravljanja DNA z **izrezovanjem timinskih dimerov**.
- **Zapis za ta mehanizem** nosi 7 genov XP (*kseroderma pigmentosum*).
- Če so **ti geni mutirani**, lahko ob izpostavljenosti UV žarkom, pride do nastanka kožnega raka - **melanoma**.

Metoda A B C D E za odkrivanje melanoma

- Črke **A B C D E** so **začetnice angleških pojmov**, ki opredeljujejo **nevarno pigmentno znamenje**.
- **A – Asymmetry**, kar pomeni, da so nevarna znamenja **asimetrična**.
- **B – Border**, kot meja znamenja, kar pomeni, da je znamenje **nepravilno omejeno**, včasih celo omejeno **odsekano** ali ga **en del manjka**.
- **C – Color**, kar pomeni, da je nevarno znamenje **večbarvno**. Treba je vedeti, da je **ena izmed barv** večbarvnega znamenja skoraj zanesljivo **črna** in ta črnina praviloma **ni umeščena v sredino** znamenja, ampak sega na rob ali celo zunaj roba.
- **D – Dimension** ali **premer**. Praviloma so znamenja ali melanomi **večji od pol centimetra** v premeru. Če ga odkrijemo, ko je velik 6 - 7 mm, je to še absolutno pravočasno.
- **E – Evolution** ali **razvoj**. Znamenje se v času **spreminja v velikosti, obliku in barvi**.

Metoda A B C D E za odkrivanje melanoma

	A Asymmetry	B Border	C Color	D Diameter	E Evolving
NORMALNO PIGMENTNO ZNAMENJE					
	Simetrična oblika	Pravilno omejeno	Enabarvno	Manjše od 0,6 cm	Nespreminjajoče oblika, barva in velikost
MELANOM					
	Nesimetrična oblika	Nepravilno omejeno	Večbarvno	Večje od 0,6 cm	Spreminjajoče oblika, barva in velikost

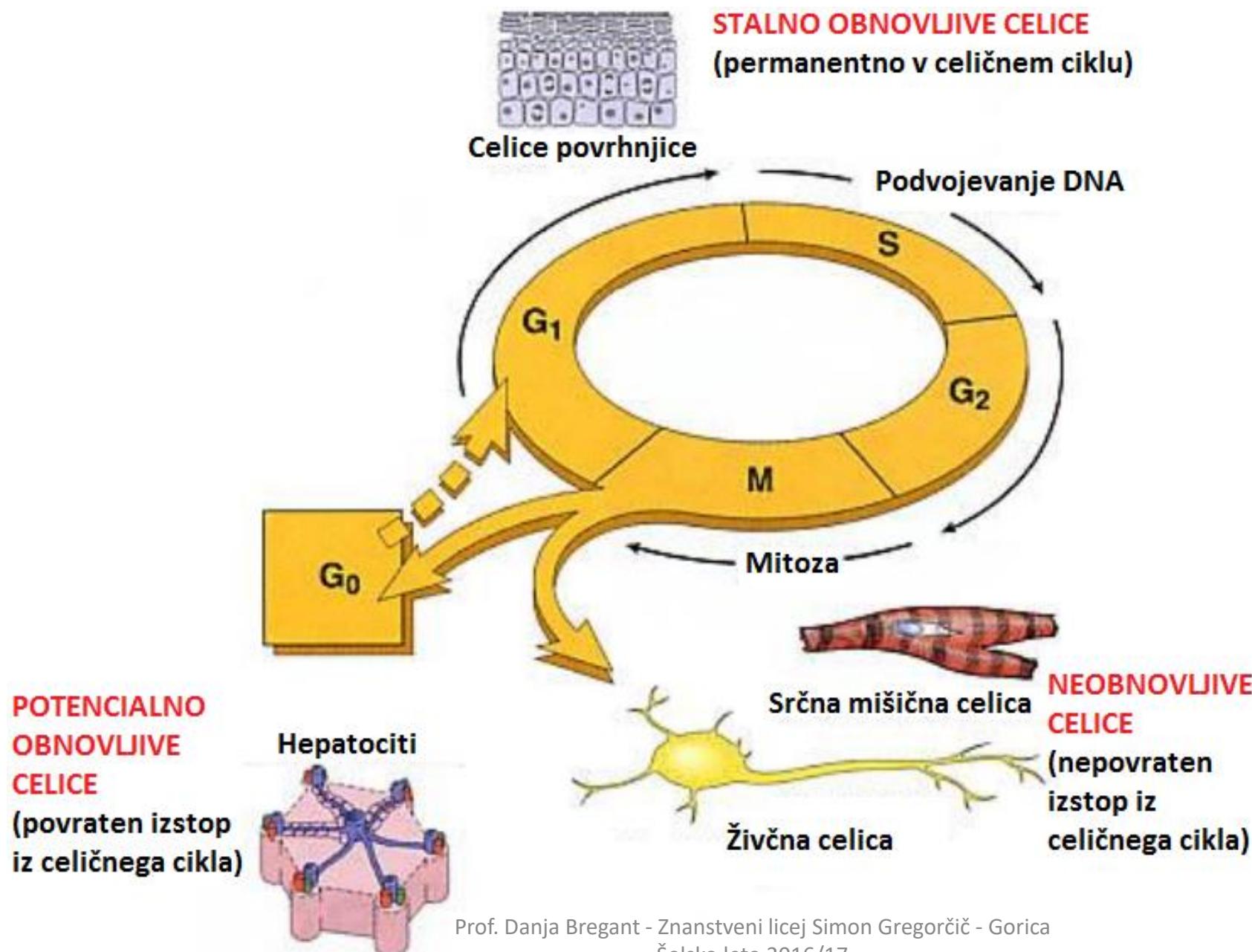
Nastanek črevesnega raka in raka dojk

- Če je **okvarjen sistem za popravljanje napak po replikaciji** lahko pride do **raka širokega črevesja**.
- Če se **okvarita gena BRCA1 in BRCA2**, ki nosita zapis za **popravljanje lomov verig DNA pri replikaciji**, pride do **raka dojk**.

Obnavljanje celic v odraslem organizmu

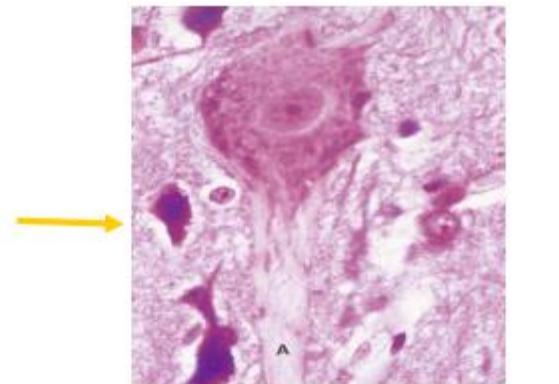
Sposobnost obnavljanja celic

- Glede sposobnosti obnavljanja, delimo celice na tri kategorije:
 - **Neobnovljive celice** – nepovraten izstop iz celičnega cikla - faza G_0 je permanentna.
 - **Potencialno obnovljive celice** – povraten izstop iz celičnega cikla - faza G_0 je dolga.
 - **Stalno obnovljive celice** – ni izstopa iz celičnega cikla - faza G_0 je odsotna ali povraten izstop iz celičnega cikla - faza G_0 je kratka.



Neobnovljive celice

Živčne celice



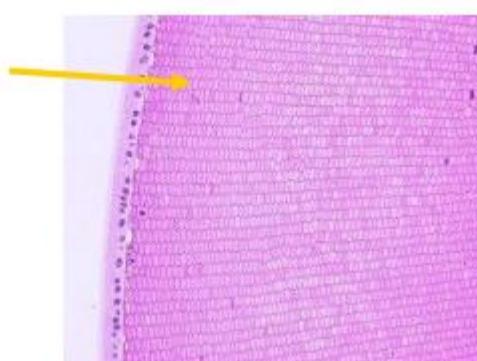
Celice srčne mišice



Celice skeletne mišice

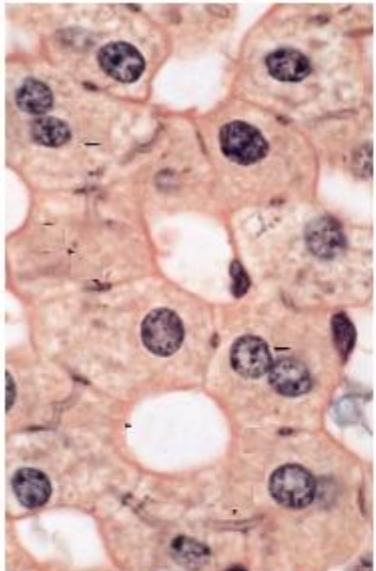


Celice očesne leče

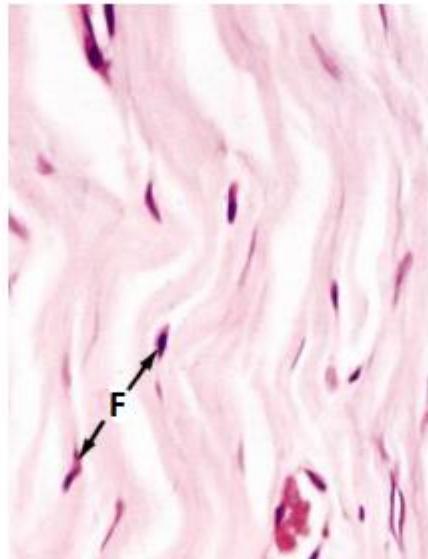


- So dokončno diferencirane celice.
- Se ne razmnožujejo.
- Se ne obnavljajo.
- Imajo dolgo življenje.

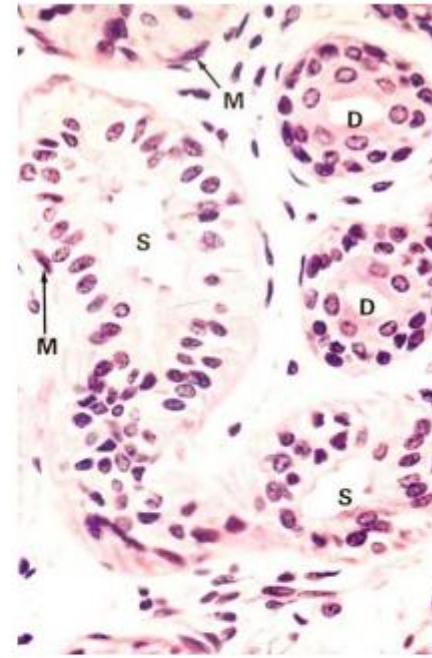
Potencialno obnovljive celice



Hepatociti
(jetrne celice)



Fibroblasti
(celice vezivnih tkiv)



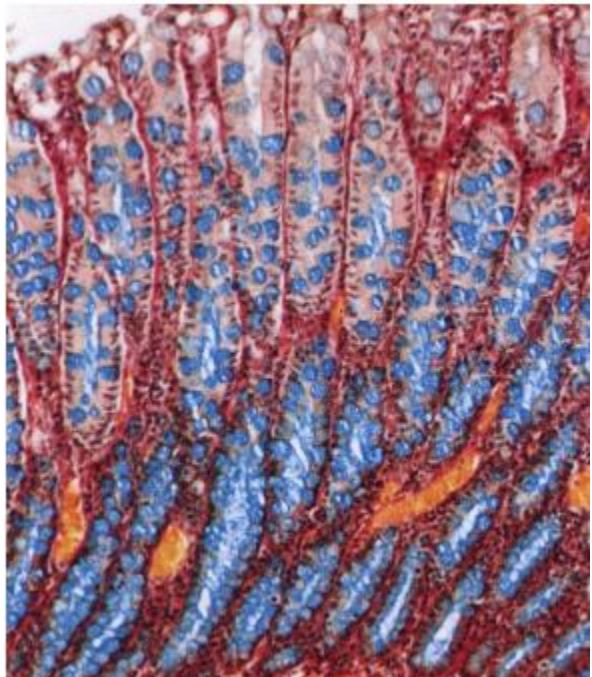
Žlezni epiteli



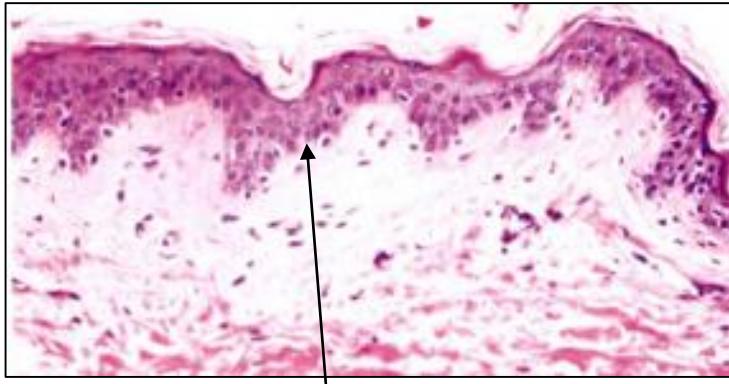
Endotelne celice
(ploščate epitelne celice, ki tvorijo
notranjo plast žilne stene)

- Se ne delijo stalno.
- V celični cikel se povrnejo zaradi pomanjkanja celic ali ob ustreznih dražljajih.
- So diferencirane.
- Pri delitvi proizvajajo dve enaki hčerinski celici.

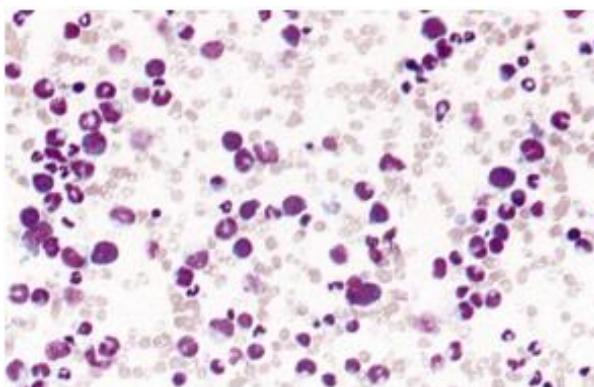
Stalno obnovljive celice



Celice črevesnih resic



Celice v zarodni
plasti povrhnjice



Mezenhimalne celice
v kostnem mozgu

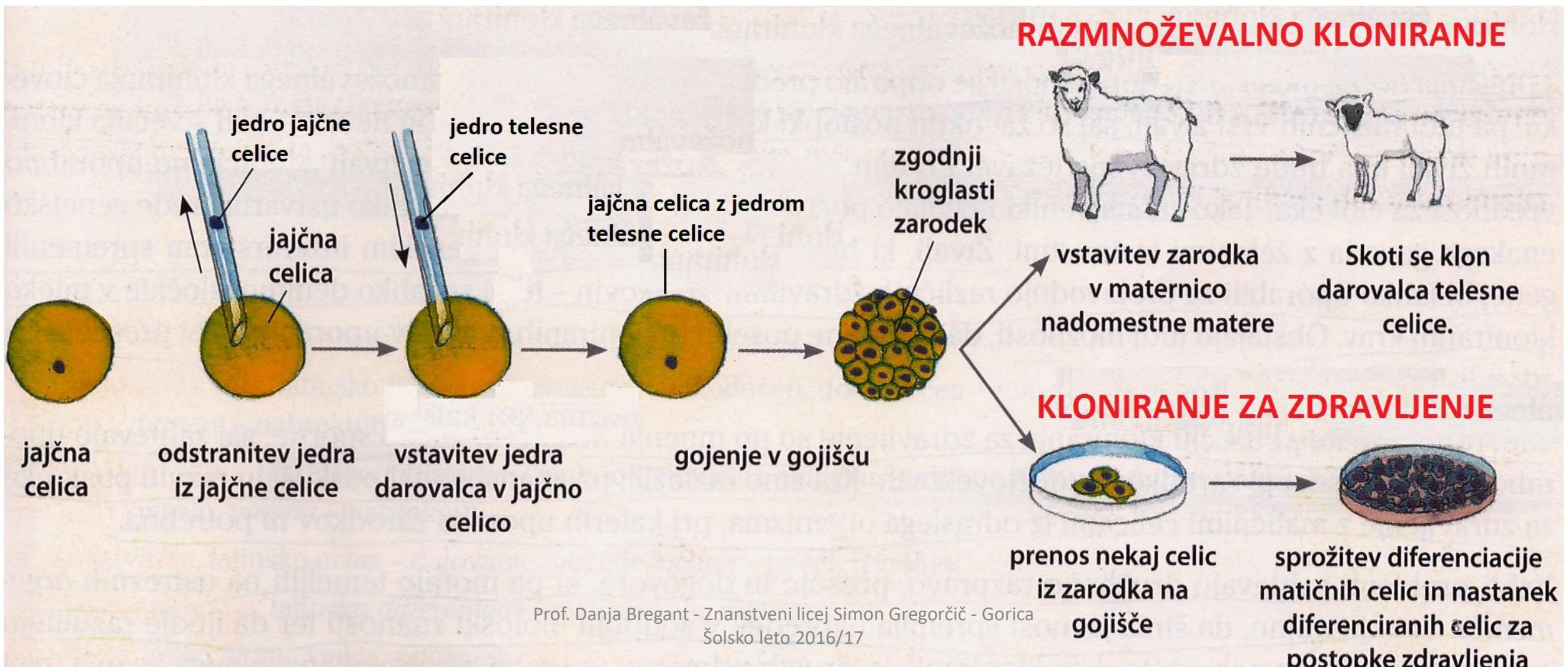
- Niso diferencirane.
- Se **stalno razmnožujejo**.
- Razmnoževanje je **asimetrično**: ena hčerinska celica ostane **nediferencirana**, druga preide v **diferenciacijo**.
- So številnejše v tkivih s hitro celično zamenjavo.
- Prisotne so v koži, požiralniku, tankem črevu, vohalnem epitelu, mlečnih žlezah, kostnem mozgu.

Kloniranje

Kloniranje

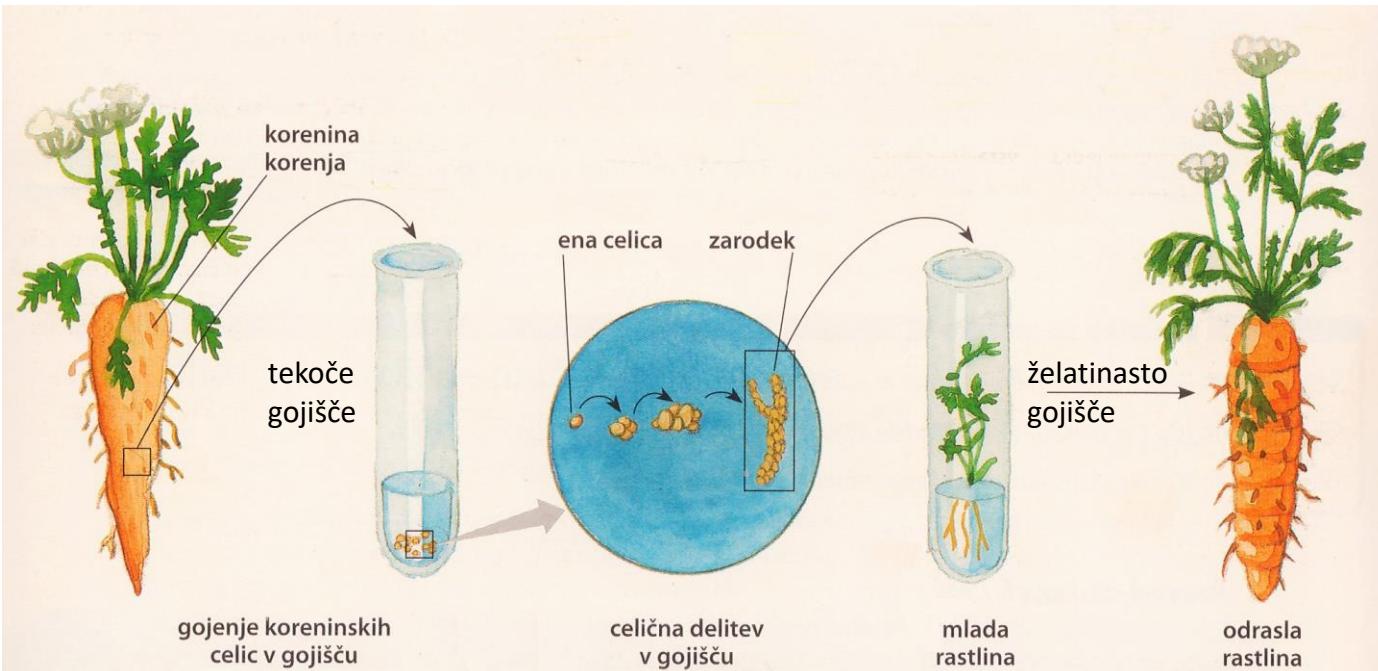
- Kloniranje je postopek **nespolnega razmnoževanja**, pri katerem je **novo nastala celica** oz. osebek (**klon**) genetsko **identičen** izvorni celici oz. osebku.
- Glede na namen razlikujemo:
 - **reproaktivno kloniranje**, kadar želimo narediti nov živ individuum, ki bo enak tistemu, ki ga kloniramo;
 - **terapevtsko kloniranje**, kadar se razvoj kloniranega zarodka ustavi že v epruveti in se njegove **celice uporabijo** za **proizvodnjo** novih **celic, tkiv** in **organov**.
 - S tem postopkom se lahko pridobijo zarodne matične celice, iz katerih je možno izdelovati tkiva in organe **brez nevarnosti zavrnitve organizma**, saj gre za **celice z enakim genskim zapisom**.

Razmnoževalno kloniranje in kloniranje za zdravljenje



Kloniranje rastlin

- Leta 1958 je britanski biolog Frederick C. Steward dokazal, da ima vsaka rastlinska celica, čeprav diferencirana, sposobnost, da se razvije v celo rastlino, ki vsebuje različna tkiva.
- **Diferenciacija celic torej ni nepovraten proces!**



Diferencirane celice je mogoče gojiti v epruveti na tak način, da postanejo zopet nediferencirane, da se v njih začnejo izražati geni za celično delitev in za postopno diferenciacijo novo nastalih celic.

Kloniranje živali s presaditvijo jedra

- Prvo uspešno izvedbo kloniranja sesalcev je izpeljal škotski embriolog Ian Wilmut leta **1997**, ko se je skotila **ovca Dolly**.
- Ovca Dolly je imela **tri matere**:
 - **prvo**, ki ji je darovala jedro iz celice vimena,
 - **drugo**, ki ji je darovala **jajčno celico** (kateri so zamenjali jedro)
 - in **tretjo**, ki jo je **donosila** in **skotila**.
- **Dolly** je bila **klon** prve matere, tiste, ki ji je darovala jedro (DNA) in je bila torej **njej genetsko enaka**.

Kloniranje ovce Dolly

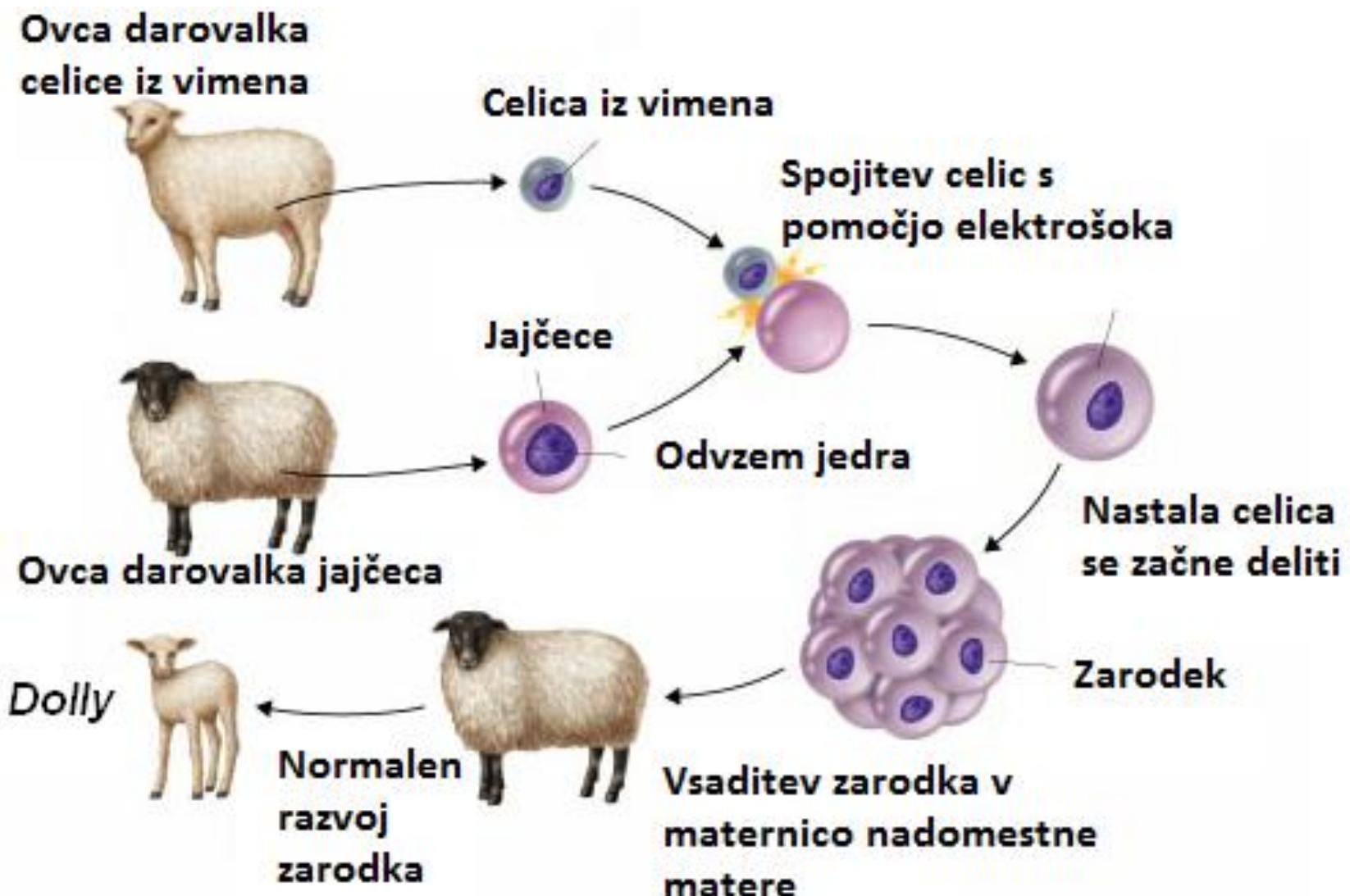
Kloniranje ovce Dolly je potekalo na sledeči način:

- Iz vimena odrasle ovce so odvzeli nekaj celic.
- Te celice so nekaj časa **gojili v epruveti**, tako da so **postale spet nediferencirane**, se pravi, da v bistvu niso bile več celice vimena, temveč bolj podobne celicam, kakršne najdemo v zarodku.
- Iz celic v gojišču so **osamili eno, ji odvzeli jedro** in ga z električnimi impulzi **spojili z neoplojeno jajčno celico** druge ovce, **kateri so pred tem odvzeli jedro**.
 - **Jajčno celico** so uporabili zato, ker vsebuje veliko **beljakovin** in **mRNA**, ki so **potrebne za razvoj zarodka** v **prvih nekaj dneh** po oploditvi. V začetku razvoja se namreč celice v zarodku podvajajo tako hitro, da ni časa za prepisovanje in prevajanje DNA; celica potrebuje ves čas za podvojevanje DNA.

Kloniranje ovce Dolly

- Jajčno celico s presajenim jedrom so spodbudili, da se je začela razvijati, kot če bi se spojila s semenčico, le da je ta celica vsebovala DNA druge odrasle ovce.
- Nastal je **zarodek**, ki so ga **vsadili v tretjo ovco**, ki jo je donosila in skotila.
- **Dolly** je živela 6 let in je bila **prvi kloniran sesalec**.
- 14. 2. 2003 so ovco Dolly uspavali, ker je bolehalo zaradi **artritisa** in **pljučnega obolenja**, ki sta **značilni za precej starejše živali**.
- To kaže, da so bile njene **celice „starejše“** od celic njenih vrstnikov.
- Njeno telo je odslej v *Museum of Scotland* v Edinburghu, Velika Britanija.

Ovca Dolly



(Ne)uspešnost metode za kloniranje živali

- Uspešnost te metode je zelo nizka.
- Škotski znanstveniki so namreč 300 jajčnim celicam zamenjali jedro in spodbudili razvoj zarodka, vendar se je le eden od njih razvil do rojstva ovce Dolly.
- Ian Wilmut opozarja, da je tveganje za razvojne nepravilnosti izredno veliko in da je tudi verjetnost uspešnega rojstva klena prav neznatna.
- V kromosomih kloniranih osebkov namreč nastajajo določene spremembe, ki porušijo normalne vzorce uravnavanja izražanja genov.
- Z isto metodo so klonirali še druge vrste sesalcev: kravo, mulo, opico, miš, svinjo, zajca, mačko in kozo.

Kloniranje živali ima potencialno uporabno vrednost za človeka

- Obstajajo tudi možnosti, da bi **organe kloniranih prašičev** uporabljali kot **presadke za zdravljenje človeka**.
- Pri tem se seveda odpirajo **etična vprašanja o dopustnosti ali nedopustnosti** kloniranja živali za zadovoljevanje človekovih potreb.

Kloniranje človeka ?

- Kloniranje človeka ni več znanstvena fantastika, temveč nekaj, kar je morda že bilo uresničeno oziroma naj bi bilo po napovedi nekaterih uresničeno v bližnji prihodnosti.
- Biologi so danes prepričani, da kloniranje človeka še ni izvedljivo.
- Raziskovalci podjetja *Advanced Cell Technology* iz Massachusettsa v ZDA so javnost obvestili, da so kot prvi na svetu klonirali človeški zarodek.
- Kaj so zares naredili?
- V jajčne celice darovalk so vključili jedro ene od celic, ki obdajajo in prehranjujejo jajčno celico med zorenjem.
- Na 71 jajčnih celic jim je uspelo dobiti 1 klon.
- V celoti so naredili le 3 klone, od katerih sta 2 preživela in se delila do 4 oziroma 6 celic, potem pa se je rast ustavila.

Etični pogledi na kloniranje človeka

- Reproduktivno kloniranje človeka postavlja **etična vprašanja** o bistvu novih človeških bitij in njihovih sorodstvenih vezi, o vlogi ženske in moškega.
- Pri **reproducivnem kloniranju** se namreč **rušijo sorodstvena razmerja** med osebami:
 - **kdo je oče, mati, sin, hči?**
- Teoretično bi bilo **možno razmnoževanje** brez moških.
- Prav tako se **popredmeti vloga ženske in novega človeškega bitja**, ki je le **kopija določene odrasle osebe z določenimi lastnostmi**.
- Pri človeškem kloniranju se nam vsiljuje tudi logika **industrijske proizvodnje človeških bitij**.
 - **Tisti, ki bi imel kapital in moč, bi odločal o tem, katere osebe so vredne, da se jih klonira...**

Prepoved reproduktivnega kloniranja človeka

- Dne 12. decembra 2001 je Generalna skupščina Združenih narodov oblikovala **Mednarodno konvencijo o prepovedi reproduktivnega kloniranja človeških bitij**.
- V Veliki Britaniji, Avstraliji in nekaterih državah ZDA je dovoljeno terapevtsko kloniranje človeka.

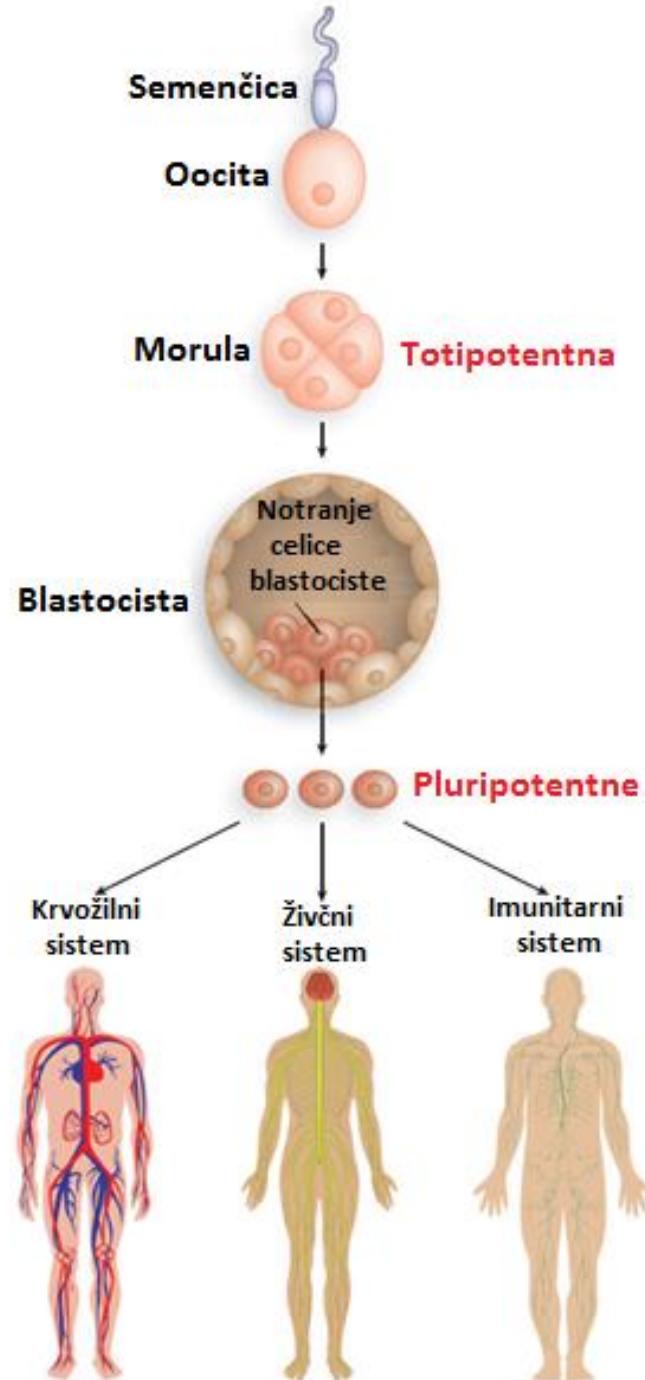
Terapevtsko kloniranje

- Drug postopek kloniranja je kloniranje za zdravljenje, pri katerem znanstveniki **iz zarodka vzamejo posamezne celice**.
 - Te celice v zgodnjem zarodku so **zarodne matične celice – nediferencirane** celice, ki **se hitro delijo** in so se sposobne diferencirati v vse celične tipe (**totipotentne**).

Vrste matičnih celic

- **Totipotentne matične celice** se lahko diferencirajo v vse celice organizma, tudi ekstraembrionalne (hranilne, oporne) (zigota, celice morule).
- **Pluripotentne matične celice** se lahko diferencirajo v skupino različnih tkiv (celice treh kličnih plasti v zarodku, **endoderm**, **mesoderm** in **ektoderm**).
 - Iz celic **endoderma** se razvijejo pljuča, jetra, prebavila in hormonalne žleze.
 - Iz celic **mesoderma** se razvijejo žile, mišice, izločala, ogrodje in spolni organi.
 - Iz celic **ektoderma** se razvijejo krovna tkiva, sluznice, živčevje in čutila.
- **Multipotentne matične celice** se lahko razvijejo v različne vrste celic, ki pripadajo istemu tkivu (npr. **ematopoietske celice** v kostnem mozgu ali **celice v popkovnični krvi**, ki se lahko razvijejo v različne vrste krvnih celic, **mezenhimalne celice** v kostnem mozgu, ki se lahko razvijejo v različne vrste vezivnega tkiva (kondrocite, osteoblaste, adipocite)).
- **Unipotentne matične celice** se lahko razvijejo v eno samo vrsto celic (npr. **hepatociti**, **celice zarodne plasti povrhnjice**, **spermatogoniji**, **oogoniji** (prasemenčice in prajajčeca)).

Terapevtsko kloniranje z zarodnimi matičnimi celicami



Možni postopki kloniranja za zdravljenje z zarodnimi matičnimi celicami

- Bolniku bi odvzeli nekaj somatskih celic.
- Te celice bi nekaj časa **gojili** v epruveti, tako da bi **postale spet nediferencirane**.
- Iz somatske celice bi **odvzeli jedro** in ga **prenesli v jajčno celico** ali **zarodno matično celico**, ki ohranja sposobnost celičnih delitev.
- Tako **spremenjeno matično celico** bi dali **v gojišče** in jo **namnožili** s celično delitvijo.
- Nato bi **dodali v gojišče** določene sporočilne molekule (**aktivatorje**), ki vplivajo na izražanje genov, da bi **sprožili diferenciacijo** v **določen celični tip**.
- Diferencirane **celice**, ki bi jih vzgojili, bi bile **vse genetsko enake bolnikovim somatskim celicam**.
- Ob prenosu kloniranih celic v bolnikovo telo **bi bolnik nanje ne reagiral** kot na **tujke ali na tuge presadke**.
- Tako vzgojene celice bi lahko uporabljali **za zdravljenje poškodovanih ali obolelih tkiv**.

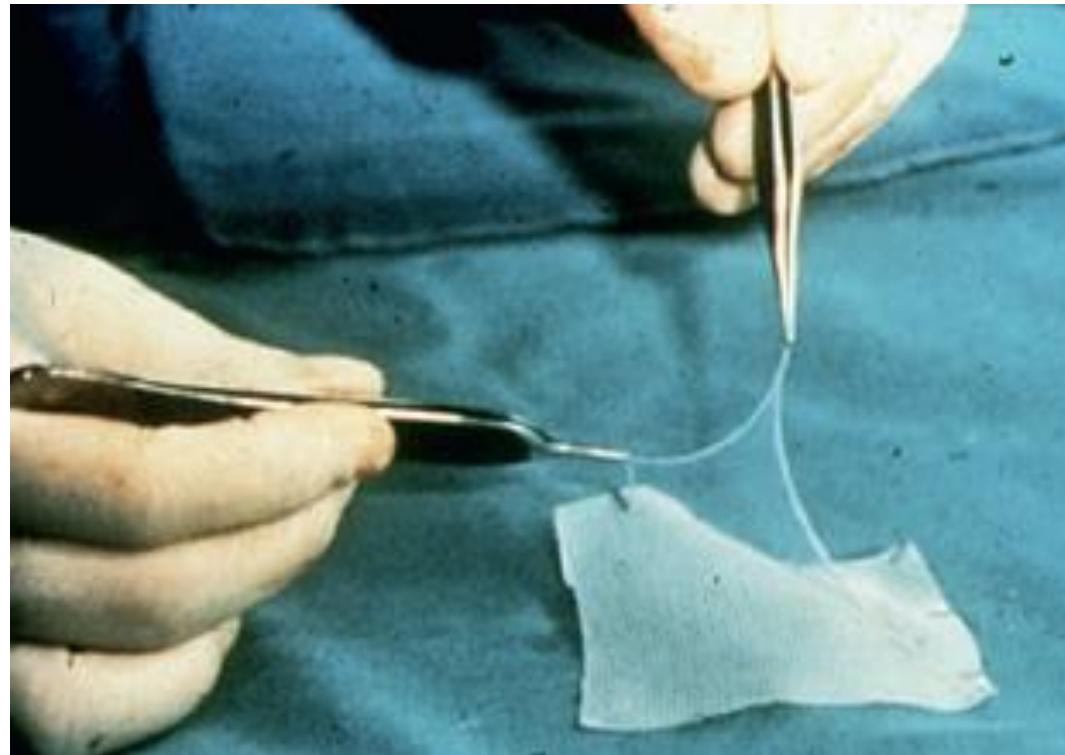
Primeri zdravljenja z zarodnimi matičnimi celicami

- Za zdravljanje **sladkorne bolezni** bi recimo lahko uporabili s kloniranjem vzgojene celice trebušne slinavke, ki izločajo insulin.
- Za zdravljenje **Parkinsonove bolezni** bi lahko uporabili klonirane možganske živčne celice.
- Za **obnovo srca po srčni kapi** bi lahko uporabljali klonirane srčne mišične celice.

Primeri zdravljenja z odraslimi matičnimi celicami

- Matičnih celic pa ne najdemo samo v zgodnjih stopnjah zarodka, temveč tudi v **popkovnični krvi** in v **posteljici**.
- Tudi v **telesu odraslega človeka** so matične celice, ki obnavljajo tkiva v telesu.
 - **Matične celice iz kostnega mozga** že dolgo uporabljajo za obnavljanje krvnih celic pri **levkemiji**.
 - **Mezenhimalne celice** v maščobnem tkivu uporabljajo za obnavljanje drugih vezivnih tkiv (npr. hrustanca).
 - **Celice zarodne plasti povrhnjice** uporabljajo za sintezo presadkov po opeklinah.

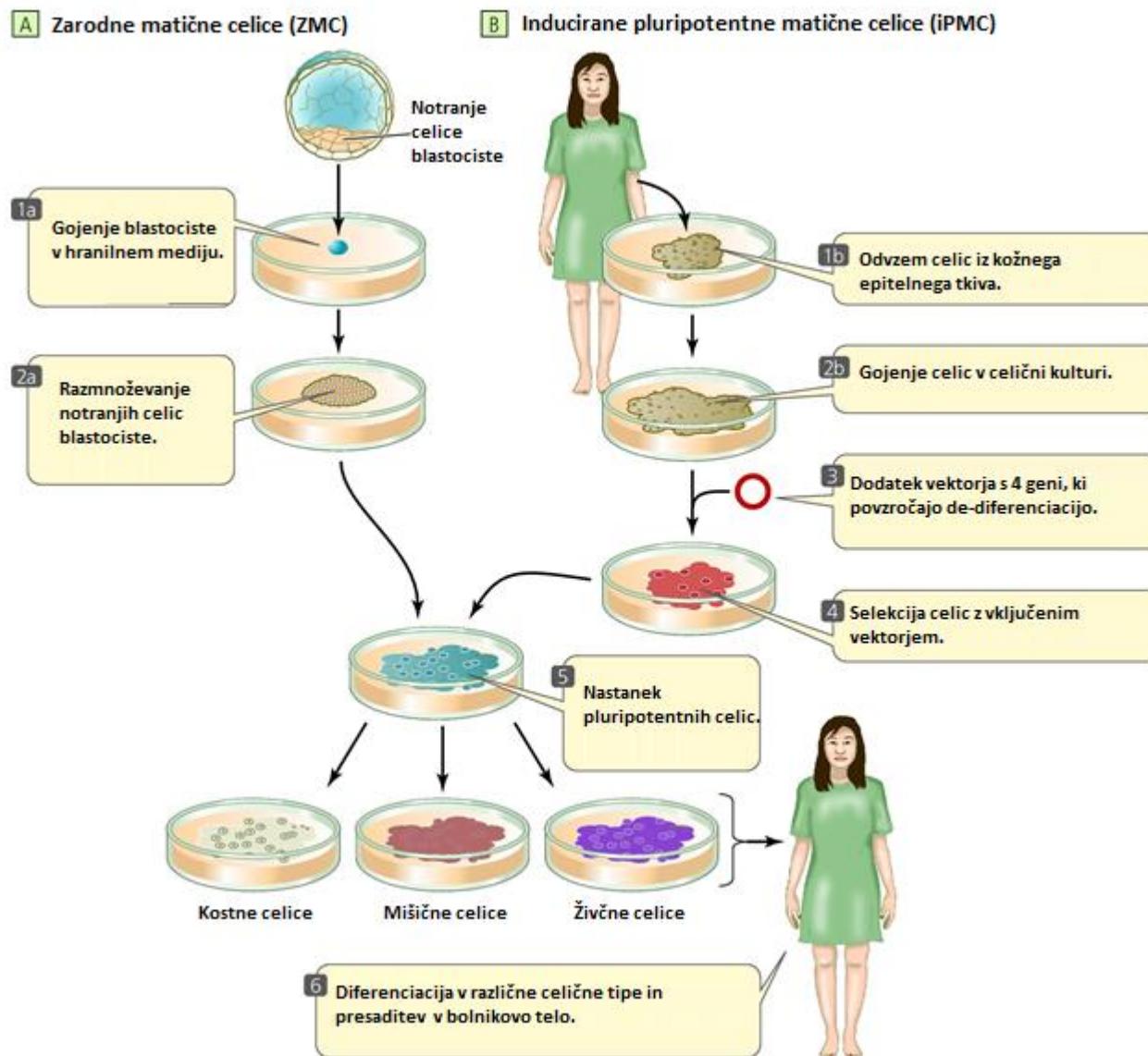
Koža iz odraslih matičnih celic (za presaditev po opeklinah)



Sinteza induciranih pluripotentnih matičnih celic (iPMC)

- Leta 2007 je skupina raziskovalcev pod vodstvom prof. **Shinya Yamanaka** z Univerze v Kyotu (Japonska) sintetizirala **inducirane pluripotentne matične celice (iPMC)**.
- Za odkritje je prof. Shinya Yamanaka prejel Nobelovo in Wolfovo nagrado za medicino.
- **Inducirane pluripotentne matične celice (iPMC)** so zelo podobne embrionalnim matičnim celicam (EMC).
- Dobimo jih tako, da **v diferencirane celice vključimo 4 gene**, ki so značilni za EMC in povzročajo celično **de-diferenciacijo**.
- iPMC se lahko ponovno diferencirajo v celične tipe, ki so različni od tistih, iz katerih izhajajo.

Genska terapija z iPMC



Mnenja o terapevtskem kloniranju z zarodnimi matičnimi celicami

- Mnenja o terapevtskem kloniranju zarodnih matičnih celic so močno deljena.
- Raziskave na področju kloniranja zarodnih matičnih celic so etično sporne, saj zahtevajo uporabo zgodnjih stopenj človekovih zarodkov.
- Znanstveniki skušajo čedalje bolj razvijati postopke zdravljenja z **matičnimi celicami odraslega organizma**, pri katerih uporaba zarodkov ni potrebna.