

Genetika

Prof. dr. Jelka Zabavnik Piano

1

Cilji predmeta

Seznanimi študenta:

- s funkcionalnimi značilnostmi genetskega materiala,
- z oblikami dedovanja,
- z mehanizmi nastajanja variabilnosti,

Omogoča razumevanje:

- Ohranjanja in prenosa genetske informacije,
- mehanizmov nastajanja mutacij in variabilnosti v genetskem materialu posameznih organizmov.

Cilji predmeta

Omogoča razumevanje:

- odnosa med gostiteljem in parazitom,
- evolucije osebkov in populacije in selekcije.

Študent se seznani z osnovami metod molekularne in rekombinantne genetike, ki se uporabljajo pri diagnostiki in terapiji v veterinarski medicini.

Specifične kompetence, ki se razvijejo pri predmetu so:

- razumevanje značilnosti evkariontskega, prokariontskega in virusnega genoma,
- pomena genetske variabilnosti
- pomena dedovanja fizioloških in patoloških lastnosti,
- razumevanje procesov replikacije in transkripcije,
- razumevanje osnov rekombinantne genetike.

Specifične kompetence, ki se razvijejo pri predmetu so:

- poznavanje možnosti uporabe znanj iz genetike v veterinarski medicini
 - diagnostiki,
 - preventivi,
 - terapiji,
 - forenziki.

Opis vsebine

- Geni, aleli in lokusi.
- Kromosomi, kariotip, določanje spola.
- Genom evkariontov, prokariontov, virusov.
- Hibridizacije, enostavno mendelsko dedovanje, vezano dedovanje.
- Rekombinacija genetskega materiala.
- Kromosomske aberacije/mutacije.

Opis vsebine

- Geni v populaciji, frekvence genov in genotipov, Hardy - Weinbergov zakon.
- Bolezni, ki se pojavljajo v družini.
- Interakcija gostitelj – povzročitelj, razvoj rezistence gostitelja, parazita.
- Rekombinantna genetika.
- Metode rekombinantne genetike in uporabnost v veterinarski medicini.

Predvideni študijski dosežki

- Znanje in razumevanje:
 - Študent pozna osnove mendelskega dedovanja, nastanka in posledic mutacij, rekombinacij genetskega materiala in razvoja rezistence, osnove rekombinantne genetike in možnosti uporabe za diagnostiko.

Predvideni študijski dosežki

Uporaba:

- Zna uporabiti temeljna znanja in jih prenesti v klinično prakso in diagnostiko.

Prenosljive spretnosti – niso vezane le na en predmet:

- Zna zbrati, uporabiti in interpretirati podatke iz literature in različnih baz podatkov, o tem razpravljati v skupini in pisno in ustno poročati.

Metode poučevanja

- Predavanja,
- seminarske naloge – individualna priprava in nato predstavitev v skupinah,
- laboratorijske vaje,
- demonstracije.

Pogoji za vključitev v delo oziroma za opravljanje študijskih obveznosti

- Opravljene vaje in sodelovanje pri seminarjih so pogoj za opravljanje izpita.

Metode ocenjevanja in ocenjevalna lestvica

- Ocena seminarja (10 %). Pisni izpit, sestavljen iz vprašanj odprtega in zaprtega tipa in v obliki kratkega eseja (90 %). V primeru nejasnosti je možen ustni izpit.

Reference

- Nicholas FW. **Introduction to Veterinary Genetics**, Oxford University Press 1996
- Nicholas FW. **Veterinary Genetics**, Clarendon Press, Oxford, 1987
- Griffiths AJF; Gelbart WM.; Miller JH.; Lewontin RC. **Modern Genetic Analysis**. New York: [W. H. Freeman & Co.](#); c1999.
- Anthony J.F. Griffiths, Jeffrey H. Miller, David T. Suzuki, Richard C. Lewontin, William M. Gelbart **An Introduction to Genetic Analysis**, New York: [W. H. Freeman & Co.](#); 2000.
- Alberts B; Johnson A; Lewis J; Raff, Martin R. **Molecular Biology of the Gene**. New York: [Garland Publishing](#); 2002.
- Lodish, H; Berk, A; Zipursky, S. L; Matsudaira, P; Baltimore, D; Darnell, J E. **Molecular Cell Biology**. New York: [W. H. Freeman & Co.](#); 2003.

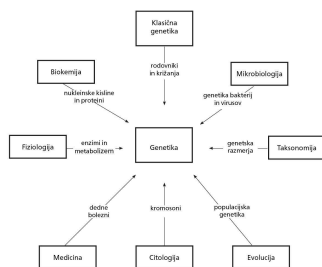
- ▣ ZABAVNIK PIANO, Jelka. **Genetika : študijsko gradivo** : [2008-2009]. [Ljubljana]: [Veterinarska fakulteta], 2009.
- ▣ ZABAVNIK PIANO, Jelka. **Osnove laboratorijskega proučevanja genetskega materiala** : priročnik za vaje iz genetike za študente veterinarske medicine. Ljubljana: Azul, 2007. 80 str., ilustr.

13

- ▣ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books>

14

Genetika - znanost o genih, dedovanju in variacijah



Biokemijska genetika – znanost o kemijskih in fizikalnih lastnostih genov in mehanizmi nadziranja razvoja in delovanja organizma

Klinična genetika – veda, ki obravnava genetske dejavnike bolezenskih stanj.

16

- ▣ **Evolucijska genetika (razvojna)** – panoga genetike, ki proučuje razvoj genoma od najenostavnejših do najvišje organiziranih organizmov.
- ▣ **Molekulska genetika** – proučuje molekularno zgradbo genov in njihovih produktov ter manipuliranje z geni

17

- ▣ **Populacijska genetika** – obravnava razporeditev genov v populaciji, pogostnost genov in genotipov v populaciji, njihovo vzdrževanje in spreminjanje.
- ▣ **Veterinarska genetika** – obravnava lastnosti domačih živali, kot odraz njihovih dednih informacij.

18

Vpliv genov na organizme

- na izgled,
- obnašanje,
- dovzetnost za različna obolenja,
- procese staranja in dolžino življenja,
- patogenost,
- ...

19

Popularizacija genetike

hitro rastoča znanstvena veda

- pogosto omenjena v medijih
 - kloniranje ovce Dolly,
 - projekt humani genom,
 - proizvodnja gensko modificiranih organizmov, kloniranje zarodkov,
 - razvoj genske terapije,
 - povezanost z nagnjenjem k debelosti,
 - s procesi staranja,
 - nastankom in razvojem ter tretiranjem rakavih obolenj.

20

Metodologija rekombinantne genetike (mešanje genov v laboratoriju)

- za povečano proizvodnjo rastlin in živali,
- mikrobnno fermentacijo,
- razvoj zdravil,
- razvoj genske terapije,
- kloniranje (reproduktivno, terapevtsko),
- proizvodnjo različnih produktov.

21

- Najpomembnejši genetski preizkus se odvija v naravi:

- kontinuiteta življenja, prenos dednega materiala od staršev na potomce, kar omogoča preživetje posamezne živalske vrste

- reprodukcija in prilagoditev okolju

22

- **Genotip** – genetska sestava celice/organizma/osebka. Nanaša se na celotni dedni zapis ali pa na posamezni alel.

- **Alel** – ena izmed različnih oblik gena na določenem položaju (lokusu) na kromosomu.

- **Fenotip** – izražena lastnost živega organizma (podedovani genotip + epigenetski dejavniki + vplivi okolja), skupek izraženih (vidnih ali biokemično določljivih) znakov.

23

Industrijski melanizem pri insektih (naravna selekcija)

Sprememba pogojev okolja
– sprememba sposobnosti preživetja nekaterih fenotipov

Melanin – temni pigment kože, dlake, perja
Naravna selekcija pri poprovi vešči

- (*Biston betularia* – svetla oblika -1848 – 98 %; 1895 – 2 %)
- *Biston carbonaria* – temnejša oblika; pred industrializacijo – 0,01%.



24

Genetika in proizvodnja hrane (selekcija)

Selekcija (izločanje iz večje količine po določenih kriterijih; izbiranje, odbiranje)

- Hibridna koruza (1940 – 1980: 251% povečan prirast)
- Povečana proizvodnja mleka
- Povečana proizvodnja jajc
- Hitrejša rast proizvodnih živali

25

Tehnike genskega inženiringa

- Oblikovanje rastlin z želenimi lastnostmi
 - odpornost na insekte,
 - viruse,
 - herbicide,
 - vsebnost provitaminov.

Zlati riž – gensko modificirani riž s povečano vsebnostjo β -karotina (prekursor provitamina A) (Ingo Potrykus - Inštitut za rastline, Švicarski državni inštitut za tehnologijo, in Peter Beyer – Univerza v Freiburgu.)



Genetika in zdravje

- V organizmu imajo vse celice enak genom.
- Pri zdravem organizmu mora biti vsak gen nadzorovano izražen ob pravem času na pravem mestu.
- Fenotipi celic so različni zaradi izražanja različnih genov v različnih celicah.
- Znanih je približno 3000 dednih bolezni pri ljudeh, več kot 500 dednih bolezni pri psih.

28

- **Fenilketonurija** (phenylketonuria – PKU): avtosomalna recesivna dedna bolezen pri ljudeh; okvarjen gen za encim **fenilalanin hidroksilazo**, ki pretvarja aminokislino (AK) **fenilalanin** v AK **tirozin**. Nabiranje fenilalanina in njegovih toksičnih metabolitov (npr. fenilpiruvat) – okvara možganov. Zdravljenje z dieto z določeno količino fenilalanina.
- **Hemofilija**
- **Downov sindrom**

29

- **Rezistenca na antibiotike** – na ekstrakromosomskih elementih
- **Displazija kolkov** pri psih
- **Dilatacijska kardiomiopatija** pri psih
- **Mutacija gena za MDR-1** pri psih, miših

- Retrovirusi – nosilci onkogenov – izguba nadzora nad delitvijo celic.
- Protoonkogeni – celični geni, ki nadzirajo delitev celic, možne mutacije v onkogene.
- Velika frekvenca mutacij pri virusih – virus influence

31

- Poznavanje nukleotidnih zaporedij genov, ki določajo:
 - dedne bolezni,
 - dovzetnost na bolezni,
 - infektov

Omogoča diagnostiko – molekularnobiološke diagnostične metode

Razvoj genetike

- Gregor Johann Mendel (1822 – 1884): osnoval današnje razumevanje genetike, ki sloni na **genski teoriji dedovanja** (oče genetike)
- 1866: objava članka o dedovanju **posameznih** lastnosti pri vrtnem grahu (*Pisum sativum*)
- 1900: botaniki Hugo de Vries, Carl Correns in Eric von Tschermak so ponovno odkrili njegov članek

33

- William Bateson (1861 – 1926) Tej znanstveni vedi je dal ime **GENETIKA** (po besedi – *genero* – roditi, ustvariti, izvršiti)
- 1883 – Wilhelm Roux – kromosomi znotraj jedra celice so nosilci dednih faktorjev
- 1902 – poizkusi T. Boveria in W.S Suttona – ugotovitve, da so dedni faktorji del kromosoma
- 1911- Thomas Hunt Morgan – proučeval mutacije vinske mušice *Drosophila melanogaster* – potrdil, da so kromosomi nosilci genov.

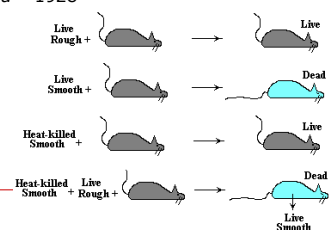
34

- 1909 – knjiga *Inborn Errors of Metabolism*: Archibald E. Garrod je pri proučevanju bolezni metabolizma predlagal teorijo – **mutacija enega gena – blokada ene metabolne poti**.

- **alkaptonurija** (alkaptonuria) grški koren: kapto = ujamem; uron = seč: Seč, ki ga ujamemo, na zraku potemni zaradi oksidacije homogenitizinske kisline, ki je v takem seču prisotna.
- Alkaptonurija – povzroča avtosomni recesivni gen. **Jetra ne tvorijo oksidaze homogenitizinske kisline**, zaradi česar se le-ta ne razgradi in se izloča s sečem. To bolezen so odkrili kot prvo med metabolnimi boleznimi – nefiziološka razgradnja aminokisline fenilalanina.
- Simptomi: temna pigmentacija urina, temna pigmentacija vezivnega tkiva, okvare hrustančnega tkiva, zgodnji razvoj artritisa, kristalizacija – razvoj ledvičnih kamnov; okvara srčnih zaklopk.

35

- Hermann Joseph Muller – 1927 – množične mutacije kromosomov po obsevanju z x-žarki (**mutagenost x-žarkov**)
- Frederick Griffith-ov poskus – **transformacija bakterij** *Diplococcus pneumonia* – 1928



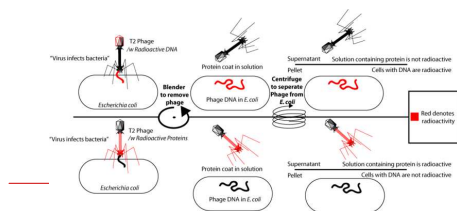
- Teorijo *mutacija enega gena – blokada ene metabolne poti* sta ponovno odkrila in dopolnila Beadle in Tatum leta 1941 – *en gen – en encim*.
- Dopolnjena teorija – *en gen – en polipeptid*

37

- 1944 – Avery, MacLeod, McCarty – dokazali, da je *transformirajoči element* v poizkusu, ki ga je naredil Griffith – molekula DNA (obdelovanje ekstrakta bakterij z DNazo, obdelovanje ekstrakta bakterij s proteinazo)
- 1950 – Erwin Chargaff – štirje nukleotidi so v nukleinski kislini prisotni v stabilnem razmerju; $A=T, C=G$

38

- 1952 – Alfred Hershey in Martha Chase. *Genetski material* bakteriofaga je DNA (radioaktivno žveplo – proteini; radioaktivni fosfor – DNA).



40

- 1956 – Tijo in Levan – ljudje imamo 46 kromosomov
- 1957 – Fraenkel-Conrat in Singer – genetska informacija v tobaknem mozaičnem virusu je *molekula RNA*.
- 1961 – Jacob in Monod – predlagala *model operona*, ki prikazuje regulacijo izražanja genov pri prokariontih.

41

Lysenkoizem - oblika lamarkizma (1937 – 1964)

- T. D. Lysenko: nadzor nad celotno kmetijsko politiko v Sovjetski zvezi – močan vpliv na biološko znanost in na ekonomiko Sovjetske zveze
- (*Spremembe v okolju povzročajo spremembe v organizmu, te spremembe so dedne in se prenašajo na potomce.*)

42

Mendlovi zakoni dedovanja - enostavno mendelsko dedovanje

Gregor Johann Mendel
(1822 – 1884)

Natančno načrtovani poskusi križanja
(hibridizacij)

43

Izbira poskusnega materiala

- Poskusni organizem – vrtni grah (*Pisum sativum*)
- Proučeval je približno 34 različic graha, 22 različic je uporabil za poskuse križanja.
- letna rastlina
- proučeval je po eno parno lastnost
- dobro definirane, nasprotne, vidne lastnosti
 - visoka/pritlikava rastlina;
 - zeleni/rumeni stroki;
 - napihnjeni/stisnjeni stroki;
 - cvetovi po stebelu/na vrhu stebela;
 - zeleno/rumeno zrno graha;
 - beli/vijoličasti cvetovi

44

- preprosta rast in razmnoževanje
- relativno hitra rast te rastline
- diploidna rastlina (dva seta kromosomov)
- cvetovi vsebujejo moške in ženske dele – samooprašitev
- oblika cvetov omogoča odstranitev prašnikov
- umetna, načrtna oprašitev – preprečila napake zaradi naključne oprašitve

45

- fertilnost rastlin skozi generacije ni bila oslajljena
- vključenih več generacij – večletni poskus
- opazoval je tudi vplive okolja, vendar je opazil močnejši vpliv dednosti na izbrane lastnosti proučevanja

46

Monohibridno križanje

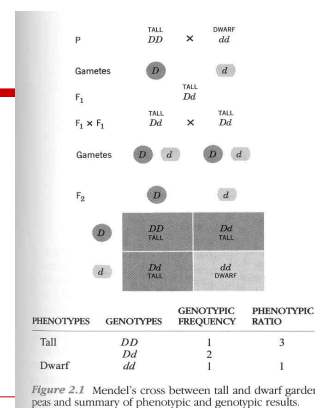
P – generacija staršev
F – generacija potomcev (*filial*)

Hibrid – potomec staršev
z različnimi lastnostmi

F₁ – vsi visoki
F₂ – 787 visokih; 277 pritlikavih
3:1 razmerje

Dominantnost ene lastnosti nad recesivno
Recesivna lastnost se ne pojavi v generaciji F₁

47



48

- dominantno lastnost nadzoruje dominantni faktor (gen)
- recesivno lastnost nadzoruje recesivni faktor (gen)
- aleli - različne oblike istega gena, ki definirajo alternativne lastnosti
- lokus - mesto na kromosomu, na katerem je kak gen in njegovi aleli.

49

Definicije

- Označevanje dominantnih alelov z veliko začetnico, recesivnih z malo.
- Divji tip gena/alela (*wild type*) je alel, ki se pogosteje pojavlja v naravi.
- Drugi alel je mutirani, mutant (*mutare – spremeniti*), ta se redkeje pojavlja v naravi.
- (Mutiranih) alelov je lahko več.
- Lastnosti recesivnih genov (alelov) so izražene le, če ni dominantnega alela.

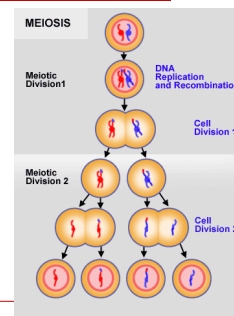
50

Zakon segregacije

Lastnosti nadzorujejo faktorji, ki so prisotni v parih (dva alela v hibridu). Med spolnim razmnoževanjem se pari faktorjev (alelov) ločijo v različne reproduktivne celice (gamete). Pri potomstvu se ponovno združijo.

51

Ločevanje faktorjev poteka med prvo meiotično delitvijo



- http://www.hribi.net/video_youtube/Biology%20-%20Meiosis%20-%20cell%20division/kVMb41s99tA
- http://www.hribi.net/video_youtube/meiosis/uh7c8YbYGao
- http://www.hribi.net/video_youtube/Meiosis%20Square%20Dance/iCL6d0OwKt8

Homozigota - zigota z dvema enakima aleloma (DD)
 Heterozigota - zigota z dvema različnima aleloma (Dd)
 Označevanje alelov s črkami, dodajanje črk iz imena fenotipa.
 Oznake + ali +^w ali w⁺ predstavljajo divji tip alela
 Uporaba poševnice za označevanje alelov na kromosomu (D⁺/d).
 Monohibrid: heterizogoten za en par alelov.

54

Zakon neodvisne razporeditve

- Mendel je križal tudi rastline, ki so imele po dve različni lastnosti.
- Dihibridno križanje
 - (rumen, okrogel x zelen, zguban grah)
 - 556 križanj
- Dihibridi
- Razmerja fenotipov enaka kot dve monohibridni križanji

$$(3 + 1)^2 = (3^2 + 2(3 \times 1) + 1^2) = (9 + 3 + 3 + 1)$$

55

Dihibridno križanje

Punnettov kvadrat - Reginald Crundall Punnett (1875-1967)

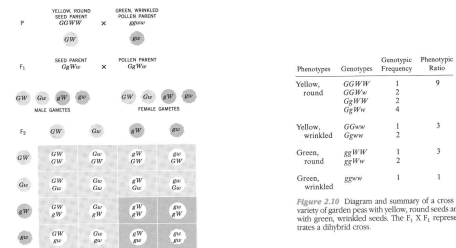


Figure 2.10 Diagram and summary of a cross between a variety of garden pea with yellow, round seeds and a variety with green, wrinkled seeds. The F₁ X F₁ represented illustrates a dihybrid cross.

56

- Zakon verjetnosti:
 - Verjetnost, da se dve neodvisni lastnosti pojavita skupaj, je enaka produktu posameznih verjetnosti za pojavljanje teh lastnosti.
- Drugi Mendlov zakon – zakon neodvisnega razporejanja:
 - Posamezni alelni pari se pri razporeditvi v gamete obnašajo neodvisno od drugih alelnih parov.

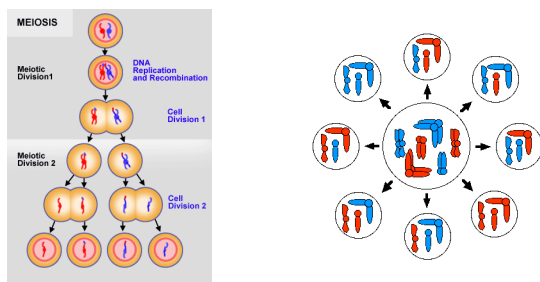
57

Mendlova zakona

- princip segregacije
- in princip neodvisnega razvrščanja v gamete
- osnova za križanje v proizvodnji rastlin in živali.

58

Neodvisno razvrščanje faktorjev v celice



Trihibridna križanja

- Trihibridno križanje – starša se razlikujeta v treh lastnostih
- V naravi so si osebki različni v več kot dveh parih alelov
 - Križanje (parjenje) v naravi proizvaja vedno nove kombinacije genov
- Punnettov kvadrat je možen za predvidevanja verjetnih genotipov in fenotipov pri potomcih

60

Križanje:

- dominantni homozigot x recesivni homozigot:
 - visoka rastlina, rumena, okrogla zrna graha x nizka rastlina, zelena, gubasta zrna
 - DDGGWW x ddggww

P	DDGGWW	ddggww
gamete	DGW	dgw
F1	DdGgWw	

61

Testno križanje F1 generacije

P	DdGgWw								ddggww
gamete	DGW	DGw	DgW	Dgw	dGW	dGw	dgW	dgw	dgw

Lahko nastavimo Punettov kvadrat.

	DGW	DGw	DgW	Dgw	dGW	dGw	dgW	dgw
dgw	DGW dgw	DGw dgw	DgW dgw	Dgw dgw	dGW dgw	dGw dgw	dgW dgw	dgw dgw

62

DDGGWW x ddggww

Fenotip	Genotip	Frekvenca genotipa	Razmerje genotipov
visok, rumen, okrogel	DdGgWw	1	1
Visok, rumen, zguban	DdGgww	1	1
Visok, zelen, okrogel	DdggWw	1	1
Visok, zelen, zguban	Ddggww	1	1
Pritlikav, rumen, okrogel	ddGgWw	1	1
Pritlikav, rumen, guban	ddGgww	1	1
Pritlikav, zelen, okrogel	ddggWw	1	1
Pritlikav, zelen, zguban	ddggww	1	1

63

Križanje F1 generacije (DdGgWw x DdGgWw)

- Pri vsakem staršu je možnih 8 različnih gamet
 - (segregacija – ločevanje alelov v različne gamete).
- Vsaka gameta moškega osebk ima enako možnost, da se oplodi s katerikoli gameto ženskega osebk
 - (neodvisno razvrščanje različnih alelov v gamete).
- Punnettov kvadrat – možnih 8 x 8 različnih kombinacij – 64 kvadratov

64

- Vsak alelni par ima en dominantni alel – pričakujemo razmerje 3 (izražen dominantni alel) : 1 (izražen recesivni alel), za vsako lastnost.
- Ker so vsi trije pari med seboj neodvisni, se lahko vsak pojavi v kombinaciji s katerimkoli alelom za drugo lastnost

65

Metoda "vilic" za ugotavljanje možnih genotipov in možnih fenotipov

3 visoki	3 rumeni	3 okrogli	27 visokih, rumenih, okroglih
		1 naguban	9 visokih, rumenih, nagubanih
	1 zelen	3 okrogli	9 visokih, zelenih, okroglih
		1 naguban	3 visoki, zeleni, nagubani
1 pritlikav	3 rumeni	3 okrogli	9 pritlikavih, rumenih, okroglih
		1 naguban	3 pritlikavi, rumeni, nagubani
	1 zelen	3 okrogli	3 pritlikavi, zeleni, okrogli
		1 naguban	1 pritlikav, zelen, naguban

Matematična metoda izračunavanja možnih razmerij lastnosti pri dedovanju

- $(A:a)(B:b)(C:c)$
- Dobimo fenotipe v razmerju (dominantni:recesivni)
 - $(3+1)(3+1)(3+1)$ ali
 - $(3+1)^3$ ali
 - $a^3+3a^2b+3ab^2+b^3 = 27+9+9+9+3+3+3+1$

67

Razmerja med pari neodvisnih alelov, gametami, genotipi F2 in fenotipi F2, kadar je alel dominanten

Število heterozigotnih parov	Število možnih gamet	Število genotipov F2 generacije	Število fenotipov F2 generacije
1	2	3	2
2	4	9	4
3	8	27	8
4	16	81	16
n	2^n	3^n	2^n

68

- Mendlov zakon velja:
- Če so aleli/geni locirani na različnih kromosomih.
 - Mnogo genov se nahaja na istem kromosomu.
- Če aleli tudi delujejo neodvisno od drugih alelov/genov.
 - Pogoste so interakcije med različnimi geni.

69

Interakcije med aleli

- Dominanca
- Recesivnost
- Kodominanca
- Semidominanca
- Pseudodominanca
- Letalni geni

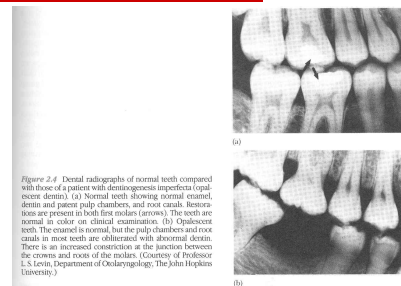
70

Dominanca alela

- Dominanca – interakcija med aleli. Dominantni aleli običajno proizvajajo funkcionalni produkt.
- Homozigoti (AA) in heterozigoti (Aa) so fenotipsko enaki.
- Kriteriji za določanje dominance (npr. bolezenskih genov) pri **testnem križanju** (en starš heterozigoten, en homozigotno recesivni: Aa x aa):
 - Lastnost je vidna pri polovici potomcev, kadar opravimo testno križanje
 - Potomec, pri katerem defekt ni viden, je homozigotno recesiven, ne prenaša defekta

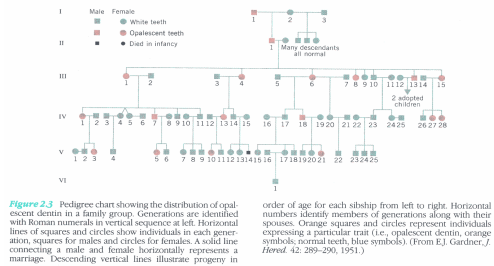
71

Dentinogenesis imperfecta – dominantno dedna motnja v razvoju dentina z nefiziološko (malo) količino mineralov



72

Rodovnik družine z *dentinogenesis imperfecta* (opalescentni dentin) – dominantno dedna motnja v razvoju dentina z nefiziološko (malo) količino mineralov



73

Bolezen s podobnimi kliničnimi znaki se pojavlja tudi pri psih – način dedovanja še ni pojasnjen



Recesivnost alela

- Mnogi recesivni aleli proizvajajo nefunkcionalne proteine.
- Izraženi so le pri homozigotnih organizmih (aa).
- Heterozigotni nosilci gena niso fenotipsko izraženi.
- Heterozigotne nosilce recesivnih alelov ugotavljamo s križanjem s homozigoti za recesivni alel (testno križanje).
- Kriteriji za določanje recesivnih genov:
 - Lastnost opazimo pri potomstvu otrok heterozigotnih staršev (genotipsko enakih glede proučevane lastnosti – obeh nosilcev recesivnega gena).
 - ¼ potomstva heterozigotnih staršev je homozigotno recesivna – prizadeta.

75

Albinizem – anomalija pigmentacije zaradi pomanjkanja melanina – recesivno dedovanje

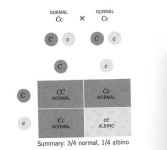


Figure 2.5 Cross between two normally pigmented people, both of whom were carriers of the gene (c) for albinism.

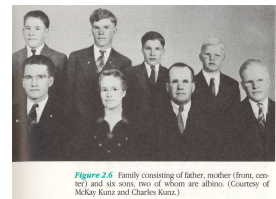
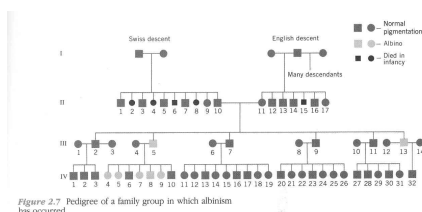


Figure 2.6 Family consisting of father, mother (front, center) and six sons, two of whom are albino. (Courtesy of McKay Kunz and Charles Kunz.)

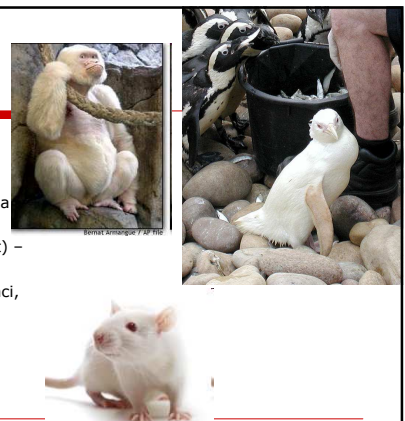
76

Rodovnik družine z albinizmom



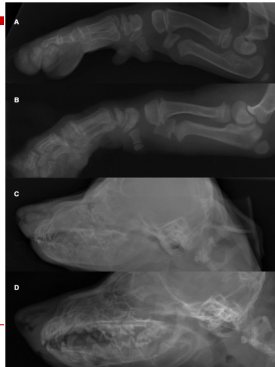
77

- Snowdrop albino afriški pingvin (Zoo Bristol)
- Snowflake – gorila (Zoo Barcelona)
- Migaloo (beli fant) – kit, ki živi v naravi
- laboratorijski kunci,
- podgane, miši

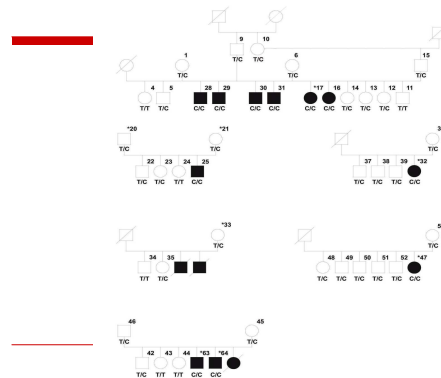


78

Radiografije psov jazbečarjev z osteogenesis imperfecta (OI) in zdravih psov.
(A) Prednja noga psa z OI. (B) Prednja noga zdravega psa. (C) Lobanja pasjega mladiča z OI. (D) Lobanja zdravega pasjega mladiča.



Rodovniki preiskanih jazbečarjev.
Genotipi *SRPINH1* so zapisani pod simboli (mutacija 977T>C).

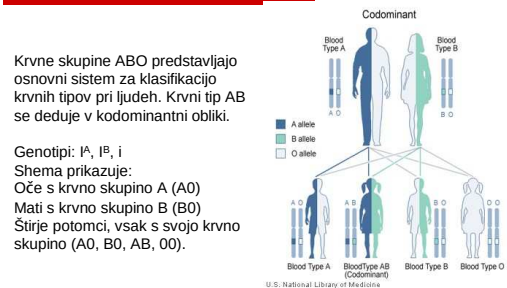


Kodominanca alelov

- Oba alela sta izražena pri heterozigotih.
- Heterozigoti so fenotipsko različni od homozigotov.
- Produkta obeh alelov sta enaka glede na funkcijo, ampak različna glede na sestavo (npr. krvne skupine: M in N antigeni na eritrocitih)

81

Dedovanje krvnih skupin



82

Semidominanca (nepopolna dominanca)

- Semidominantni alel – vsak alel proizvaja nek protein, vendar je pri heterozigotni obliki manjša količina produkta kot pri homozigotni obliki organizma (rdeča barva cvetov, bela barva cvetov, roza barva cvetov)
- **Heterozigotni osebki ima "manjšo dozo" lastnosti kot homozigotni osebki.**
 - Homozigotni dominantni,
 - homozigotni recesivni in
 - heterozigotni osebki – vsi se razlikujejo v fenotipu.

83



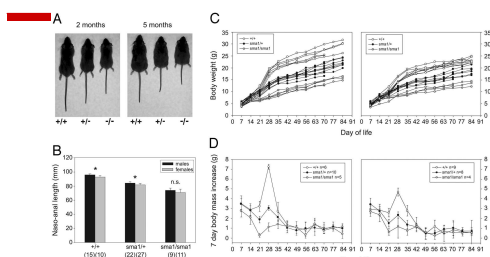
84

Carola W. E. Meyer, Dirk Korthaus, Wolfgang Jagla, Emmanuelle Cornali, Johannes Grosse, Helmut Fuchs, Martin Klingenspor, Stephanie Roemheld, Matthias Tschöp, Gerhard Heldmaier, Martin Hrabé de Angelis, Michael Nehls.
A Novel Missense Mutation in the Mouse Growth Hormone Gene Causes Semidominant Dwarfism, Hyperghrelinemia, and Obesity
Endocrinology 2004; 145: 2531-2541.

Inducirana mutacija *sma1* (z etil-nitroso-ureo) na genu za rastni hormon (GH – growth hormone) (a – g), namesto asparaginske kisline se prevede glicin na položaju proteina GH 167 (od skupno 190 AA) – posledica je mutirani GH.

- Miši z mutacijo so pritlikave, zavrti je rast v prepubertetni stopnji razvoja.
- Vsi genotipi so vitalni in fertilni.
- Način dedovanja sledi principom semidominantne mendelske genetike.
- Odrasle miši akumulirajo subkutano in visceralno maščobo v večjih količinah.
- Skladiščenje in izločanje GH iz hipofize je oslabiljeno.
- V plazmi je povečana raven želodčnega hormona grelina (občutek lakote), ki stimulira izločanje GH iz hipofize.

FIG. 2. A, Predstavnik miši *+/+*, *sma1/+*, and *sma1/sma1* miši iz istega gnezda z različnimi genotipi, stari 2 meseca in 5 mesecev.

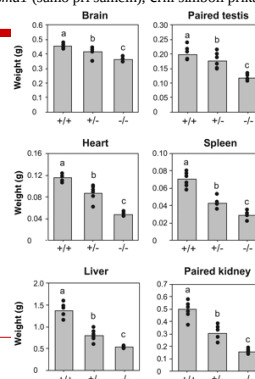


Meyer, C. W. E. et al. Endocrinology 2004;145:2531-2541

Endocrinology

Copyright ©2004 The Endocrine Society

Teže organov miši brez mutacije, heterozigotnih z mutacijo, homozigotnih z mutacijo, starih 2 do 3 mesece. Stolpci prikazujejo povprečne teže organov $n = 7$ *+/+*, $n = 6$ *sma1/+* and $n = 5$ *sma1/sma1* (samo pri samcih), črni simboli prikazujejo razporeditev tež posameznih miši.



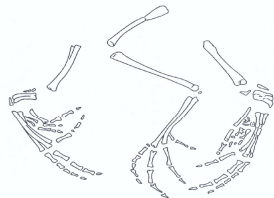
Letalni aleli

Aleli, ki vplivajo na sposobnost preživetja, vitalnost organizma

- Dominantni letalni alel
- Recesivni letalni alel
- Pri piščancih – dominantna razvojna okvara nog (C) (vendar recesivna letalnost):
 - Pritlikavi (plazeči) piščanci Cc ("creepers"),
 - CC- letalna oblika, piščanci ne preživijo
 - cc – normalni piščanci
 - $Cc \times Cc = (CC) + Cc + Cc + cc$ (razmerje 2:1- značilno razmerje za gene, letalne v homozigotni obliki)

Scots Dumpy chicken





Legs of two creeper embryos on outside.
Leg of normal embryo in the center
(from Taylor and Gunns in J. Heredity).

91

- Mačke manx - gen *manx* (M^L) (določa razvoj vretenc)
 - v homozigotni obliki – letalna kombinacija,
 - v eni kopiji povzroča razvoj brezrepe mačke.



- brez repnih vretenc (rumpy)
- 1 do 7 zaraslih repnih vretenc (rumpy riser)
- 2 do 24 repnih vretenc, z nenavadnim zavojem (stumpy) – možno lateralno premikanje repa
- normalni rep (7 ledvenih, 3 križne, 18 – 23 repnih vretenc)
- Malformacije – inkontinenca urina, fecesa, spina bifida, pareza, anogenitalne malformacije, megacolon.
- Okvare v razvoju hrbtenjače – gen(i), ki vpliva(jo) na razvoj nevralne cevi.



- Rumene miši
- (dominantni alel glede barve dlake, recesivni alel glede vitalnosti)
- Mutacija gena za aguti barvo (A^Y) na 2 kromosomu (delecija v promotorju in prvem eksonu gena aguti – antagonist receptorja za melanokortin)
 - homozigotna recesivna oblika se ne pojavlja v naravi, ker je letalna – preimplantacijska letalnost
 - Mnogo dominantnih pleiotropičnih učinkov:
 - rumena barva dlake
 - debelost
 - na inzulin rezistentna sladkorna bolezen tipa II
 - večja pojavnost tumorjev
- **Pleiotropija** – pojav, pri katerem en gen vpliva na navidez nesorodne znake. (*sin.* polifenija)

94

Letalni aleli

- Fenotipi pri potomstvu heterozigotnih staršev se pojavljajo v razmerju 2 : 1, če letalnost določa recesivni alel.
- Nekateri geni so dominantno letalni, se ne pojavijo niti v heterozigotni obliki.
- Učinki nekaterih genov niso fenotipsko vidni v heterozigotni obliki, so pa letalni v homozigotni obliki.
- Različni geni so letalni v različnem obdobju življenja:
 - prenatalno,
 - v otroštvu,
 - v kasnejših obdobjih življenja.

95

- Pri letalnih alelih gre običajno za napako:
 - v esencialni kemični reakciji,
 - lahko gre za strukturno okvaro organizma.
- Letalnost je odvisna tudi od vplivov okolja.
- Stopnja letalnosti naravi je običajno od 0 do 100-odstotna – odvisno od prodornosti gena in vplivov okolja.

96

- Interakcije različnih genov
 - Epistaza
 - Hipostaza

97

Interakcija genov

- Mendlove hipoteze, da se dejavniki, ki določajo različne lastnosti ločujejo in razporejajo neodvisno drug od drugega, veljajo za alelne pare, ki tudi delujejo neodvisno drug od drugega.
- Vendar, izražanje enega alela na nekem lokusu včasih spremeni izražanje drugega ali drugih nealelnih genov na drugem lokusu.

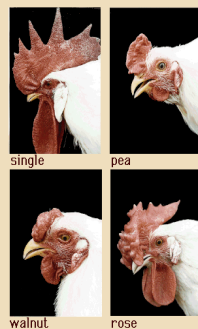
98

Tipi rož pri piščancih – vpliv ne-alelnih genov

gen za rožnato rožo (R)
gen za grahasto rožo (P)

orehasta roža (R-P-)
enojna roža (rrpp)

Dedovanje rože pri piščancih: gen za rožnato rožo (R), gen za grahasto rožo (P). Interakcija genov povzroči razvoj orehaste rože (R-P-) in enojne rože (rrpp).



100

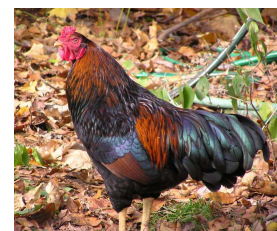
- Wyandotte – rožnata roža (RRpp)



- Brahma – tipična grahasta roža (rrPP)



- Cornish
 - grahasta roža (rrPP)



Križanje čistih linij (homozigotnih) piščancev

P	rožnata roža (wyandotte)	x	grahasta roža (brahma)
F1	orehaste rože		
F2	9 orehastih : 3 rožnate : 3 grahaste : 1 enojna		

103

Epistaza

- Funkcionalna interakcija med različnimi geni, ko en alel na nekem lokusu zavre izražanje nekega drugega (nealelnega) gena na drugem lokusu.
 - Ne smemo zamenjati za dominanco. Dominanca je interakcija med aleli istega gena na istem lokusu. Epistaza je interakcija med različnimi geni.

104

- Do sodelovanja med geni, ki vplivajo na isto lastnost lahko pride na
 - isti metabolni poti
 - na različnih metabolnih poteh

105

Geni, ki kontrolirajo izražanje encimov v isti metabolni poti, so **med seboj odvisni** – ne sledijo zakonu neodvisne segregacije in neodvisnega združevanja.

Prekurzor

- stopnja: gen C – encim C (alel C/c)

Vmesni produkt

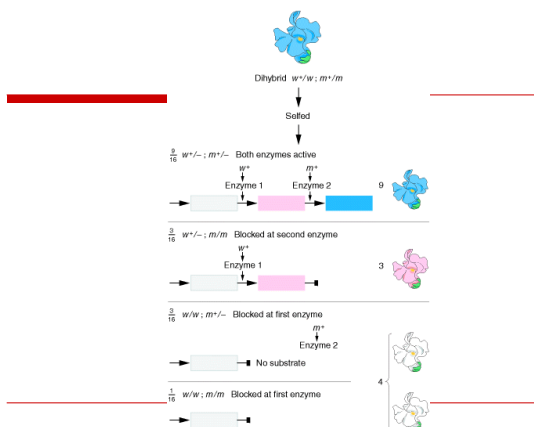
- stopnja: gen P – encim P (alel P/p)

Produkt

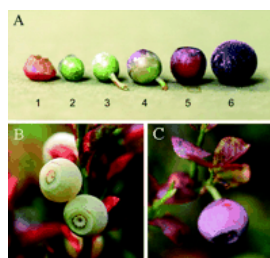
- Stopnja: funkcionalni encim/ni funkcionalnega encima

Proizvodi nekaterih genov vplivajo na izražanje drugih genov.

106



A, Borovnica od cveta do zrelega sadeža. 1, cvet; 2, majhni zeleni sadež; 3, srednje velik zeleni sadež; 4, sredi rasti, ko se je pričelo obarvanje; 5, skoraj zreli, na polovico obarvani sadeži; 6, popolnoma obarvani modri, zreli sadeži.
 B, Mutacija borovnic – beli sadeži.
 C, Mutacija borovnic – roza sadeži.



Obarvanost cvetov pri sladkem grahu (epistaza)



Genotip	Barva cvetov	Delovanje encimov
9 C_P_	Cvetovi so obarvani, Celice proizvajajo antocianin	Oba gena proizvajata funkcionalni encim
3 C_pp	Cvetovi niso obarvani, Celice ne proizvajajo antocianina	Encim C je funkcionalen, ni encima P
3 ccP_	Cvetovi niso obarvani, Celice ne proizvajajo antocianina	Encim P je funkcionalen, ni encima C
1 ccpp	Cvetovi niso obarvani, Celice ne proizvajajo antocianina	Celica ne proizvaja encima C in P

109

- Antocianini - družina flavonoidnih sestavin, ki so prisotni v rastlinskih polifenolih.
- Antocianinski pigmenti:
 - rdeče, vijoličasto in modro obarvanje mnogih vrst sadja, zelenjave, žit, rož.
- povečano zanimanje za antocianinske pigmente
 - antioksidativno delovanje.
- Znanih preko 300 strukturno različnih antocianinov v naravi
- Ugodno delovanje na vid, prebavni trakt, srce in ožilje.
 - Nutricionisti svetujejo uživanje sadja, zelenjave in žitaric.

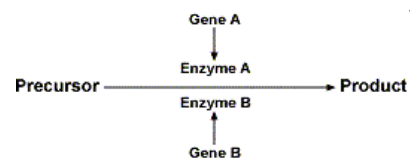
110

- Barva privablja živali - za raznos semena.
- Zaščita pred svetlobo - fotoinhibicijo.
- Zaščita pred UV svetlobo.
- Predvsem pri mladih rastlinah. Kasneje se količina antocianina (v listih) zmanjša.



111

Nastanek obarvanosti pri žitnem zrnju



112

Učinek epistaze pri žitnem zrnju



Genotip	Fenotip žitnega zrna	Encimsko delovanje
9 A_B_	Obarvano žito	Oba gena kodirata funkcionalni encim
3 A_bb	Obarvano žito	Gen A kodira funkcionalni encim
3 aaB_	Obarvano žito	Gen B kodira funkcionalni encim
1 aabb	Brezbarvno žito	Noben gen ne kodira encima

113

Obarvanost kože pri labradorcih

- Primer recesivne epistaze - rumena obarvanost dlake pri labradorcih
- B - črna obarvanost
- b - rjava obarvanost
- Allel e nekega drugega gena deluje na nalaganje pigmenta v dlake, zato zavre delovanje gena, ki določa pigmentiranje dlake.

114

- a) $E^-; B^-$
 b) $E^-; bb$
 c) $ee; B^-$ ali $ee; bb$



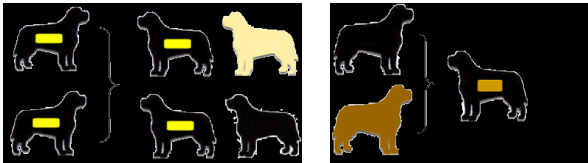
115

Dedovanje barve dlake pri labradorcih

- BB = črni labradorec
- Bb = črni labradorec, nosilec rjavega (čokoladnega) gena
- bb = čokoladni labradorec
- Rumena barva je proizvod recesivnega epistatičnega gena, ki zamaskira izražanje črnega ali rjavega gena.
- EE = fenotipsko rjav ali črn
- Ee = nosilec rumenega gena, fenotipsko je črn ali rjav
- ee = rumeni labradorec
- Kombinacije
 - $EEBB$ = Črn
 - $EeBb$ = Črn, nosilec čokoladnega gena
 - $EeBB$ = Črn, nosilec rumenega gena
 - $Eebb$ = Črn, nosilec čokoladnega in rumenega gena
 - $eeBB$ = Rumeno
 - $eeBb$ = Rumeno, nosilec čokoladnega gena
 - $eebb$ = čokoladni, pigmentiran rumeno
 - $EEbb$ = čokoladni
 - $Eebb$ = čokoladni, ki nosi rumeni gen

116

$Ee; BB \times Ee; BB$ $EE; BB \times EE; bb$

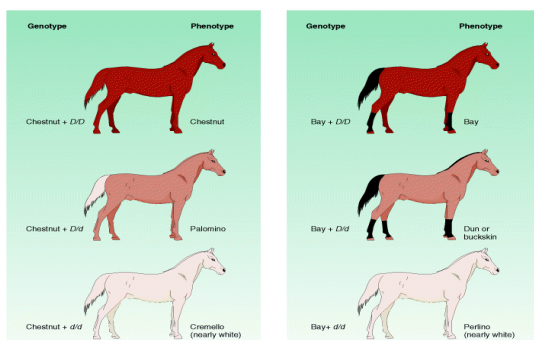


117

Gen, ki modificira izražanje drugih genov – lahko vpliva na nivo prepisovanja mRNA z gena

- Gen D : nadzoruje intenzivnost obarvanosti dlake, genotipi D/D in D/d dovoljujejo polno izražanje genov, ki na drugih lokusih determinirajo barvo. Genotip d/d razredči obarvanost.
 - Razredčena črna obarvanost
 - Razredčena aguti obarvanost
 - Razredčena rjava obarvanost
 - Razredčena kostanjeva obarvanost

118

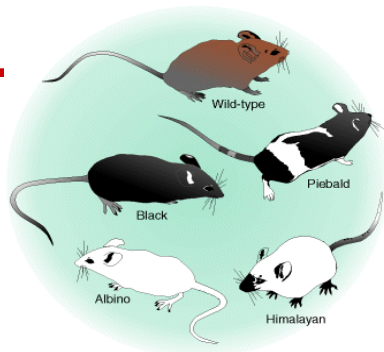


Modificirajoči učinek alela, ki določa razreditev obarvanja (dilution - D) osnovne kostanjeve barve in barve rjavca pri konjih. (From J. W. Evans et al., *The Horse*, W. H. Freeman and Company, 1977.)

119

- Gen A: aguti - nadzoruje nalaganje različnih barv v določenem obdobju
- Gen G: sivenje

120



- Nekaj osnovnih oblik obarvanja dlake pri miših (aguti, lisast, himalajski, albino, črn)

121

Obarvanost kože pri kači

- Divji tip obarvanosti pri kači – izmenjujoča oranžna in črna barva
- Na fenotip vpliva izražanje dveh različnih pigmentov, izražanje obeh je nadzorovano z geni. Dva ločena gena, vsak lociran na drugem kromosomu.
- Oranžna barva:
 - Določa jo encim v metabolni poti za oranžno barvo (gen o^+)
 - Ni oranžne barve: o^-
- Črna barva:
 - Proizvodnjo črnega pigmenta determinira gen b^+
 - Ni črne barve: b^-

122

a) $o^+/-; b^+/-$

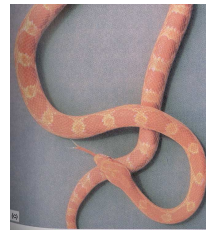
b) $o^-/o^-; b^+/-$



123

c) $o^+/-; b^-/b^-$

d) $o^-/o^-; b^-/b^-$



124

- Oblika vzorca razporeditve barve je kodirana z drugim genom – pri vseh kačah na naših slikah je viden vzorec.

- Gre za primer sodelovanja več genov, ki po različnih metabolnih poteh delujejo na isti fenotip – obarvanost in vzorec kože.

125

Geni ne delujejo v izoliranem sistemu, vedno prihaja do medsebojnih vplivov.

- Fenotip organizma je rezultat:
 - delovanja posameznih genov (alelov),
 - interakcije med mnogimi geni na različnih lokusih (poligene lastnosti)
 - epigeneze
 - in vplivov okolja.
- **Penetrancia genov** – stopnja izraženosti genov. Če je dominantni alel gena fenotipsko viden le pri 70 odstotkih osebkov – 70-odstotna penetranca gena (pri 30-odstotkih je tako nizka izraženost gena, da ni opazna).

126

- Fenokopija – sprememba fenotipa, ki pa ni posledica dednosti (epilepsija – lahko zaradi dednih faktorjev ali pa zaradi vplivov okolja).
- Za razumevanje vzrokov nastanka obolenja je potrebno poznati:
 - rodovnik živali,
 - proučiti fenotipske značilnosti
 - in vplive okolja.

127



Multipli aleli

Alel – specifična oblika gena.

- **polimorfizem** – pojav različnih oblik, mnogoličnost, pleomorfizem
 - **Genetski polimorfizem** – več različnih fenotipskih oblik v populaciji zaradi več različnih alelov enega gena (pojavljanje dveh ali več variant v določenem genskem lokusu – Slovenski medicinski slovar).
- Če obstaja več kot dve obliki istega gena na istem lokusu, govorimo o **multiplih alelih**.

129

Krvne skupine

- Antigeni, ki se nahajajo na površini rdečih krvničk
- Večina antigenov je glikoproteinov, ki imajo različne oblike – glede na različna zaporedja sladkorjev, ki so pripeti na polipeptidno verigo.
- Dodajanje teh sladkorjev nadzirajo encimi – produkti genov, ki definirajo krvno skupino.
- Krvne skupine, ki jih definira nek lokus, spadajo v isto skupino.

Sistem AB0 pri ljudeh

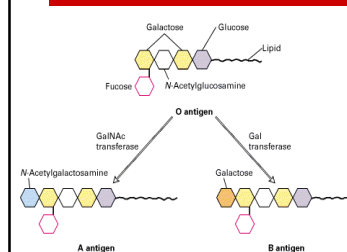
- Odkril Landsteiner, 1900; natančno genetiko razložil Yamamoto 1990) Antigeni, ki se nahajajo na površini rdečih krvničk
- Lokus (na kromosomu 9), ki nadzira izražanje krvnih skupin AB0, ima tri možne alele:
 - I^A , I^B , I^O
 - Alela I^A in I^B sta kodominantna, I^O je recisiven,
 - Lokus AB0 kontrolira obliko glikolipida na površini rdečih krvničk
 - Glikolipid ima antigene lastnosti, spodbudi tvorbo protiteles v krvnem obtoku (obrambni mehanizem)
 - Štiri krvne skupine: A, B, AB, 0.
 - Pred transfuzijo je potrebno preveriti kompatibilnost krvnih skupin recipienta in donatorja krvi (krvna skupina 0 – univerzalni donator)

131

Krvna skupina	Antigen na rdečih krvničkih	Serumska protitelesa	Prejemnik krvi s krvno skupino
A	A	Anti-B	A in O
B	B	Anti-A	B in O
AB	A in B	nič	vseh
O	O	Anti-A in Anti B	O

132

- o Prvi markerji za določanje starševstva – na osnovi določanja krvnih tipov sistema AB0
- o Alela A in B proizvajata specifični encim za glikozilacijo krvne molekule.
 - Encim, ki je proizvod alela A (N-acetil-D-galaktosamin-transferaza), doda enoto N-acetilgalaktosamin na konec oligosaharidne verige makromolekule.
 - Encim, ki ga določa alel B (D-galactosil-transferaza), se od encima alela A razlikuje le v eni aminokislini, deluje tako, da doda enoto D-galaktoze na konec oligosaharidne molekule.
- o Produkt alela 0 ni aktiven.
- o Alel 0 je skoraj popolnoma enak kot alel A. Nukleotidno zaporedje DNA ima le eno delnico, guanin na položaju 258 manjka. Ta delciya povzročijo nastanek popolnoma drugačnega proteina, ki ni funkcionalen.



- Pomembnost krvnih skupin ni poznana, niso nujne za preživetje osebk.
- Prvotno so bili glede na delovanje ugotovljeni sistemi 4 krvnih skupin,
- z novimi tehnologijami ugotavljanja polimorfizmov so ugotovili 88 različnih polimorfizmov (podskupine),
- to število še vedno narašča.

- Krvna skupina 0 je najbolj pogost fenotip v večini populacij:**

- skupina 0, 49%;
 - A1, 19%;
 - A2, 8%;
 - B, 20%;
 - A1B, 3%;
 - A2B, 1%
- **Aziati:**
- skupina 0, 43%;
 - A1, 27%;
 - A2, redka;
 - B, 25%;
 - A1B, 5%;
 - A2B, redka
- **Kavkazijska populacija:**
- skupina 0, 44%;
 - A1, 33%;
 - A2, 10%;
 - B, 9%;
 - A1B, 3%;
 - A2B, 1%

Sistemi za krvne skupine pri konju - različni aleli na posameznih lokusih

System	Factors	Recognized alleles
A	a b c d e f g	A ¹ A ² A ³ A ⁴ A ⁵ A ⁶ A ⁷ A ⁸ A ⁹ A ¹⁰ A ¹¹ A ¹² A ¹³ A ¹⁴ A ¹⁵ A ¹⁶ A ¹⁷ A ¹⁸ A ¹⁹ A ²⁰ A ²¹ A ²² A ²³ A ²⁴ A ²⁵ A ²⁶ A ²⁷ A ²⁸ A ²⁹ A ³⁰ A ³¹ A ³² A ³³ A ³⁴ A ³⁵ A ³⁶ A ³⁷ A ³⁸ A ³⁹ A ⁴⁰ A ⁴¹ A ⁴² A ⁴³ A ⁴⁴ A ⁴⁵ A ⁴⁶ A ⁴⁷ A ⁴⁸ A ⁴⁹ A ⁵⁰ A ⁵¹ A ⁵² A ⁵³ A ⁵⁴ A ⁵⁵ A ⁵⁶ A ⁵⁷ A ⁵⁸ A ⁵⁹ A ⁶⁰ A ⁶¹ A ⁶² A ⁶³ A ⁶⁴ A ⁶⁵ A ⁶⁶ A ⁶⁷ A ⁶⁸ A ⁶⁹ A ⁷⁰ A ⁷¹ A ⁷² A ⁷³ A ⁷⁴ A ⁷⁵ A ⁷⁶ A ⁷⁷ A ⁷⁸ A ⁷⁹ A ⁸⁰ A ⁸¹ A ⁸² A ⁸³ A ⁸⁴ A ⁸⁵ A ⁸⁶ A ⁸⁷ A ⁸⁸ A ⁸⁹ A ⁹⁰ A ⁹¹ A ⁹² A ⁹³ A ⁹⁴ A ⁹⁵ A ⁹⁶ A ⁹⁷ A ⁹⁸ A ⁹⁹ A ¹⁰⁰ A ¹⁰¹ A ¹⁰² A ¹⁰³ A ¹⁰⁴ A ¹⁰⁵ A ¹⁰⁶ A ¹⁰⁷ A ¹⁰⁸ A ¹⁰⁹ A ¹¹⁰ A ¹¹¹ A ¹¹² A ¹¹³ A ¹¹⁴ A ¹¹⁵ A ¹¹⁶ A ¹¹⁷ A ¹¹⁸ A ¹¹⁹ A ¹²⁰ A ¹²¹ A ¹²² A ¹²³ A ¹²⁴ A ¹²⁵ A ¹²⁶ A ¹²⁷ A ¹²⁸ A ¹²⁹ A ¹³⁰ A ¹³¹ A ¹³² A ¹³³ A ¹³⁴ A ¹³⁵ A ¹³⁶ A ¹³⁷ A ¹³⁸ A ¹³⁹ A ¹⁴⁰ A ¹⁴¹ A ¹⁴² A ¹⁴³ A ¹⁴⁴ A ¹⁴⁵ A ¹⁴⁶ A ¹⁴⁷ A ¹⁴⁸ A ¹⁴⁹ A ¹⁵⁰ A ¹⁵¹ A ¹⁵² A ¹⁵³ A ¹⁵⁴ A ¹⁵⁵ A ¹⁵⁶ A ¹⁵⁷ A ¹⁵⁸ A ¹⁵⁹ A ¹⁶⁰ A ¹⁶¹ A ¹⁶² A ¹⁶³ A ¹⁶⁴ A ¹⁶⁵ A ¹⁶⁶ A ¹⁶⁷ A ¹⁶⁸ A ¹⁶⁹ A ¹⁷⁰ A ¹⁷¹ A ¹⁷² A ¹⁷³ A ¹⁷⁴ A ¹⁷⁵ A ¹⁷⁶ A ¹⁷⁷ A ¹⁷⁸ A ¹⁷⁹ A ¹⁸⁰ A ¹⁸¹ A ¹⁸² A ¹⁸³ A ¹⁸⁴ A ¹⁸⁵ A ¹⁸⁶ A ¹⁸⁷ A ¹⁸⁸ A ¹⁸⁹ A ¹⁹⁰ A ¹⁹¹ A ¹⁹² A ¹⁹³ A ¹⁹⁴ A ¹⁹⁵ A ¹⁹⁶ A ¹⁹⁷ A ¹⁹⁸ A ¹⁹⁹ A ²⁰⁰ A ²⁰¹ A ²⁰² A ²⁰³ A ²⁰⁴ A ²⁰⁵ A ²⁰⁶ A ²⁰⁷ A ²⁰⁸ A ²⁰⁹ A ²¹⁰ A ²¹¹ A ²¹² A ²¹³ A ²¹⁴ A ²¹⁵ A ²¹⁶ A ²¹⁷ A ²¹⁸ A ²¹⁹ A ²²⁰ A ²²¹ A ²²² A ²²³ A ²²⁴ A ²²⁵ A ²²⁶ A ²²⁷ A ²²⁸ A ²²⁹ A ²³⁰ A ²³¹ A ²³² A ²³³ A ²³⁴ A ²³⁵ A ²³⁶ A ²³⁷ A ²³⁸ A ²³⁹ A ²⁴⁰ A ²⁴¹ A ²⁴² A ²⁴³ A ²⁴⁴ A ²⁴⁵ A ²⁴⁶ A ²⁴⁷ A ²⁴⁸ A ²⁴⁹ A ²⁵⁰ A ²⁵¹ A ²⁵² A ²⁵³ A ²⁵⁴ A ²⁵⁵ A ²⁵⁶ A ²⁵⁷ A ²⁵⁸ A ²⁵⁹ A ²⁶⁰ A ²⁶¹ A ²⁶² A ²⁶³ A ²⁶⁴ A ²⁶⁵ A ²⁶⁶ A ²⁶⁷ A ²⁶⁸ A ²⁶⁹ A ²⁷⁰ A ²⁷¹ A ²⁷² A ²⁷³ A ²⁷⁴ A ²⁷⁵ A ²⁷⁶ A ²⁷⁷ A ²⁷⁸ A ²⁷⁹ A ²⁸⁰ A ²⁸¹ A ²⁸² A ²⁸³ A ²⁸⁴ A ²⁸⁵ A ²⁸⁶ A ²⁸⁷ A ²⁸⁸ A ²⁸⁹ A ²⁹⁰ A ²⁹¹ A ²⁹² A ²⁹³ A ²⁹⁴ A ²⁹⁵ A ²⁹⁶ A ²⁹⁷ A ²⁹⁸ A ²⁹⁹ A ³⁰⁰ A ³⁰¹ A ³⁰² A ³⁰³ A ³⁰⁴ A ³⁰⁵ A ³⁰⁶ A ³⁰⁷ A ³⁰⁸ A ³⁰⁹ A ³¹⁰ A ³¹¹ A ³¹² A ³¹³ A ³¹⁴ A ³¹⁵ A ³¹⁶ A ³¹⁷ A ³¹⁸ A ³¹⁹ A ³²⁰ A ³²¹ A ³²² A ³²³ A ³²⁴ A ³²⁵ A ³²⁶ A ³²⁷ A ³²⁸ A ³²⁹ A ³³⁰ A ³³¹ A ³³² A ³³³ A ³³⁴ A ³³⁵ A ³³⁶ A ³³⁷ A ³³⁸ A ³³⁹ A ³⁴⁰ A ³⁴¹ A ³⁴² A ³⁴³ A ³⁴⁴ A ³⁴⁵ A ³⁴⁶ A ³⁴⁷ A ³⁴⁸ A ³⁴⁹ A ³⁵⁰ A ³⁵¹ A ³⁵² A ³⁵³ A ³⁵⁴ A ³⁵⁵ A ³⁵⁶ A ³⁵⁷ A ³⁵⁸ A ³⁵⁹ A ³⁶⁰ A ³⁶¹ A ³⁶² A ³⁶³ A ³⁶⁴ A ³⁶⁵ A ³⁶⁶ A ³⁶⁷ A ³⁶⁸ A ³⁶⁹ A ³⁷⁰ A ³⁷¹ A ³⁷² A ³⁷³ A ³⁷⁴ A ³⁷⁵ A ³⁷⁶ A ³⁷⁷ A ³⁷⁸ A ³⁷⁹ A ³⁸⁰ A ³⁸¹ A ³⁸² A ³⁸³ A ³⁸⁴ A ³⁸⁵ A ³⁸⁶ A ³⁸⁷ A ³⁸⁸ A ³⁸⁹ A ³⁹⁰ A ³⁹¹ A ³⁹² A ³⁹³ A ³⁹⁴ A ³⁹⁵ A ³⁹⁶ A ³⁹⁷ A ³⁹⁸ A ³⁹⁹ A ⁴⁰⁰ A ⁴⁰¹ A ⁴⁰² A ⁴⁰³ A ⁴⁰⁴ A ⁴⁰⁵ A ⁴⁰⁶ A ⁴⁰⁷ A ⁴⁰⁸ A ⁴⁰⁹ A ⁴¹⁰ A ⁴¹¹ A ⁴¹² A ⁴¹³ A ⁴¹⁴ A<

Table 5: Seven loci of horse blood group markers, the factors detected by antisera and the alleles (phenogroups) that are recognized by the International Society for Animal Genetics (ISAG).

Sistemi krvnih skupin pri domačih živalih

Table 8.2. Blood group systems in domestic animals

TABLE 2. Blood group systems in domestic animals													
Horses		Cattle		Sheep		Pigs		Dogs		Cats		Chickens	
Locus	Min. No. alleles	Locus	Min. No. alleles	Locus	Min. No. alleles	Locus	Min. No. alleles	Locus	Min. No. alleles	Locus	Min. No. alleles	Locus	Min. No. alleles
A	11	A	10	A	J	A	2	A	3	AB	2	B	35
C	2	B	>600	H	52	E	1	H	2	C	2	H	35
D	11	C	77	G	4	C	2	C	2			C	5
E	11	D	4	D	2	E	12	D	2			D	5
F	2	F	4	H	4	F	2	F	2			E	9
G	5	L	2	R	2	F	3	Tr	3			H	3
U	2	M	1	X	2	G	1		2			I	5
		S	15			H	7	K	2			J	3
		Z	2			I	2	L	2			K	4
		T	2			J	3	M	2			L	3
						K	6	N	2			P	10
						L	6					R	2
						M	18						
						N	3						
						O	2						
Total number of blood group systems													
7				15				11				2	
1				1				1				12	

Adapted from Ball (1983) and Beaumont (1974)

- Tvorba protiteles po senzibilizaciji
- Pri ljudeh so protitelesa prisotna brez senzibilizacije, tudi pri mačkah za sistem AB, pri govedu za sistem J.
- Hemolitična bolezen novorojenčkov (tvorba protiteles proti A in B pri materah s skupino 0) - neonatalna isomerizacija.
- Krvne skupine – pomembne za določanje starševstva
- Za transfuzijo – potrebno preveriti ujemanje krvnih skupin
- Za forenziko – ugotavljanje identičnosti osebkov.

139

Sistem krvnih skupin pri govedu

Lokus	Kromosom	Antigen
A	15	A, D, H, Z'
B	29	B, G, I ¹ , I ² , K, O ¹ , O ² , O ³ , O ⁴ , P ¹ , P ² , Q ¹ , Q ² , T ¹ , T ² , Y ¹ , Y ² , A', B', D', E ¹ , E ² , E ³ , F', G', I ¹ , I ² , J ² , K', O', P', Q', Y', B'', G'', I'', J'', K'', O'', P'', Q'', Y'', B''', G''', I'''
C	18	C ¹ , C ² , E, R ¹ , R ² , W, X, C, L
F/V	21	F, V
J	11	J
L	3	L
M	23	M, M'
S	21	S ¹ , U ¹ , U ² , H', U ¹ , U ² , H'', S'', U''
Z	8	Z
R	16	R ¹ , S
	19	T'

140

Sistemi krvnih skupin pri psih (Dog Erythrocyte Antigen)

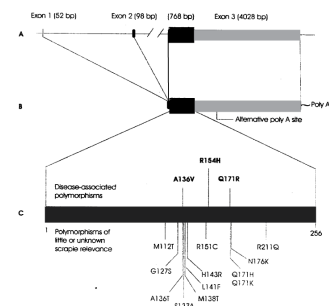
Krvna skupina	Stara nomenklatura	Približna incidenca
DEA 1.1	A1	40%
DEA 1.2	A2	20
DEA 3	B	5
DEA 4	C	98
DEA 5	D	25
DEA 6	F	98
DEA 7	Tr	45
DEA 8	He	40

143

Gen, ki kodira prionski protein (PRNP)

Gen *PRNP* pri ovci proizvaja protein, velik 256 aminokislin. (Tranulis, APMIS, 2002)

pri ovcah oblika gena *PRNP* vpliva na dovzetnost na praskavec



142

Genotip	Skupina NSP	Stopnja odpornosti/dovzetnosti na klasično obliko praskavca
ARR/ARR	1	Genetsko najbolj odporne ovce.
ARR/AHQ ARR/ARH ARR/ARQ	2	Ovce, ki so srednje odporne na praskavec, potrebna pazljivost pri selekciji.
AHQ/AHQ AHQ/ARH AHQ/ARQ ARH/ARH ARH/ARQ ARQ/ARQ	3	Ovce, ki so genetsko le malo odporne na razvoj praskavca.
ARR/VRQ	4	Ovce, ki so genetsko dovzete na praskavec, naj ne bi bile namenjene za nadaljnjo selekcijo, razen v posebno nadzorovanem programu selekcije
AHQ/VRQ ARH/VRQ ARQ/VRQ VRQ/VRQ	5	Ovce, ki so visoko dovzete na praskavec, se ne uporabljajo za parjenje

143

Struktura nukleinskih kislin

144

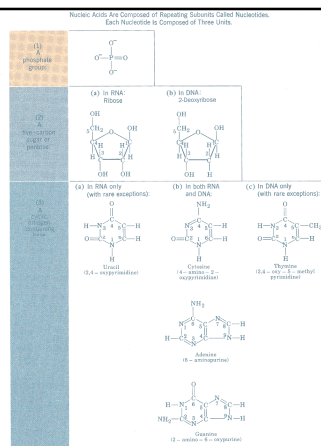
Genetski material:

- shranjevanje informacije,
 - podvojevanje (replikacija) informacije in prenos informacije na potomce,
 - izražanje informacije (genov),
 - nadzor izražanja genov – diferenciacija, rast, delovanje organizma glede na signale iz okolja
-
- Ohranjenost genetskega materiala skozi generacije
 - Variabilnost genetskega materiala – omogoča izbor organizmov, prilagojenih spremembam okolja

145

- Nukleinske kisline (NK):
- deoksiribonukleinska kislina (**deoxyribonucleic acid** - DNA) in ribonukleinska kislina (**ribonucleic acid** -RNA)
 - sestavljene iz ponavljajočih se podenot nukleotidov (polinukleotidna veriga)
- Vsak nukleotid je sestavljen:
 - dušikove baze,
 - sladkorja,
 - fosfatne skupine.

146



147

Gradbeni elementi nukleinskih kislin

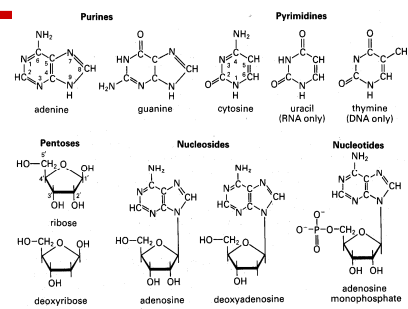
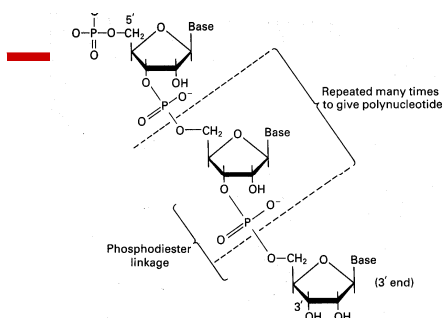


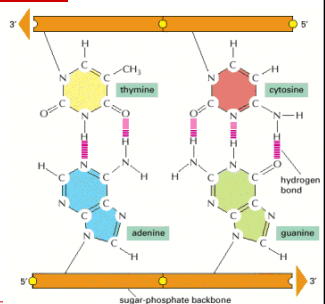
Fig. 5.1 Structures of bases, nucleosides and nucleotides.

148



149

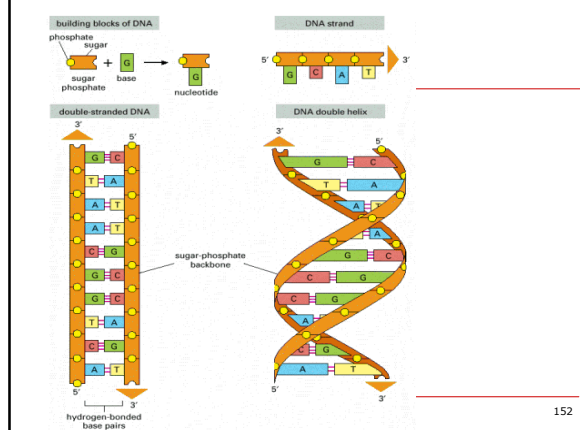
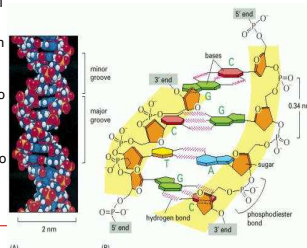
- Komplementarni bazni pari v dvojni verigi DNA. Oblika in kemijska struktura baz omogoča tvorbo vodikovih vezi le med A in T in G in C, brez krivljenja dvojne vijajnice.
- Baze se lahko postavijo v takšno parjenje le, če sta verigi postavljeni antiparalelno.



150

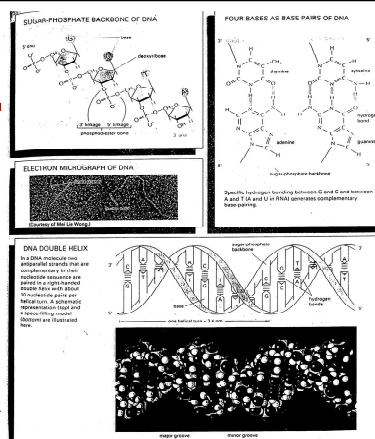
Dvojna vijačnica DNA

- (A) model prikazuje 1,5 zavoja dvojne vijačnice DNA.
- Razdalja med sosednjimi nukleotidi je 0,34 nm.
- Zavijanje dveh verig – ene okoli druge – oblikuje dva žleba v dvojni vijačnici. Širši žleb se imenuje večji žleb, ožji pa mali žleb.
- (B) Kratak izsek dvojne vijačnice, gledan iz strani, prikazuje štiri bazne pare.
- Nukleotidi so med seboj kovalentno povezani s fosfodiestrskimi vezmi, ki se oblikujejo med 3'-hidroksil (-OH) skupino na enem sladkorju in med fosfatno skupino (P) na naslednjem.
- Vsaka polinukleotidna veriga ima kemijsko polarnost, njena dva konca sta kemijsko različna, 3' konec ima nevezano -OH skupino na 3' položaju sladkornega prstana;
- 5' konec nosi prosto fosfatno skupino, pripeto na 5' položaj na sladkornem prstanu.

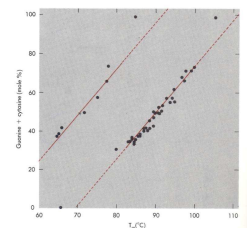


152

Struktura DNA

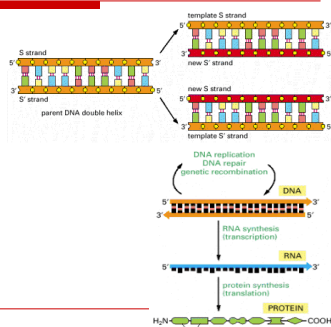


Denaturacija molekule DNA pri višjih temperaturah



Struktura DNA odseva svojo dejavnost

- Molekula DNA služi kot matrika za podvajanje. Ker nukleotid A tvori vodikovo vez le z nukleotidom T; nukleotid G pa le z nukleotidom C, vsaka veriga DNA zato predstavlja nukleotidna zaporedja za komplementarno stran.
- Na ta način se lahko dvojna vijačnica natančno podvaja.



Struktura DNK

- koncentracija T enaka koncentraciji A, koncentracija C enaka koncentraciji G,
- nukleotidi povezani med seboj s fosfodiestrskimi vezmi,
- komplementarnost obeh verig – predeterminirana zgradba nasprotne verige
- nasprotna kemijska polarnost (3', 5'),
- dvojna vijačnica dveh antiparalelnih polinukleotidnih verig,
- baze so med seboj oddaljene 0,34 nm,
- 10 baz v enem zavoju od enega do drugega velikega žleba v dvojni vijačnici DNA desno-sučne vijačnice (fiziološko) 3,4 nm.

156

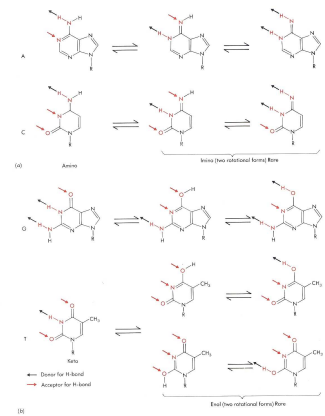
Nukleotidno zaporedje podedeno humanega gena za β -globin, ki kodira aminokislino ene izmed podedot molekule hemoglobina, ki je odgovoren za prenos kisika v krvi organizma.

Prikazana je le ena veriga dvovertičnega zapisa gena za β -globin.

Druge verige je komplementarna prikazani.

Po dogovoru se nukleotidna zaporedja pišejo od smerni 5' proti smeri 3', beremo ga od leve proti desni.

Rumeno označena območja prikazujejo tri območja, ki se prevedejo v aminokislinsko zaporedje proteina β -globina.



RNA AND DNA

The structure of RNA is shown in one half of the panel, within the structure of DNA is shown in the other half. Both RNA and DNA are long polymers of nucleotides (see Panel 2-4, esp. 5B-5D). RNA exists as both RNA in single strand and as double stranded RNA.

1. the sugar-phosphate backbone contains deoxyribose rather than ribose
2. contains the base uracil (U) instead of thymine (T)
3. exists as a single strand rather than as double stranded helix

SUGAR-PHOSPHATE BACKBONE OF RNA

1. the sugar-phosphate backbone contains deoxyribose rather than ribose

2. contains the base uracil (U) instead of thymine (T)

3. exists as a single strand rather than as double stranded helix

FOUR BASES OF RNA

Adenine (purine)

Guanine (purine)

Cytosine (pyrimidine)

Uracil (pyrimidine)

RNA SINGLE STRAND

RNA is single stranded, but it contains local regions of short-range order known as the major and minor groove and the helical twist. Regions of base pairing can be seen in the electron micrograph as long-range helical structures.

ELECTRON MICROGRAPH OF RNA

Electron micrograph of RNA showing a single strand with regions of base pairing (long-range helical structures).

(a) Secondary structure

Double-helical stem region

Stem-loop

Hairpin

(b) Tertiary structure

5' 3'

Folding

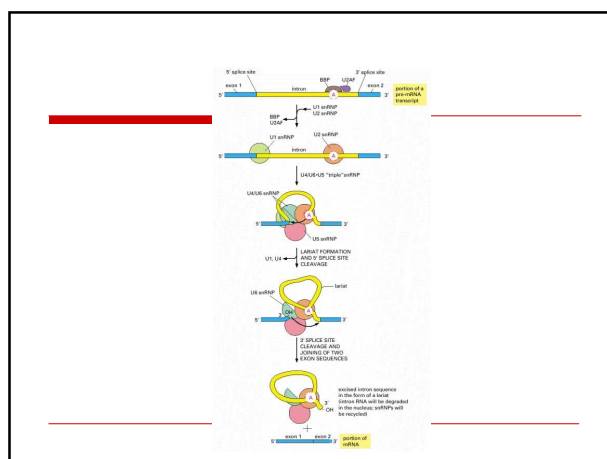
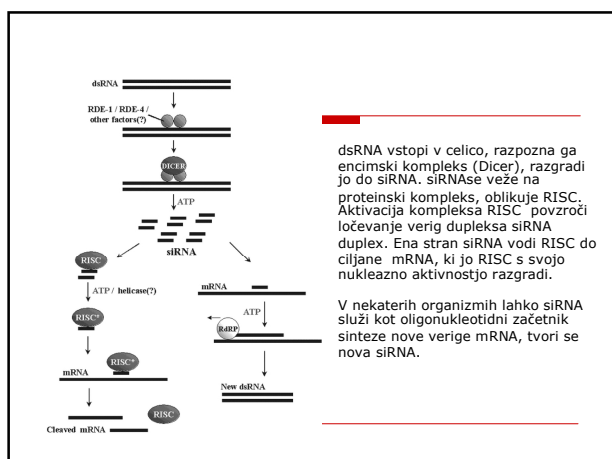
Pseudoknot

Kodoni so vedno pisani s 5'-koncem na levi strani. Večino aminokislin predstavlja več kodonov. Kodoni, ki kodirajo isto aminokislino imajo na prvih dveh mestih enake nukleinske kisline, razlikujejo se na tretjem položaju. Trije kodoni ne kodirajo aminokislin, temveč določajo terminacijsko mesto (stop kodoni). Kodon AUG deluje kot začetni kodon in specifičira aminokislino metionin.

[illegible]

- ❑ mRNA (hnRNA, poliA RNA)
- ❑ rRNA
- ❑ tRNA

- spliceosom
- ribosom
- male nekodirajoče molekule RNA
- mikro RNA
- male interferirajoče molekule RNA



Genom

- prokariotov,
- evkariotov,
- virusov,
- plazmidov,
- celičnih organelov.

165

Genom (po SMS)

- Celotna genetska informacija organizma, vsebovana v DNA evkariotov in prokariotov ter v DNA ali RNA virusov, zajema nukleotidna zaporedja z genskimi zapisi in zaporedja, ki jih ne vsebujejo;
- *sin.* dednina, genetska informacija.

Koliko je genomov?

- Kromosom – struktura v celičnem jedru, nosilec genov
- Virusi in prokarioti – večinoma – monoploidni (en set genov) – ena nukleinska kislina - en genom - en kromosom
- Večina višjih živalskih vrst in mnoge rastline – diploidni – dva genoma v posamezni celici – dva seta kromosomov (genov) – eden od očeta, eden od matere
- Nekatere višje rastline – poliploidne – več genomov v posamezni celici – več setov genov (kromosomov)
- Celični organeli – praviloma več kopij v posameznem celičnem organelu.
- V posamezni celici – praviloma več plazmidov.

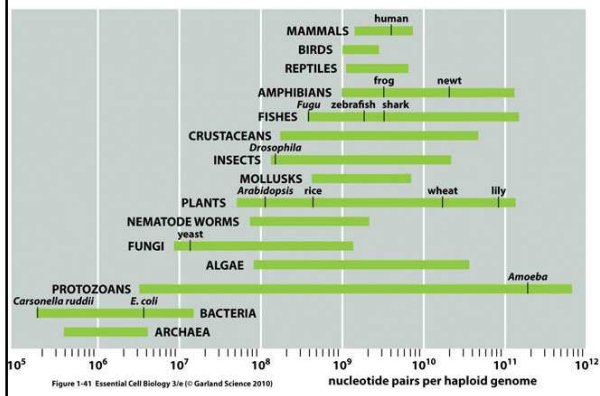
167

Velikost genoma – število genov

- Najmanjši znani RNA virus – 3 geni
- Najmanjši znani DNA virus – 9 genov
- Največji DNA virusi (pox virus) – 150 genov
- *E. coli* – 3000 – 4000 genov.
- *Caenorhabditis elegans* (nematod) – 20 000 genov
- *Homo sapiens* – 30 000 genov

168

Velikost genoma – število baznih parov

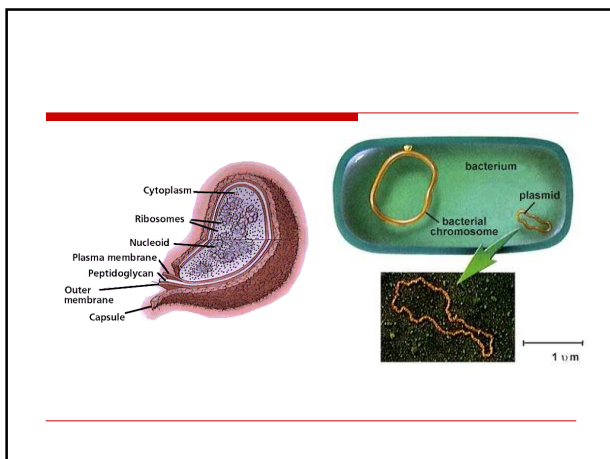
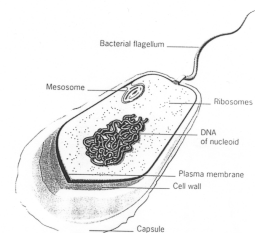


organizem	velikost genoma (v bp)
<i>Paris japonica</i>	150,000,000,000
<i>Protopterus aethiopicus</i>	139,000,000,000
<i>Fritillaria assyriaca</i>	124,900,000,000
<i>Lilium longiflorum</i>	90,000,000,000
<i>Necturus maculosus</i>	50,000,000,000
<i>Triturus cristatus</i>	18,600,000,000
<i>Zea mays</i>	5,000,000,000
<i>Xenopus laevis</i>	3,000,000,000
<i>Rattus norvegicus</i>	3,000,000,000
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	3,000,000,000
<i>Mus musculus</i>	3,000,000,000
<i>Homo sapiens</i>	3,000,000,000
<i>Bos taurus</i>	3,000,000,000
<i>Sus scrofa</i>	2,700,000,000
<i>Gallus gallus</i>	1,200,000,000
<i>Oryza sativa</i>	400,000,000
<i>Schistosoma mansoni</i>	270,000,000
<i>Sarcocystis cruzi</i>	201,000,000
<i>Drosophila melanogaster</i>	165,000,000
<i>Caenorhabditis elegans</i>	100,000,000

<i>Arabidopsis thaliana</i>	100,000,000
<i>Toxoplasma gondii</i>	89,000,000
<i>Eimeria tenella</i>	70,000,000
<i>Plasmodium falciparum</i>	25,000,000
<i>Plasmodium berghei</i>	25,000,000
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	14,000,000
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12,067,280
<i>Escherichia coli</i>	4,639,221
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	4,397,000
<i>Bacillus subtilis</i>	4,170,000
<i>Synechocystis sp. strain PCC6803</i>	3,573,470
<i>Mycobacterium leprae</i>	2,800,000
<i>Haemophilus influenzae</i>	1,830,137
<i>Helicobacter pylori</i>	1,667,867
<i>Methanococcus jannaschii</i>	1,664,974
<i>Borrelia garinii</i>	953,000
<i>Borrelia burgdorferi</i>	946,000
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	816,394
<i>Human immunodeficiency virus type 1</i>	9,750

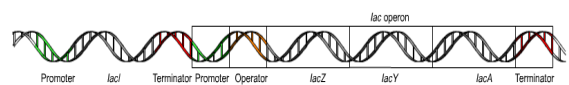
Prokariotska celica (nadkraljestvo Prokaryota)

- Geni so pogosto organizirani v operone

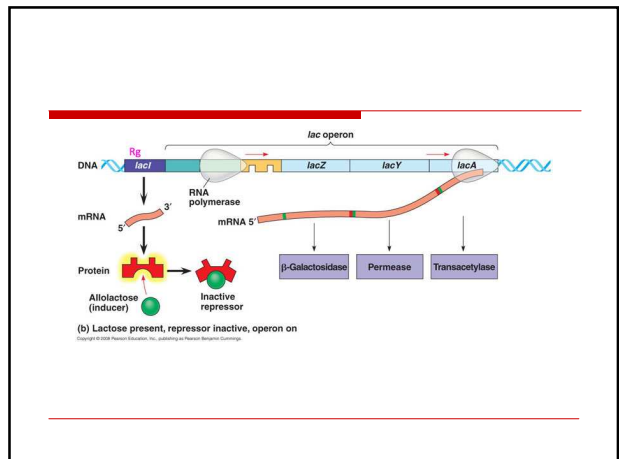
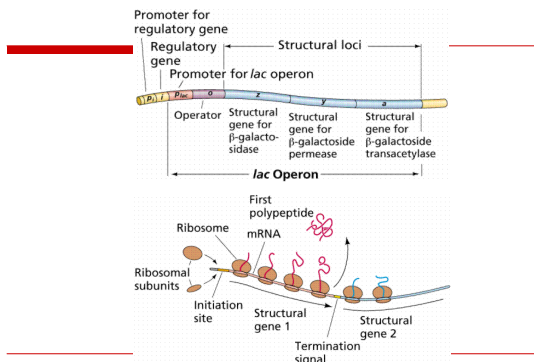


- Operon – področje DNA pri bakterijah, sestavljeno iz več strukturnih genov, ki se prepišejo v eno samo molekulo RNA, in ustreznih regulacijskih področij.

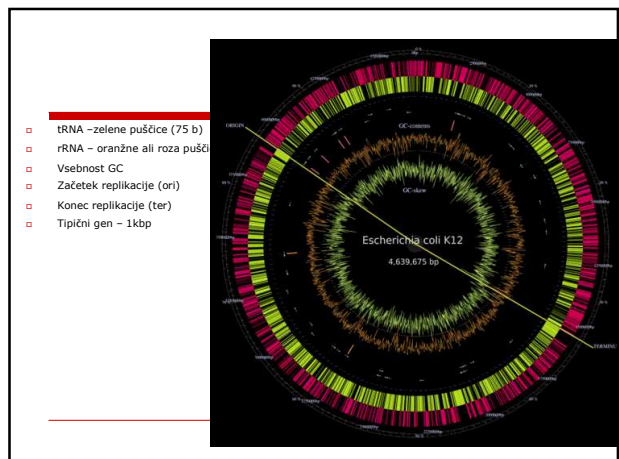
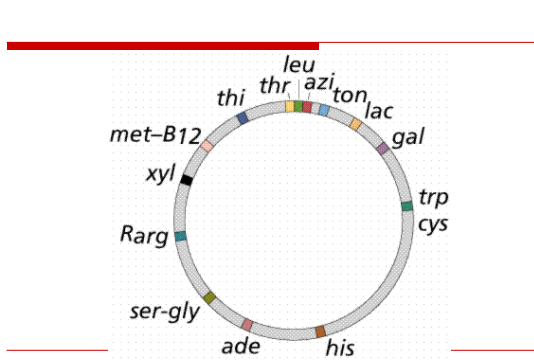
- Laktozni operon (*lac*-operon) – področje DNA pri bakteriji *E. coli*, sestavljeno iz treh strukturnih genov, katerih produkti so encimi, vključeni v metabolizem laktoze, in ustreznih regulacijskih področij.



Operoni – značilni za genom prokariontov



Delni prikaz operonov na kromosomu *E. coli*



Dinamična narava genoma prokariontov

Posamezni člani iste vrste bakterij se razlikujejo glede na vsebnost genov tudi do 30 odstotkov.

Oblikovanje genoma prokariontov:

- Redukcija genoma/izguba genov
 - Parazitizem/ubikvitarnost
- Preureditev genoma
 - (IS-elementi (intervening sequences))
- Duplikacija – podvajanje genov
 - večji genomi imajo večji delež genov, ki kodirajo regulatorne proteine, proteine sekundarnega metabolizma in transport – večji genomi bakterij v siromašnem okolju
- Lateralni prenos genov

- Evolucija prokariontov je mreža vertikalnih in lateralnih (horizontalnih) prenosov genov.

□ Osnovni genom prokariontov:

- Del genoma, ki je skupen vsem sevom
- Del genoma, ki je skupen več sevom, vendar ne vsem
- Del genoma, ki je specifičen le za posamezne seve

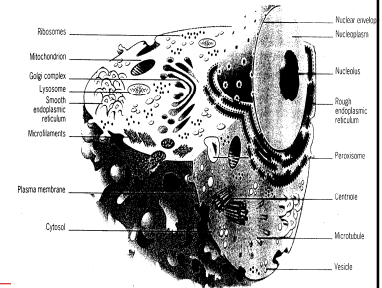
Genom prokariotov

- Geni so razporejeni tesno skupaj, le malo vmesnega prostora med geni.
- Organiziranost genov v operone – funkcionalne skupine genov so prepisane v eno molekulo mRNA, ki se kasneje prevede v več funkcionalno povezanih proteinov.

181

Evkariontska celica (nadkraljestvo *Eukaryota*)

- Evkarionti so praviloma diploidni (ali poliploidni) organizmi,
- mного več DNA,
- geni v eni kopiji in repetitivni geni,
- genomski material je zapakiran v kromosome (DNA, bazični proteini – histoni, nehistonski proteini),
- dedni material v mitohondrijih
- linearni kromosom, značilna telomera.



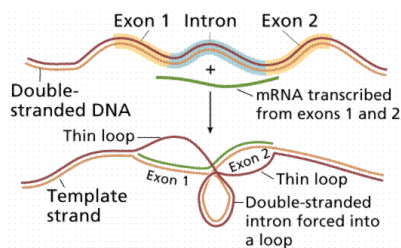
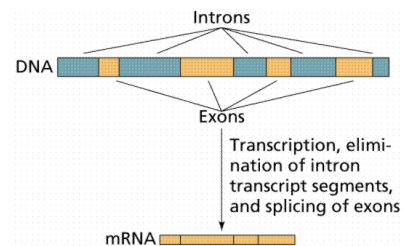
182

Evkarionti

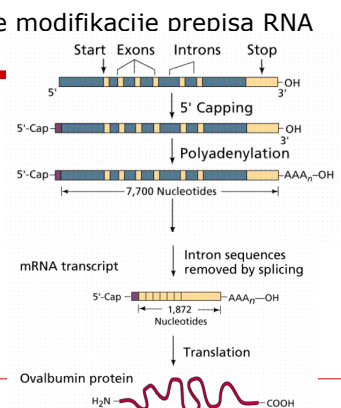
- Večina evkariontskih celic je
 - diploidnih (živali, cvetlice)
 - ali haploidnih (alge, glive, reproduktivne celice diploidnih organizmov)
- Evkarionti vsebujejo večjo količino DNA, ta DNA je zapakirana v kromosome, vsak kromosom je prisoten v dveh ali več kopijah.
- Pri evkariontih se večina genov nahaja na več linearnih kromosomih v jedru
- Mitohondriji/kloroplasti imajo več krožnih kromosomov
- Humani genom – 1 m dolžine (2 m v diploidni obliki), razdeljeno med 23 kromosomov
- Kromatin – DNA in kromosomski proteini (histoni in nehistonski proteini, RNA)

183

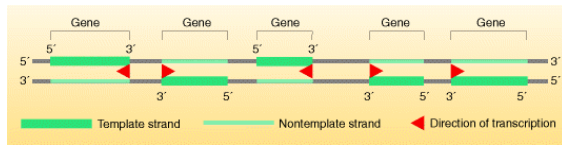
Introni in eksoni – značilnost evkariontskega genoma



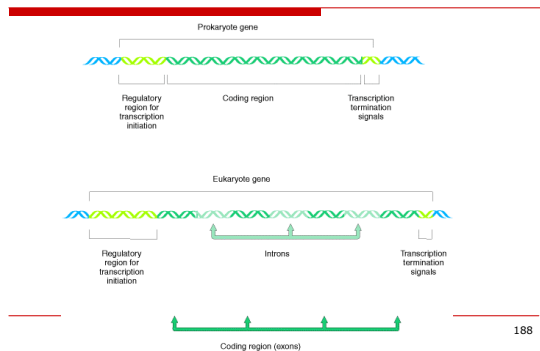
Po-translacijske modifikacije prepisa RNA pri evkariontih



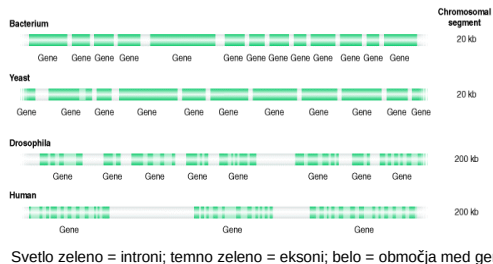
Organiziranost informacije v genomu – prepisovanje RNA v obe smeri



Struktura gena – prokariotskega in evkariontskega



188



Svetlo zeleno = introni; temno zeleno = eksoni; belo = območja med geni.

189

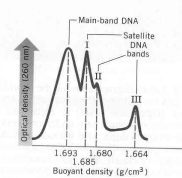


Razlaga prejšnjega diapozitiva

- Shematski prikaz dela kromosoma 2 vinske mušice *Drosophila melanogaster*. Shema prikazuje približno 3-odstotke genoma, razporejeno v 6 zaporednih segmentih.
- Mavrično obarvana proga: vsebnost G-C bp.
- Črne vertikalne črte različne debeline: lokacija transposonskih elementov, debelejša proga predstavlja skupine teh elementov.
- Obarvane škatle: geni (znani in predvideni), ki kodirajo proteine na eni strani DNA (škatle nad srednjo progo) in geni, kodirani z drugo stranjo (škatle pod srednjo progo).
- Dolžina vsakega gena vključuje eksoni in introne.
- Višina vsake škatle (ki predstavlja gen) je proporcionalna številu cDNA v različnih podatkovnih bazah, ki se ujemajo s tem genom.
- Barva vsake škatle, ki predstavlja posamezne gene, kaže če je v drugih organizmih tudi prisoten visoko soroden gen s tem genom. Npr. MWY pomeni, da ima gen sorodne gene pri sesalcih, nematodih in kvasovkah. (Mark D. Adams et al., Science 287:2185–2195, 2000.)

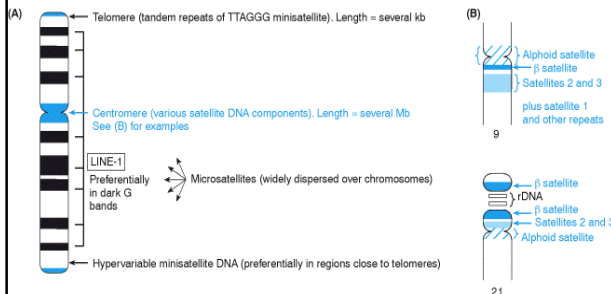
191

- Prokarioti – vsak gen je na kromosomu praviloma prisoten le enkrat (geni za rRNA so prisotni v več kopijah).
- Evkarionti – nekatera nukleotidna zaporedja se večkrat ponovijo – repetitivna DNA (ponavljajoča zaporedja)
 - Proučevanje zgradbe DNA po izolaciji in fragmentaciji z določanjem gostote ("CsCl density gradient").
 - Pri prokariotih se DNA nahaja le v enem pasu
 - Pri evkariontih se DNA nahaja v glavnem pasu in v treh manjših satelitskih pasovih – satelitska DNA – ponovitve zaporedij ACAAATT ali ATAAACT ali ACAAATT ipd.
 - Satelitska DNA se v genomu evkariontov pogosto nahaja blizu centromere ali telomere heterokromatina.



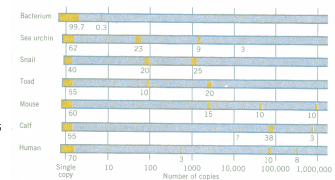
192

Položaj glavnih razredov ponavljajočih se delcev DNA na kromosomu pri evkariotih.
(A) Omejene lokacije nekaterih oblik tandemskih ponovitev DNA (satelitska DNA) v heterokromatinu (predvsem v centromerah) in minisateliti (predvsem v telomerah). **(B)** Organiziranost satelitske DNA v centromerah. Prikazana je lokacija različnih oblik satelitskih DNA na kromosomu 9 in na kromosomu 21 (akrocentrični kromosom).
 Tyler-Smith and Willard (1993) *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **3**, 390–397

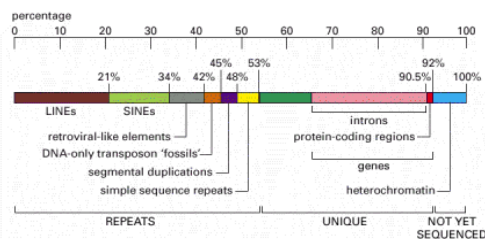


Evkarioti vsebujejo:

- del genomskega materiala, ki se nahaja le v eni ali nekaj kopijah ("single copy gene")
- del genomskega materiala, ki se nahaja v nekaj kopijah – 10 do 10^5 kopijah ("middle repetitive DNA")
- Del genomskega materiala, ki se nahaja v mnogih kopijah – 10^5 kopijah in več ("highly repetitive DNA")



194



Predstavitve vsebine nukleotidnega zaporedja humanega genoma. **LINE** (long interspersed nuclear elements - dolgi razpršeni jedrni elementi), **SINE** (short interspersed nuclear elements - kratki razpršeni jedrni elementi), **elementi podobni retrovirusom, transpozoni** – mobilni genetski elementi. Nastali so z replikacijo, nove kopije so se vstavljale na različne položaje. **Preproste ponovitve zaporedij** (simple sequence repeats) – kratka nukleotidna zaporedja (manj kot 14 pb), ki se večkrat ponovijo - čez dolge razdalje genoma. **Duplikacije segmentov** predstavljajo daljše dele genoma (1000 – 200,000 bp), ki se nahajajo na dveh ali več lokacijah v genomu. Nekaj več kot polovica enkratnih zaporedij v genomu predstavljajo **geni**, preostanek so verjetno zaporedja **regulatorne DNA**.

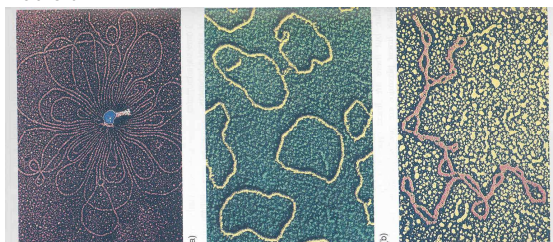
195

- Večina strukturnih genov je v eni kopiji – DNA, ki se prepiše v RNA in se prevede v proteine
- Geni za histone, rRNA molekule, ribosomske proteine – v celici morajo biti v velikih količinah - se nahajajo v več kopijah (srednje repetitivna)
 - Srednje repetitivna zaporedja DNA so zelo verjetno vpletena tudi v regulacijo izražanja genov.
- Visoko repetitivna DNA – večinoma v neaktivnem heterokromatinu. Vloga še neznan:
 - Strukturna vloga?
 - Vloga pri procesu parjenja kromosomov med mejozo?
 - Sodelovanje pri rekombinaciji?
 - Zaščita pomembnih zaporedij DNA?
 - Odvečna DNA, ki je na razpolago za evolucijski razvoj?
 - Odvečna DNA.

196

Virusni genom, plazmidi, genom organelov (mitohondrijev, kloroplastov)

a) fag T2; b) plazmid *Escherichia coli*; c) mitohondrijska DNA človeka



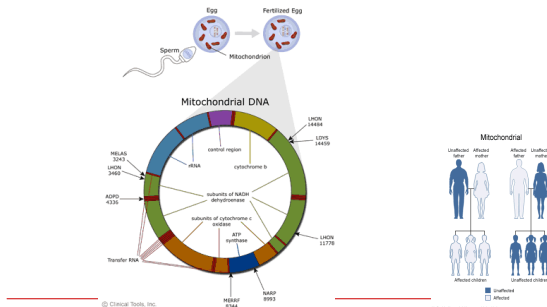
197

DNA različnih organelov

- Genetski elementi se nahajajo tudi v mitohondrijih in kloroplastih
- Dvoverižna DNA
 - V vsaki celici je več mitohondrijev/kloroplastov
 - Vsak mitohondrij/kloroplast vsebuje več molekul DNA
- V posamezni celici je na stotine mitohondrijskih/kloroplastnih molekul DNA
- Na organski molekuli DNA so nekateri geni, potrebni za delovanje tega organela – vendar je za popolno delovanje organela potrebno sodelovanje celičnega mehanizma, kodiranega z jedrnim kromosomom.
- Običajno so krožni, lahko tudi linearni

198

Genom mitohondrija

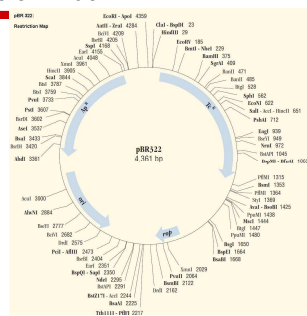


Genom plazmida

- Majhni genetski element
- Ni nujen za preživetje organizma
- Pogost pri bakterijah, včasih pri glivah in rastlinah
- Običajno krožen v bakterijah, linearen v glivah in rastlinah
- Velik nekaj tisoč kbp (kilo baznih parov)
- Za podvajevanje in vzdrževanje plazmida uporabljajo celični mehanizem gostitelja.
- Običajno vsebujejo gene, ki:
 - so odgovorni za rezistenco na antibiotike,
 - kodirajo toksine,
 - omogočajo združevanje bakterijske celice s svojim gostiteljem

200

Genom plazmida



Virusni genom

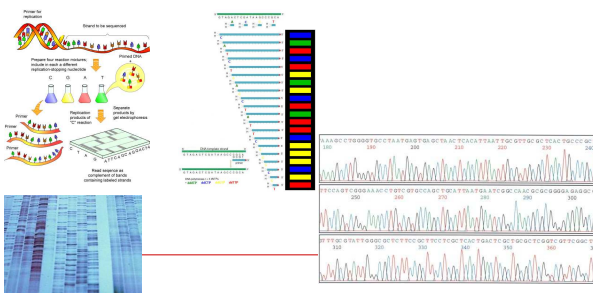
Virus ni sposoben živeti izven celice gostitelja – reproducira se lahko le znotraj gostitelja. Sestavljen iz proteinskega plašča in sredice, kjer se nahaja genom

- Genom je lahko molekula DNA
 - enoverižna
 - ali dververžna
- Genom je lahko molekula RNA
 - enoverižna
 - ali dververžna
- Nukleinska kislina je lahko linearna ali krožna
- Velika variabilnost virusov in virusnega genoma – prilagajanje na pogoje preživetja.
- Za obstoj uporablja celične mehanizme gostitelja.

202

Metode proučevanja genoma - sekvenciranje

- Ročno – z vgrajevanjem dNTP-jev brez 3'OH skupine
- Avtomatsko – pomnoževanje z vgrajevanjem označenih dNTP-jev



□ Kromosomi evkariontov

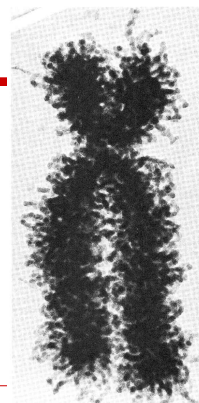
- Zgradba
- Oblika
- Načini proučevanja
 - Kariotipizacija
 - FISH

204

Slovenski medicinski slovar

- *Kromosom je struktura v celičnem jedru v obliki niti, nosilec genov, sestavljen iz DNA, histonov in nehistonskih proteinov, v celičnem ciklusu viden predvsem med mitozo in mejozo*
- Število in zgradba kromosomov so značilni predvsem za vrsto organizma

205

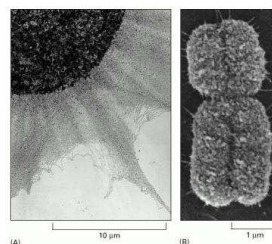


206

- Kromosomi, sestavljeni iz DNA in iz proteinov, so značilna gosta telesa, ki se nahajajo v jedru celice. Genetska informacija se nahaja na molekuli DNA v obliki linearnega zaporedja baz (ATGC).
- DNA posameznega kromosoma je ena dolga molekula, ki je močno zavita in kondenzirana. Zaporedje DNA za posamezno značilno lastnost se imenuje gen. Vsak kromosom vsebuje nekaj tisoč genov, ki so veliki od nekaj tisoč do dveh milijonov baz.
- Med fiziološkim delovanjem celice – med interfazo – so kromosomi manj zaviti in niso vidni pod svetlobnim mikroskopom. Med celično delitvijo, mitozo, pa postanejo kromosomi močno kondenzirani, takrat so vidni kot temna telesa znotraj jedra celice. Kromosome najlažje vidimo in identificiramo med metafazno stopnjo celične delitve.
- Značilno proganje kromosomov je posledica barvanja kromosomov z različnimi barvili. Proganje kromosomov je bilo prvič uporabljeno leta 1960. Izkušeni citogenetiki lahko razporedijo kromosome v značilne idiograme, če opazujejo kromosome pod svetlobnim mikroskopom.

207

Primerjava interfaznih kromatid s kromatinom v mitotičnem kromosomu



- A) Elektronska mikrofografija prikazuje kromatin, ki leze iz liziranega interfaznega jedra.
- (B) Mikrofografija z vrstičnim elektronskim mikroskopom prikazuje mitotični kromosom. Kondenzirani podvojeni kromosom, dve kromatidi sta še vedno povezani v centromeri.

Kromosomi človeka – velikost

kromosom št.	Mbp	kromosom št.	Mbp
1	246.1	13	113.0
2	243.6	14	105.3
3	199.3	15	100.2
4	191.7	16	90.0
5	181.0	17	81.8
6	170.9	18	76.1
7	158.5	19	63.8
8	146.3	20	63.7
9	136.3	21	46.9
10	135.0	22	49.3
11	134.4	X	153.6
12	132.0	Y	22.7

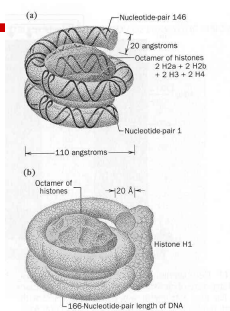
Histoni

- Bazični proteini (pozitivni naboj pri nevtralnem pH)
- Sestavljeni so iz pet osnovnih proteinov:
 - H1, H2a, H2b, H3, H4
- Skupaj z DNA molekulo sestavljajo malo elipsoidno strukturo
 - nukleosom (2xH2a, 2xH2b, 2xH3, 2xH4 + DNA)
- Povezujejo jih histoni H1
- Zelo ohranjeni med evolucijo, zelo majhne razlike v sestavi histonov pri različnih organizmih – zelo pomembna vloga v organizmu.

210

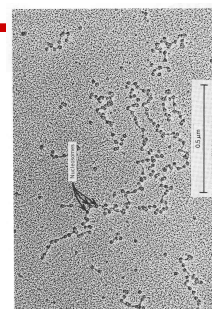
Nukleosom

- DNA je skupaj s histoni (2xH2a, 2xH2b, 2xH3, 2xH4 + DNA) zapakirana v nukleosom, nukleosomske sredice med seboj povezuje H1.



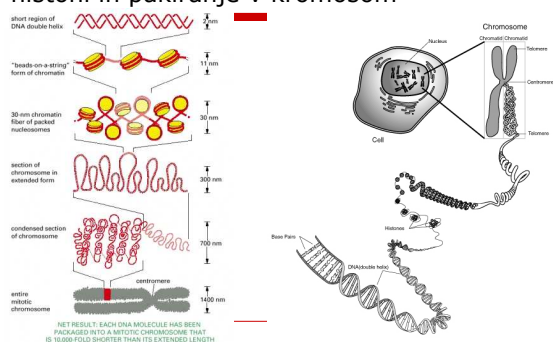
211

- Dolžina DNA v največjem humanem kromosomu je ca 85 mm DNA
- Metafazni kromosom – dolžina ca 10 μ m



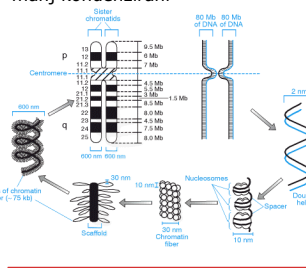
212

Zavijanje molekule DNA, sestavljanje s histoni in pakiranje v kromosom



Zavijanje molekule DNA, sestavljanje s histoni in proteini
ogrodja in pakiranje v kromosom – od dvojne vijačnice do
metafaznega kromosoma.

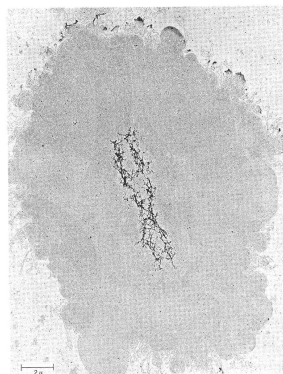
Dinamičnost strukture – aktivni segmenti kromosoma so manj kondenzirani



Humani kromosom 17
(proganje G). Ocenjena
razmerja pakiranja
(stopnja krčenja linearne
molekule DNA)
kromosoma: 1:6 za
nukleosome, 1:36 za 30
nm vlakno in $>1 : 10\,000$
za metafazni kromosom.

214

- Nehistonski proteini – sestavljajo ogrodje kromosoma



215

Centromere

- ❑ Ohranjene regije kromosoma.
- ❑ Mesta, kjer se sestrski kromatidi združujeta.
- ❑ Mesta pripenjanja mikrotubulov delitvenega vretena.
- ❑ Mutacije v nekaterih delih centromer povzročijo kromosomske mutacije – napake pri delitvi kromosomov.

Epigenetika

- Dedne spremembe v izražanju genov, ki ne vključujejo sprememb v zaporedju DNA.
- <http://learn.genetics.utah.edu/content/epigenetics/intro/>

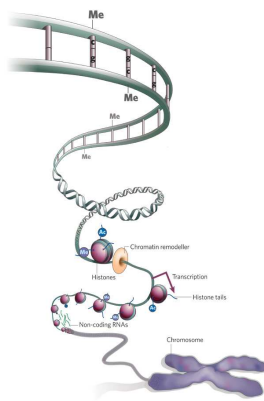
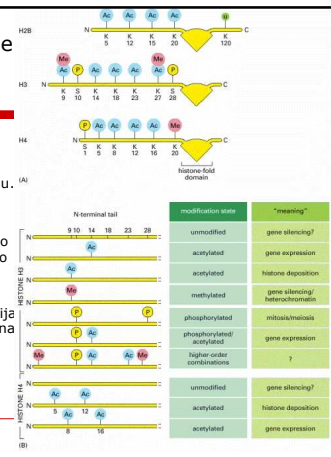
Kovalentne modifikacije aminskega konca histonov

Modifikacije značilnih položajev naaminskem koncu histona imajo različne učinke, odvisno od drugih značilnosti kromatina na tem položaju.

Npr. fosforilacija histona H3 na položaju 10 je povezana s kondenzacijo kromosoma med mitozo in meozo, pomembna je tudi za nivo izražanja genov.

Nekatere modifikacije histonov medsebojno sodelujejo. Npr. metilacija H3 na položaju 9 zavira fosforilacijo na položaju 10 in obratno.

- **Me** = metilna skupina;
- **Ac** = acetilna skupina;
- **P** =fosfat;



- ❑ Metilacija citozinov na zaporedju DNA
- ❑ Kovalentne modifikacije koncev histonov
- ❑ Posamezne oblike histonov
- ❑ RNA_i
- ❑ Transkripcijski faktorji





Želgovinasta obarvanost kožuha pri mačkah (mozaična oranžna in ne-oranžna obarvanost)

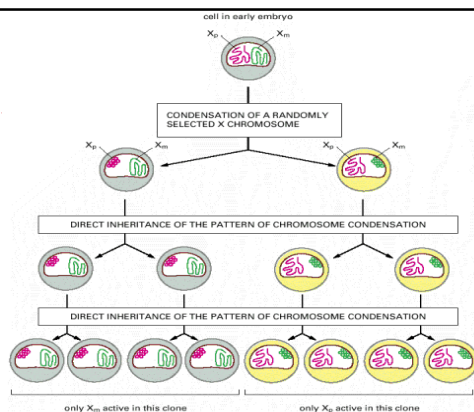


231

Inaktivacija kromosoma X

- Oranžna barva dlake – delovanje dominantnega alela O (na kromosomu X), ki preprečuje proizvodnjo temnega pigmenta
- Ne-oranžna obarvanost – delovanje recisivnega alela o (na istem lokusu), ki omogoča proizvodnjo temnega pigmenta.
- Želgovinasta obarvana mačka je heterozigot Oo .
- Del kromosoma X pri samicah v zgodnjih fazah razvoja je neaktiven.
- Kateri kromosom X je neaktiven, je odvisno od naključja.
- Zato je v nekaterih celicah dlake oranžna obarvanost, v drugih pa ne-oranžna obarvanost.

232



233

Spolni kromatin - Barr-ovo telesce

- Barr-ovo telesce je kromosom X, ki se med mitozo kasneje podvoji.
- Lyonina hipoteza: inaktivirani kromosom X je izbran naključno – posamezni kromosom X je pri samici aktiven v približno polovici celic.
- Inaktivacija kromosoma X je kompenzacija za razliko v "dozi" genov pri samcih, ki imajo le en kromosom X.
- Osebe, ki imajo več kot par kromosomov X, imajo več Barr-ovih telescev.

234

- Na kromosomu X se nahajajo nukleotidna zaporedja XIC (**X inactivation center**), ki kodirajo faktorje, ki inaktivirajo enega izmed kromosomov X.
- Inaktivacija kromosomov nastane zaradi metilacije zaporedij DNA – dodajanje metilne skupine CH₃ na molekulo citozina poleg guanina (otočki CpG).
 - Inaktivirani so tudi segmenti drugih kromosomov, ne le kromosoma X – **genomski imprinting**.
- Utišanje genov na kromosomu X (silencing).
- Proces demetilacije omogoča ponovno aktivacijo gena.

235

Veja genetike – citogenetika

- Proučuje morfološke značilnosti kromosomov (fizioloških in njihovih anomalij)
- Velikost kromosoma
- Število kromosomov
- Položaj centromere:
 - telocentrično,
 - akrocentrično,
 - metacentrično.
- Položaj organizatorja nukleolusa
- Proganje kromomer
- Heterokromatin
- Evkromatin

236

- Heterokromatin** – bolj zgoščen kromatin, bolje se obarva s specifičnimi barvanji (barvanje po Feulgenju), viden s svetlobnim mikroskopom. Večinoma genetsko neaktiven.
- Evkromatin** – se le rahlo obarva s specifičnimi barvanji, raztegnjena vlakna. Genetsko in metabolno aktivni odseki kromosoma.

237

- Kromosomi se v aktivni celici nahajajo v raztegnjeni obliki v nukleusu.
- Kromosome lahko gledamo pod svetlobnim mikroskopom
 - vendar le v obdobju tik pred, med in takoj po delitvi celice.
- Med delitvijo celice so kromosomi v zgošчени obliki
 - kar omogoči pravilno razporejanje kromosomov v posamezno novo nastalo celico.
- Citogenetika proučuje značilnosti kondenziranih kromosomov
- Kromosome razporejamo v kariotipe – (jedrne tipe)

238

Število kromosomov pri različnih organizmih

TABLE 2-3
Numbers of Pairs of Chromosomes
in Different Species of Plants and Animals

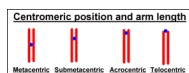
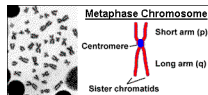
Common name	Species	Number of chromosome pairs	Common name	Species	Number of chromosome pairs
Mosquito	<i>Culex pipiens</i>	3	Wheat	<i>Triticum aestivum</i>	21
Housefly	<i>Musca domestica</i>	6	Human	<i>Homo sapiens</i>	23
Garden onion	<i>Allium cepa</i>	8	Potato	<i>Solanum tuberosum</i>	24
Toad	<i>Bufo americanus</i>	11	Cattle	<i>Bos taurus</i>	30
Rice	<i>Oryza sativa</i>	12	Donkey	<i>Equus asinus</i>	31
Frog	<i>Rana pipiens</i>	13	Horse	<i>Equus caballus</i>	32
Alligator	<i>Alligator mississippiensis</i>	16	Dog	<i>Canis familiaris</i>	39
Cat	<i>Felis domesticus</i>	19	Chicken	<i>Gallus domesticus</i>	39
House mouse	<i>Mus musculus</i>	20	Carp	<i>Cyprinus carpio</i>	52
Rhesus monkey	<i>Macaca mulatta</i>	21			

- kariotip** -a m število, velikost in oblike vseh metafaznih kromosomov kake evkariontske celice, ki se za citogenetske analize urejajo v idiogram; sin. kariogram
- idiogram** -a m diagram metafaznih kromosomov evkariontske celice, v katerem so kromosomi razporejeni v homolognih parih, po padajoči velikosti, ob upoštevanju lege centromere in identične obarvanosti posameznih odsekov homolognih kromosomov v sedem skupin pri človeku (A, B, C, D, E, F, G), omogoča analizo kariotipa

240

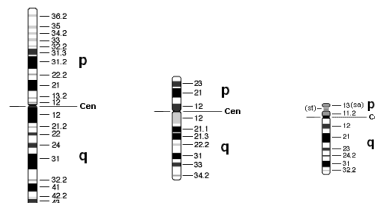
Kriteriji za postavljanje kromosomov v idiogram

- Velikost kromosoma
- Velike razlike pri različnih kromosomih, pri človeku največji (kromosom 1) 4 x večji od najmanjšega (kromosom 22)
- Položaj centromere – konstrikcija na kromosomu, ki deli kromosom na dve roki.
- Položaj organizatorja jedra – nukleolus
- Položaj kromomer (odebeljenega odseka na kromosomu) na kromosomu
- Položaj heterokromatina in evkromatina
- Proganje kromosomov



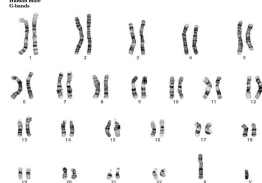
241

Metacentrični (kromosom 1), submetacentrični (kromosom 9), akrocentrični kromosom (kromosom 14)

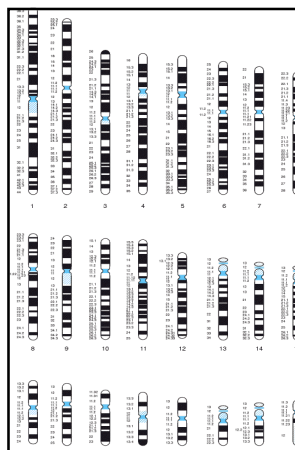


242

Razmaz kromosomov in humani kariotip (G-proganje)

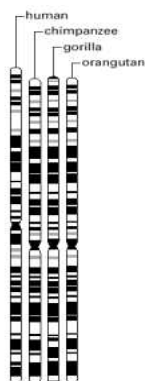


243

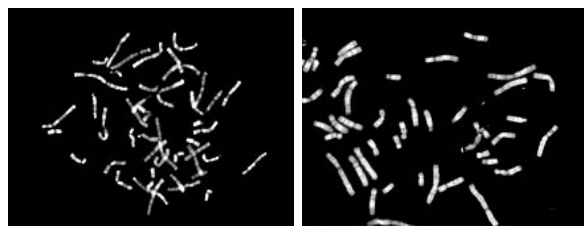


244

Primerjava kromosoma 1 različnih primatov po G-proganju



Fluorescentno barvanje kromosomov



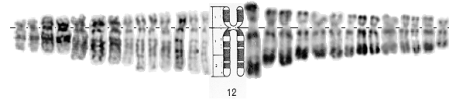
246

C-proganje – prikazovanje centromer



247

- Humani kromosom 12, prikazan po različnih pogojih obdelovanja



248

- S kariotipom proučujemo fiziološka stanja in določamo nekatere znane genetske anomalije, ki nastanejo zaradi kromosomskih aberacij.
- Pri ljudeh so poznani:
 - Robertsonova translokacija
 - Trisomija kromosoma 21
 - Klinefelterjev sindrom (samci - xxy)
 - Turnerjev sindrom (XO)
- Podobne aberacije se pojavljajo tudi pri živalih

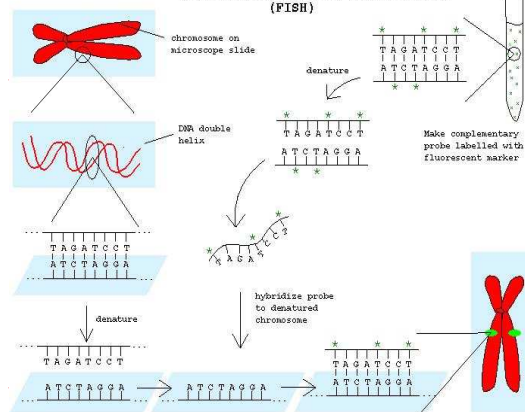
249

Kariotip miši (40, xx)

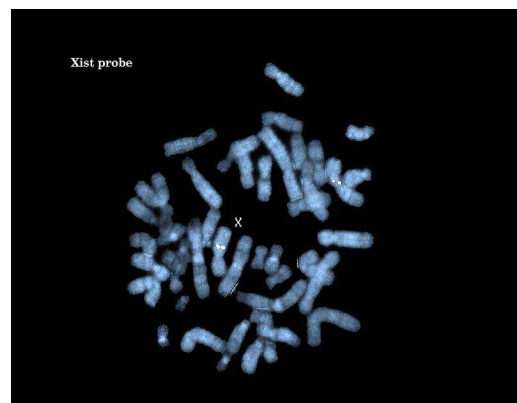


250

Fluorescence In-Situ Hybridization (FISH)

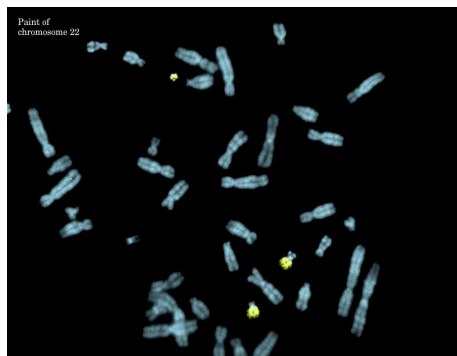


Hibridizacija s fluorescentno označeno sondo, značilno za kromosom X



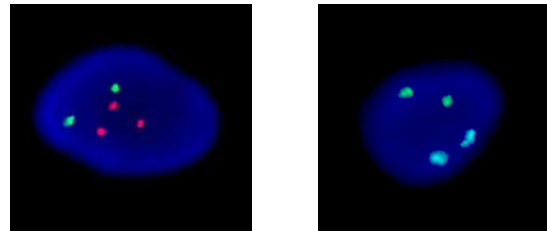
252

Hibridizacija s fluorescentno označeno sondo, značilna za kromosom 22

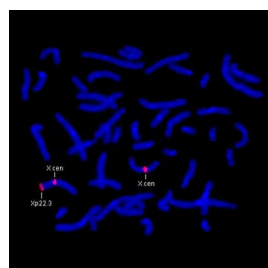


253

FISH v jedru z interfaznimi kromosomi
(levo: zelena sonda – kromosom 13, rdeča – kromosom 21;
desno: modro – kromosom 18, zeleno – kromosom X)



254



- Metafazni kromosom, ena sonda značilna za centromero X, druga sonda značilna za "Xp22.3" – področje, ki kodira steroidno sulfatazo.
- Nosilka defekta na kromosomu X

255

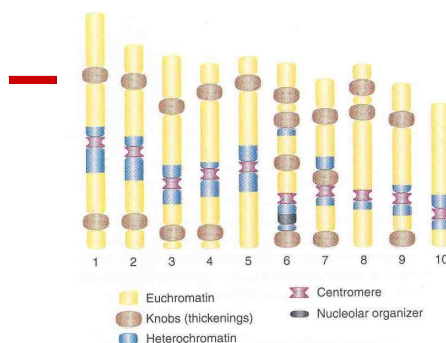
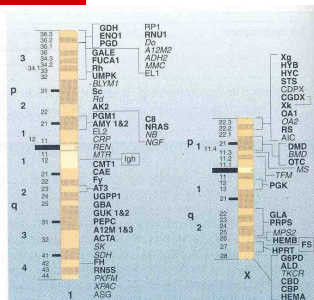


Figure 2-16 The landmarks that distinguish the chromosomes of corn.

256

Proganje kromosomov

- Barvanje s specifičnimi barvili:
 - Proge Q (quinacrine)
 - Proge G (barvilo Giemsa) - najpogostejše uporabljeno barvanje, temnejši pasovi predstavljajo heterokromatin, ki se kasneje replicira, je bogat z AT. Svetle proge so evkromatin, replicirajo se zgodaj, bogate z GC.
 - Proge R (reverzno Giemsa barvanje)
- Humani kromosom 1 in kromosom X – proge G



257

Določanje spola

- Različni sistemi determinacije spola organizma

258

- Največ proučevanj opravljenih:
 - na vinski mušici (*Drosophila melanogaster*)
 - Na človeku (*Homo sapiens*)
- Višje živalske in rastlinske vrste imajo praviloma dva spola (moški spol; ženski spol)
 - Samice proizvajajo jajčne celice, makrospore
 - Samci proizvajajo spermije, mikrospore
 - Izogamete (pri izogamiji) moške in ženske gamete so morfološko enake – pri nekaterih nižjih evkariontih (zeleni alge)
- Hermafroditizem – pri nekaterih nižjih vrstah živali isti osebek (hermafrodit) proizvaja moške in ženske spolne celice (*Caenorhabditis elegans* – ima dva spola: hermafrodita in moški spol).

259

- Genetska determinacija spola
- Vpliv temperature na determinacijo spola
- Vpliv okolja na oblikovanje spola
- Vpliv starosti na determinacijo spola

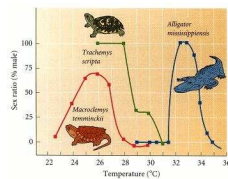
260

Na determinacijo spola vpliva temperatura

- Ameriški aligator (*Alligator mississippiensis*)
- Rdečeuha želva (*Trachemys scripta elegans*)
- *Macroclmys temminckii*

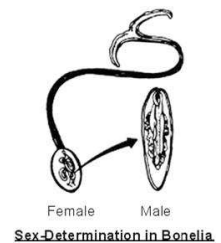
Možen vpliv na delovanje encima aromataze, ki testosteron pretvori v estrogen.

Možen vpliv polikloriranih bifenolov (PCB-jev), ki imajo estrogeno delovanje.



Na determinacijo spola vpliva okolje

- Prosto živeča *Bonellia* – morski črv – samica (10 cm)
- V stiku z drugo bonelijo (s kemikalijo, ki jo izločajo bonelije (bonelin)) – samci (nekaj mm)



Sex-Determination in Bonellia

Na determinacijo spola vpliva okolje

- Morski polž *Crepidula fornicata*. Dno
- Mladi osebki so vedno samci. Sledi degeneracija reproduktivnega sistema, labilna stopnja, naslednja stopnja je odvisna od položaja v skupku osebkov. Če se dotika samice, bo samec, če takega polža odstranimo, bo postala samica.

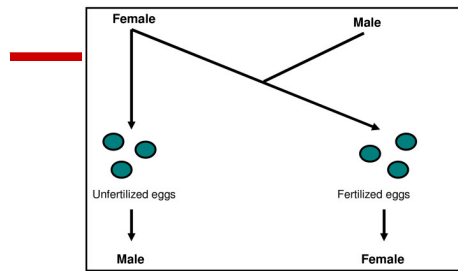


Polž *Crepidula fornicata*

Spolni kromosomi - kromosomi, ki se razlikujejo pri obeh spolih (avtosomi so enaki pri obeh spolih), določajo tudi druge lastnosti, ne le lastnosti, vezane na spol

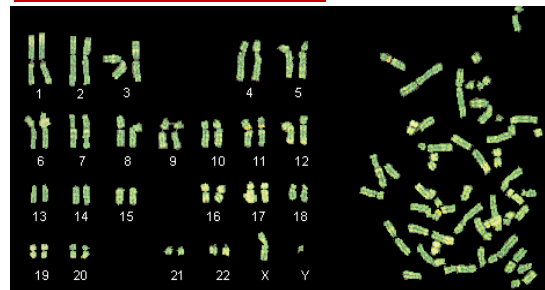
- *Sesalci*:
 - avtosomi
 - in par spolnih kromosomov
 - XX – samica (homogametni spol);
 - XY – samec (heterogametni spol)
- *Drosophila melanogaster* ima:
 - tri pare avtosomov
 - in par spolnih kromosomov
 - XX – samica (homogametni spol);
 - XY – samec (heterogametni spol)
- Nekatere oblike kobilic:
 - XO – samica (heterogametni spol);
 - XX – samec (homogametni spol)
- Črv – nematod *Caenorhabditis elegans*:
 - XO – samec
 - XX – hermafrodit
- Ptiči, večje, metulji:
 - ZW – samica (heterogametni spol);
 - ZZ – samec (homogametni spol)

264

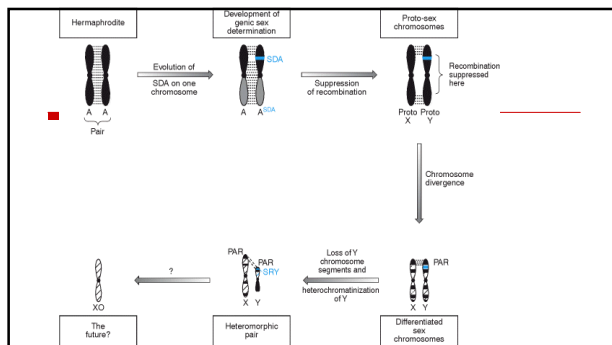


Haplodiploid reproduction. In Hymenoptera, unfertilized eggs develop into uniparental haploid males whereas fertilized eggs into biparental diploid females.

Kariotip človeka



266



Spolni kromosomi sesalcev so se verjetno razvili iz para avtosomov, en od teh je pridobil alel za determinacijo spola (**sex-determining allele - SDA**), zato je prišlo do zmanjšane rekombinacije med parnim kromosomom in diferenciacije kromosoma Y. Rekombinacija se je ohranila le v majhnem delu – v **pseudoavtosomalnem** delu kromosoma (PAR). Ker ni bilo rekombinacije med parnim kromosomom, se mutacije – spremembe niso prenašale na parni kromosom – prišlo je do vedno večje razlike med kromosomoma. Večina kromosoma Y ni vključena v proces rekombinacije – prišlo je do več delecij, ki so se ohranjale.

Kromosom X, kromosom Y

Kromosom X in kromosom Y se priležeta med mejozo – imata nekaj skupnih delov, geni na teh segmentih so nepopolno vezani na spol – obnašajo se enako kot avtosomalni geni.

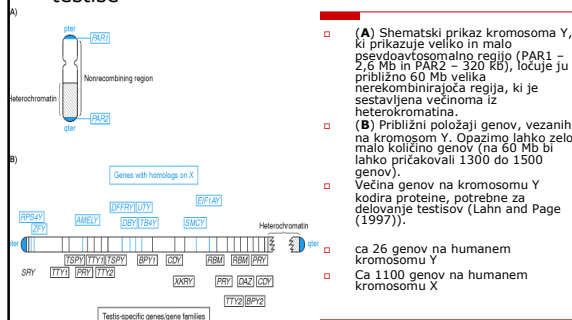
Drugi deli so drugačni med X in Y – na njih so geni, vezani na spol



FIGURE 6-18. Pairing regions of the X and Y chromosomes. Each sex chromosome contains a pairing region at the end of its p arm (red and black segments). At the extreme tip of each pairing region is a tiny segment (red) that contains homologous genetic material. In this segment a crossover event regularly takes place at meiosis. The remainder of the pairing region (black) is essentially nonhomologous, although a crossover event may take place in it on rare occasions.

268

Večina kromosoma Y je genetsko inaktivna, mnogi geni pa določajo izražanje proteinov, značilnih za testise



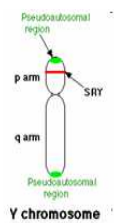
269

Determinacija spola pri sesalcih

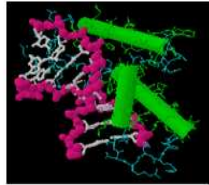
- Pri embriju – zasnove za gonade obeh spolov
- **Kromosom Y** je potreben za razvoj testisov
- Testisi fetusa proizvajajo snovi, ki vplivajo na razvoj osebka moškega spola (zavirajoči faktor Mullerijevskega sistema, ki bi se drugače razvil v ženska rodila; testosteron, ki vpliva na razvoj moških spolnih organov idr.).
 - Testis determining factor (TDF) - gen lociran na kratki roki kromosoma Y
- "**Sex determining region Y**" (**SRY**) – produkt tega gena vključi izražanje genov, ki sodelujejo pri razvoju moškega fenotipa
- Razvoj spola je zapleten proces, ki vključuje gene na spolnih kromosomih in na avtosomih.

270

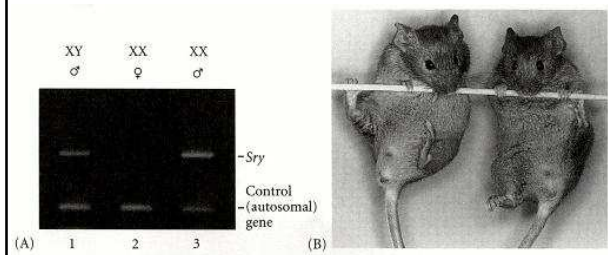
SRY (sex-determining region Y) gen na kratki roki (p) kromosoma Y pod psevdautosomalno regijo



Y chromosome



SRY (green) binds to DNA (pink) and distorts its shape. In so doing, it regulates genes that control the development of the testes.



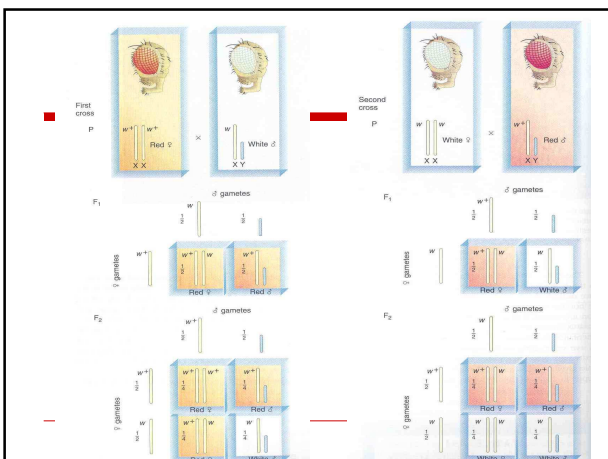
- Transgena miš XX z genom *Sry* je moškega spola.
- (A) Verižna reakcija s polimerazo in elektroforeza produkta reakcije prikazuje prisotnost gena *Sry* pri normalnem samcu XY in pri transgeni miški XX *Sry*. Gen ni pri miški XX iz istega gnezda.
- (B) Zunanje genitalije transgene miši so značilne za samca (desno) in so enake kot pri samcu XY (levo).

- Spolno-vezane lastnosti
 - Spolno vezane bolezni
- Vpliv spola na izražanje nekaterih lastnosti

Geni na X kromosomu – na spol vezane lastnosti

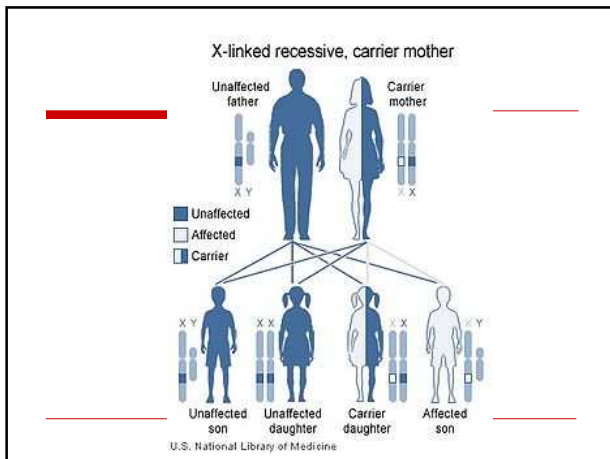
- Drosophila melanogaster* (Morgan):
 - Gen za bele oči (mutacija je nastala pri samcu - *w*)
 - Gen za rdeče oči (divji tip gena - *W*) – dominantni alel
 - F_1 generacija; 3:1 razmerje rdeče oči : bele oči
 - Vendar – vse živali z belimi očmi so bili samci; polovica samcev je imela rdeče oči; vse samice so imele rdeče oči
 - Torej – lokus gena za rdeče oči leži na kromosomu X, le ena doza gena je prisotna pri samcih

274



- Na kromosom X vezane recesivne lastnosti se pri materah ne izražajo, če so prisotne le v eni kopiji (na enem kromosomu),
- Pri moških potomcih se izražajo, če na kromosomu Y ni prisotnega homolognega alela – dovolj je ena kopija gena, da pride do izražanja
 - pseudodominanca

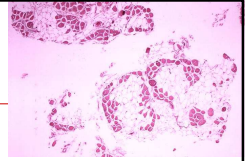
276



□ *Homo sapiens*:

■ Duchene-ova mišična distrofija

- okvara gena za distrofin – protein mišičnine, ki leži na kromosomu X) – pri moških 1 na 3.500, letalna bolezen.
- Možna prenatalna diagnostika mutiranega gena DMD (gen za distrofin ima 79 eksonov (2,2 Mbp), možnih je več oblik mutacij).
- Možno prenatalno določanje spola



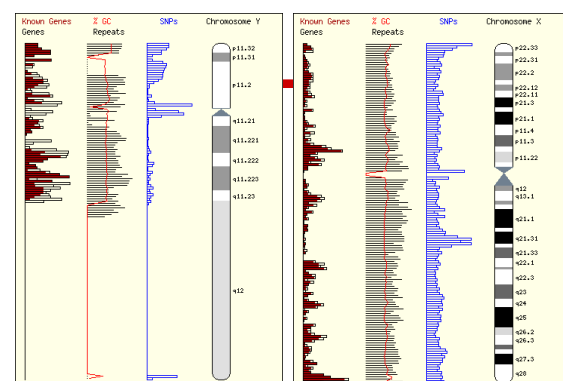
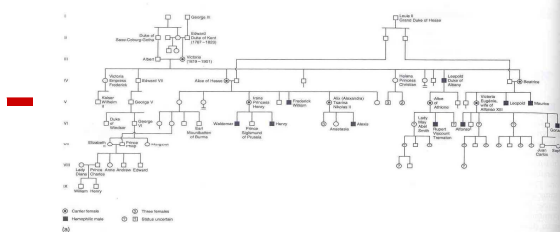
- Rdeče – zelena barvna slepota (recesivna – vezana na spolni kromosom X)(8% moških)
- Hemofilija (recesivna – vezana na spol) gen za faktor VIII je na kromosomu X
- Sindrom androgene neobčutljivosti
 - mutacija gena receptorja za androgene – na kromosomu X
- Dedovanje obarvanosti peres pri liniji piščancev (Plymouth rock) – lastnost vezana na kromosom Z (nosilci samci, pri samicah se izrazi)

Angleška kraljica Victoria (1819-1901)

- nosilka gena za hemofilijo.
- alel je prenesla na enega od svojih štirih sinov in vsaj na dve hčeri od petih.
- sin Leopold je imel hemofilijo in je umrl star 30 let, njene hčerke so bile le nosilke.
- s porokami njenih ženskih potomk v evropske kraljevske družine je prenesla hemofilijo v kraljeve družine Rusije, Nemčije in Španije.
- na začetku 20 stoletja je imelo 10 potomcev kraljice Viktorije hemofilijo.
- vsi so bili moškega spola.



280



Aleli, na katere vpliva spol

- Fenotip je odvisen od spola, spol vpliva na dominantnost alela – vpliv hormonov
- Lisasto govedo (heterozigotni osebk Mm):
 - pri samcih je dominantna mahagonij barva in recisivna rdeča barva
 - Pri samicah je dominantna rdeča barva in recisivna mahagonij barva
- Plešavost pri ljudeh:
 - Alel za plešavost je dominanten pri moških, isti gen je recisiven pri ženskah
- Rogate ovce:
 - Brezrožnost je dominantna pri samicah in recisivna pri samcih

283

Celični mehanizmi

Celica,
kromosomi,
celični ciklus,
reprodukcija.

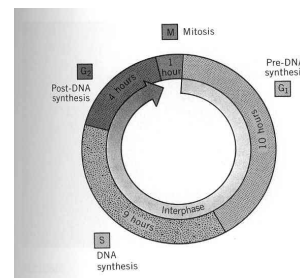
284

Celični ciklus

- Ohranjanje živalske vrste in rast posameznega organizma
 - Potrebno je večanje celične mase
 - Podvojevanje genetskega materiala
 - Natančna delitev genetskega materiala
- Ti procesi potekajo v natančno nadzorovanem celičnem ciklusu
 - Diploidna celica ($2n$) povečuje celično maso (stopnja G_1)
 - Podvojevanje genetskega materiala (stopnja S) – kromosomi (DNA) se podvojijo
 - Še ena stopnja rasti (stopnja G_2)
 - Ločevanje genetskega (ločevanje kromatid) in celičnega materiala – (stopnja M)

285

Stopnje celičnega ciklusa



286

Napredovanje celičnega ciklusa je odvisno od določenih nadzornih točk

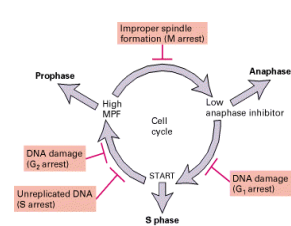
- Odločitev celice za začetek replikacije kromosoma – sporočilo v stopnji G_1
 - pri kvasovkah – START
 - pri živalskih celicah – restriksijska točka
 - (primerna velikost celice, obilica hranljivih snovi v okolici)
- Odločitev celice za mitotsko delitev nastopi na koncu stopnje G_2 .
- V celici se med različnimi stopnjami celičnega ciklusa nahajajo specifični regulatorni dejavniki, ki povzročijo delitev celice.
- Kontrolne točke celičnega ciklusa – preden pride do delitve celice:
 - Celica mora podvojiti celotno DNA, in to le enkrat
 - Celična masa se mora povečati

287

Štiri nadzorne točke celičnega ciklusa

Nadzorne točke, kjer lahko pride do zaustavitve celičnega ciklusa.

- Okvare v DNA zaradi iradiacije ali kemične modifikacije preprečujejo celicam v stopnji G_1 nadaljevanje v stopnjo S in celicam v G_2 nadaljevanje v stopnjo M (protein p53).
- Nepodvojena DNA ne vstopi v mitozo.
- Okvare v oblikovanju delitvenega vretena ali pritrditve kinetohor na delitveno vreteno preprečuje vstopanje v anafazo.



- Nekateri fenotipi celic se nikoli ne delijo, nikoli ne vstopijo v celični cikel, so v stopnji G_0 .
- Nekatere celice so nekaj časa v stopnji G_0 fazi, potem ponovno vstopijo v G_1 .
- Nekatere celice se ustavijo v stopnji G_2 , ko je genetski material podvojen (zaščitni mehanizem pri zarodnih celicah haploidnih organizmov).

289

Mitoza

- Mitoza je proces ločevanja kromosomov in delitve jedra. Sledi replikaciji – podvojevanju genetskega materiala v evkariontski celici.
- S procesom mitoze je zagotovljeno, da posamezna hčerinska celica (jedro) dobi kompletno kopijo genoma organizma. Pri večini evkariontov sledi mitotični delitvi celice – citokineza.

290

Mitoza – stopnja M celičnega ciklusa

- Proces mitoze zagotavlja prenos enakega genetskega materiala na hčerinske celice, kot se nahaja v starševskih celicah.
- Delitev kromatid (mitoza) in delitev citoplazme (citokineza)
- Poteka v več stopnjah:
 - (Interfaza)
 - Profaza
 - Metafaza
 - Anafaza
 - Telofaza
- V celici se pojavi centriol (organizira mitotični aparat v celici – aster in delitveno vreteno)

291

Profaza

- Genetski material (DNA), ki se nahaja v obliki kromatina, se kondenzira v strukture – kromosome.
- Ker se je genetski material podvojil, se v celici nahajata po dve kopiji vsakega kromosoma. Identični kromosomi – sestrski **kromatidi** – sta združeni na področju kromosoma, ki se imenuje – **centromera**. Med mitozo gre le ena kopija vsake kromatide v hčerinsko celico.
- Centrioli se podvoji. Centriol je organel, ki sodeluje pri oblikovanju mitotičnega aparata (delitvenega vretena in asterja). Centriola se ločita vsak na svoj pol. Sestrski kromatidi se zavijajo in krajšajo. Vlakna delitvenega vretena se pritrdijo na centromere. Vsaka sestrski kromatida je pritrjena na drug pol vretena (celice).

292

Metafaza

- Kromosomi (sestrski kromatide) se postavijo v ekvatorialno sredino celice. Vlakna delitvenega vretena so pritrjena na centrosom. V tem času so kromosomi najbolj zaviti, najkrajši, najboljše vidni – primerni za proučevanje morfoloških značilnosti kromosomov. Sestrski kromatidi so združene v področju centromere.
- Anafaza
 - Med anafazo pride do ločevanja sestrskih kromatid. Vsaka kromatida (zdaj se imenuje kromosom) ima zdaj svojo centromero. Kromosomi se pomikajo proti polu celice.
- Telofaza
 - Ponovno se oblikuje jedrna membrana okoli kromosomov.

293

Shema mitoze v živalski celici s štirimi kromosomi

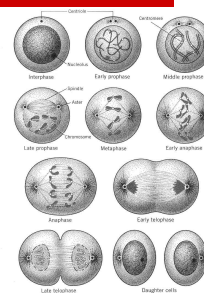
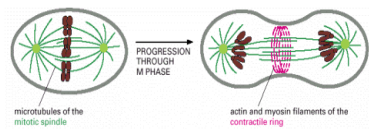
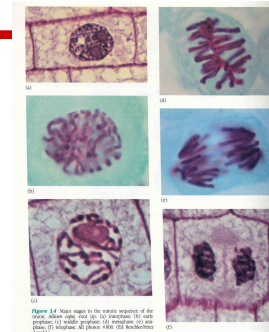


Figure 3.3 Schematic diagram of mitosis in an animal cell with four chromosomes.

294



Mitoza – korenina čebule

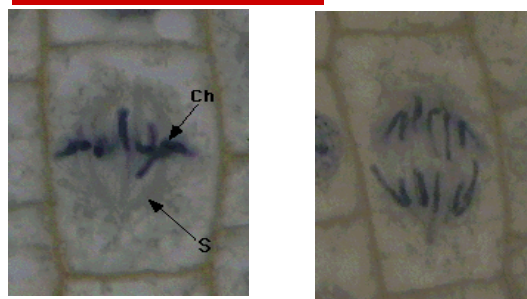


296

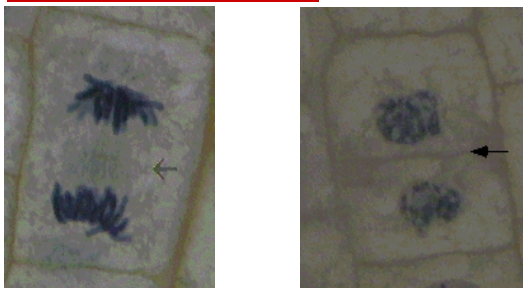
Interfaza, profaza



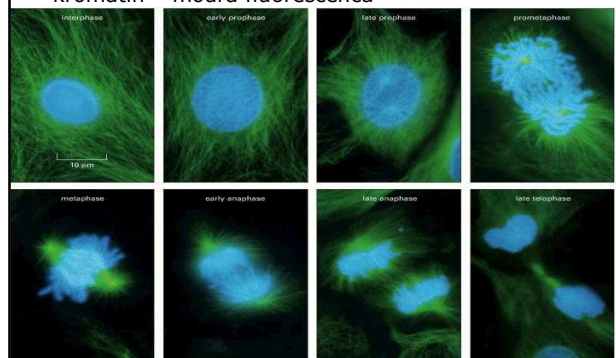
Metafaza, anafaza



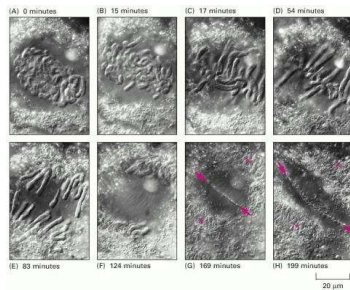
Zgodnja in pozna telofaza



Mikrotubuli – zelena fluorescenca kromatin – modra fluorescenca

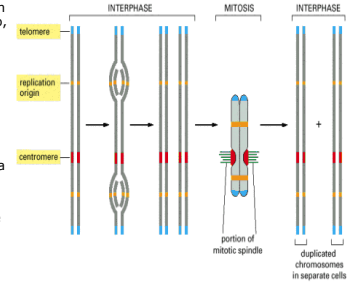


Mitoza – rastlinska celica



Nukleotidna zaporedja, potrebna za replikacijo in segregacijo evkariontskega kromosoma

- Vsak kromosom ima več začetnih mest replikacije, eno centromero, in dve telomeri.
- Zaporedje dogodkov značilnega kromosoma med celičnim ciklusom.
- Replikacija DNA se začne med interfazo na začetnih mestih replikacije, poteka v obe smeri,
- Med mitozo se na centromero podvojenega kromosoma pripne mitotično vreteno, da se med mitozo po ena kopija kromosoma razporedi v vsako hčerinsko celico.
- Centromera tudi drži kromatidi kromosoma skupaj, dokler se ne razdvojita. Telomere oblikujejo posebno zaščito na koncih kromosoma.



302

Rekombinacija genetskega materiala

- Pri evkariontih
 - Naključno razvrščanje kromosomov v posamezne gamete in rekombinacije posameznih delov kromosomov med meozo
 - Transpozicijski genetski elementi
- Pri prokariontih
 - Transformacija
 - Transdukcija
 - Konjugacija
 - Transpozicijski genetski elementi

Rekombinacija genetskega materiala

- Omogoča ločevanje koristnih in škodljivih mutacij.
- Ohranjanje koristnih mutacij v novih kombinacijah

- Rekombinacija med homolognimi nukleotidnimi zaporedji kromosomov:
 - generalizirana ali homologna rekombinacija (med meozo – spermatogeneza in oogeneza).
- Rekombinacija med specifičnimi pari nukleotidnih zaporedij:
 - specifična rekombinacija (site-specific recombination) – rekombinacija faga v kromosom bakterije.
- Preskakovanje določenega zaporedja DNA z neke lokacije na kromosomu na drugo:
 - transpozoni.

Meioza – redukcijska delitev

- Proces, s katerim se za spolno razmnoževanje zagotavljajo zarodne celice s **haploidnim** številom kromosomov.
- Kromosomi se podvojijo le enkrat, sledita dve zaporedni delitvi.
 - Homologni kromosomi se podvojijo, priležejo in rekombinirajo.
 - Med prvo meiotično delitvijo se kromosomi ločijo
 - V drugi meiotični delitvi se kromatidi posameznega kromosoma ločita, nastanejo štiri ločene zrele spolne celice s haploidnim številom **rekombiniranih** kromosomov, pripravljene na fertilizacijo.
 - Po fertilizaciji je ponovno vzpostavljeno diploidno število kromosomov.

306

Oblikovanje gamet pri živalih - gametogeneza

- Zarodne celice (spolne celice) - iz njih lahko zraste celoten organizem.
- Dozorevajo s procesom gametogeneze.
- Med gametogenezo se s procesom meioze diploidno število kromosomov zreducira na **haploidno** - **značilnost zrelih spolnih celic**.
- Zaradi **naključnega razporeditja kromatid** v posamezne celice in **rekombinacije genetskega materiala med prekrivanjem kromatid** se posamezne spolne celice razlikujejo - **variabilnost**.
- Gametogeneza vključuje tudi oblikovanje oocita (nalaganje velike količine hranljivih snovi) in spermatocita (lahke, gibljive celice).

307

Glavne stopnje profaze I meiotičke delitve

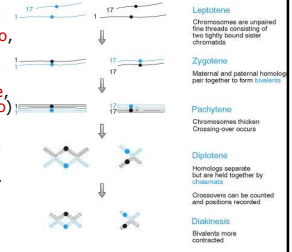
Leptonema - kromosomi ($2n$) so vidni kot posamezne **nitke**.

Zigonema - maternalni in paternalni homologni pari kromosomov **se priležejo**, tvorijo bivalente.

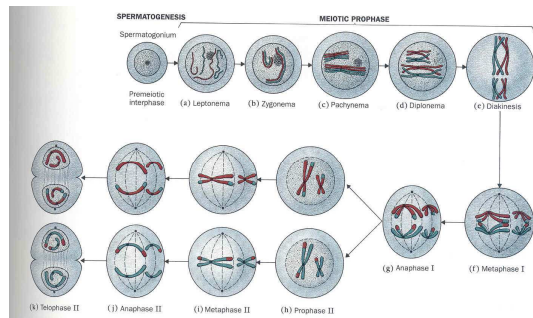
Pahinema - homologni kromosomi so vidni drug ob drugem, **tvorijo se kiazme**, ki omogočajo zamenjavo (**rekombinacijo**) genetskega materiala (crossing over).

Diplonema - kromosomi se krajšajo, po štiri kromatide so vidne v obliki **tetrad**, združene so na kiazmah in centromerah.

Diakineza - **krajšanje tetrad** omogoča opazovanje kromatid (homologne kromatide so združene, zato je vidno n število tetrad).



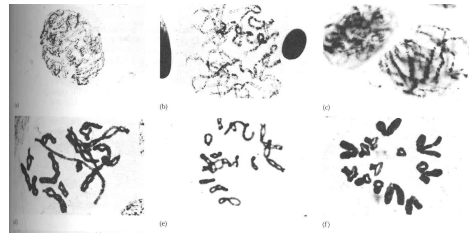
308



309

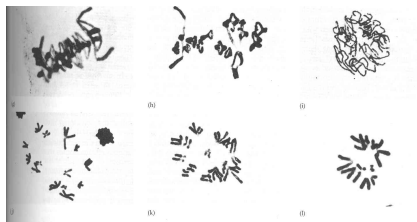
Stopnje pri meiotički delitvi - spermatogenezi salamandra

a) leptonema; b) zigonema; c) pahinema; d) diplonema; e) pozna diplonema; f) diakineza



310

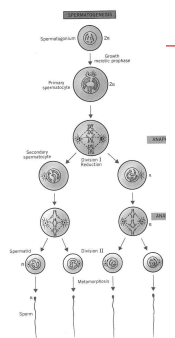
g) metafaza; h) metafaza; i) profaza II; j) metafaza II; k) anafaza II; l) haploidni set kromosomov



311

Spermatogeneza

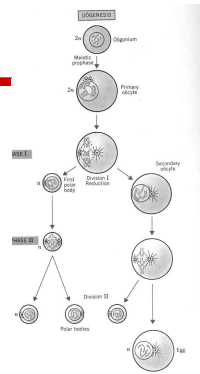
- Proces se odvija v testisu
- Začetna celica spermatogonij (diploidna celica - $2n$) raste, se poveča, nastane primarni spermatocit
- Spermatocit vstopi v prvo meiotičko delitev, nastane dva sekundarna spermatocita
- Vsak sekundarni spermatocit gre skozi drugo meiotičko delitev, proizvede dve spermatidi
- Spermatida spremeni obliko, razvije biček in dozori v zrel spermij



312

Oogeneza

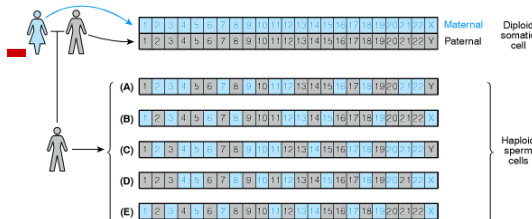
- Podoben proces kot spermatogeneza.
- Razlika le v dozorevanju celice – oocita – mnogo hranljivih snovi.
- Končni produkt oogeneze je ena velika celica in tri polarna telesa.



313

- Mendlov zakon segregacije** – je rezultat ločevanja homolognih kromosomov med anafazo I meiotске delitve.
- Mendlov zakon naključne razporeditve** – vsak par kromosomov se v metafazi I meiotске delitve porazdeli neodvisno od drugih kromosomov.

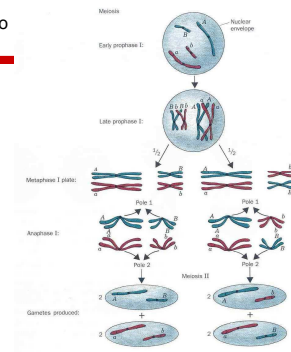
314



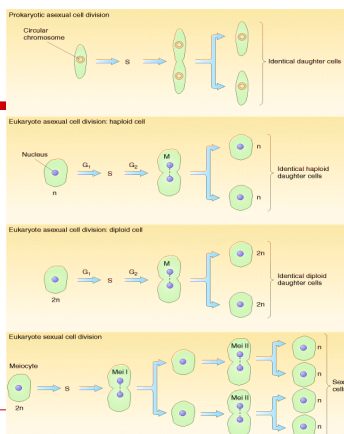
- Meioza**: neodvisno razporejanje maternalnih in paternalnih homolognih kromosomov med meozo I onogodi prvo stopnjo genetske raznovrstnosti. Možnih je 2^{23} ali 8,4 milijonov različnih kombinacij za izbiro posameznega kromosoma od 23 parov v diploidni celici. Gamete A-E prikazujejo le pet od možnih kombinacij maternalnih in paternalnih kromosomov. V tej shemi niso prikazane rekombinacije, ki nastanejo na nivoju posameznega kromosoma.

315

Segregacija in naključno razporejanje

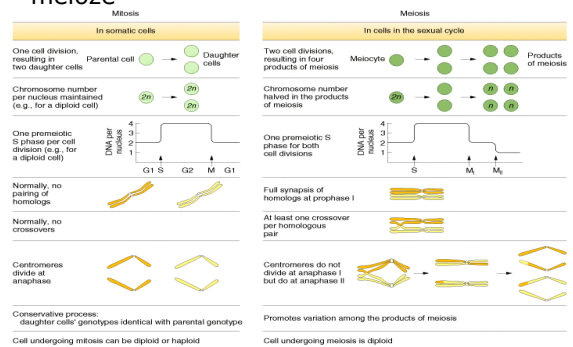


316



317

Primerjava osnovnih značilnosti mitoze in meioze

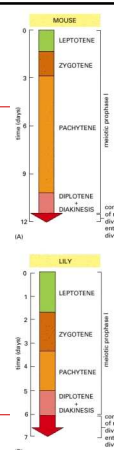


	Mitoza	Meioza
Lokacija	V vseh tkivih	Le v testisu in ovariju
Končni produkt	Diploidne somatske celice	Haploidni spermiji in jajčne celice
Replikacija DNA in delitev celice	Praviloma ena replikacija in ena delitev celice	Le ena replikacija in dve delitvi celice
Dolžina profaze	Kratka (pri ljudeh 30 min)	Meioza I je dolga in zapletena, lahko traja več let
Parjenje homolognih kromosomov	Ne	Ja (med mejozo I)
Rekombinacija	Redka, praviloma patološka	Fiziološko najmanj enkrat v vsaki roki kromosoma
Razmerje med materinsko in očetovskimi celicami	Genetsko identični	Genetsko različni (zaradi rekombinacije in neodvisnega razporedjanja kromosomov)

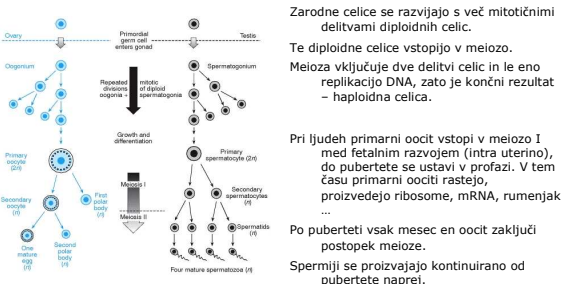
319

Primerjava trajanja posameznih stopenj meioze

- Približen čas trajanja meioze pri samcu miši (A) in pri rastlini liliji (B).
- Trajanje meioze je različno pri gametah samcev in samic iste vrste in različno pri istovrstnih gametah različnih vrst.
- Moške gamete pri človeku – 24 dni
- Moške gamete pri miši – 12 dni
- Moške gamete pri liliji – 7 dni.
- Meiotična profaza I je pri vseh vrstah daljša kot vse druge stopnje skupaj.



Razvoj zarodnih celic



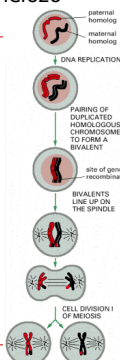
Rekombinacija Prekrižanje ("crossing-over")

Kromosomsko kartiranje (mapiranje)("Chromosome mapping") Vezane lastnosti ("linkage")

322

Prekrižanje ("crossing-over") – proces rekombinacije nukleinskih kislin med mejozo

- Rekombinacija genov na kromosomu** nastane zaradi prekrižanja kromatid dveh homolognih kromosomov – prenos odgovarjajočih delov verige nukleinskih kislin med homolognimi kromosomi.
- Rekombinacija NK nastane med komplementarnimi zaporedji, nobena baza NK med procesom rekombinacije kromosomov ni izgubljena.

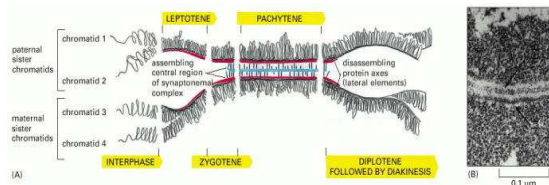


Prekrižanje – "crossing-over"

- Prelom** obeh homolognih kromosomov kromatid (verige DNA)
- Poteka po replikaciji kromosomov in prileganju homolognih kromosomov – prekrižanje tetrad.
- Nastane med stopnjo **pahineme**, ko nastanejo sinapse med homolognimi kromosomi v profazi I meioze
- Pride do izmenjave genetskega materiala paternalnega kromosoma in maternalnega kromosoma.
- Možna je tudi izmenjava genetskega materiala sestrskih kromatid – izmenjava popolnoma enakega genetskega zaporedja.
- Možnost, da bo prišlo do prekrižanja med dvema lokusoma narašča z oddaljenostjo teh dveh lokusov.
- Prekrižanje bolj pogosto pri oogenezi kot pri spermatogenezi, bolj pogosto v področju evkromatina kot heterokromatina.

324

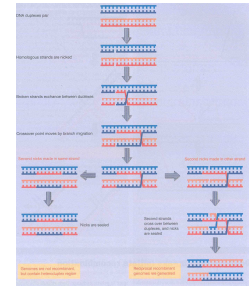
Tvorba sinaps - sinaptonemalnega kompleksa med meozo



325

Zarezovanje in ponovno združevanje zaporedij DNA – nastanek hibridne DNA

- zarezovanje odgovarjajočih točk na homolognih verigah DNA - encimi
- omogočeno je pomikanje in prekrivanje prostih koncev
- na mestu rekombinacije nastane hibridna DNA (heterodupleks DNA)
- točka rekombinacije se lahko premika v obe smeri
- proces se zaključuje s ponovnim zarezovanjem



326

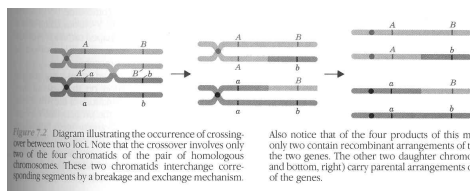
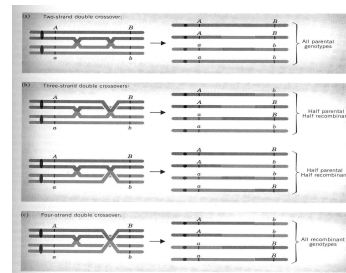


Figure 7.2 Diagram illustrating the occurrence of crossing over between two loci. Note that the crossover involves only two of the four chromatids of the pair of homologous chromosomes. These two chromatids interchange corresponding segments by a breakage and exchange mechanism.

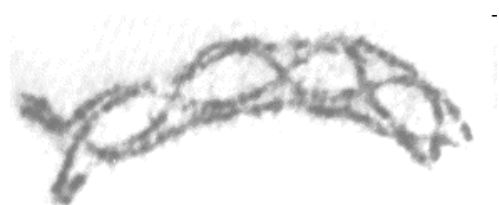
Also notice that of the four products of this meiotic event only two contain recombinant arrangements of the alleles of the two genes. The other two daughter chromosomes (top and bottom, right) carry parental arrangements of the alleles of the genes.

327



328

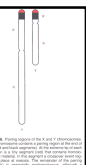
Mikrofotografija prikazuje 5 križanj kromosoma kobilice *Chorthippus parallelus*



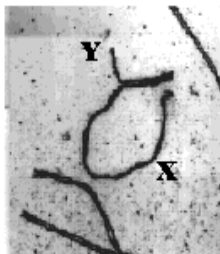
329

Prileganje kromosomov x in y med profazo I meiotičke delitve

- Kromosoma X – prileganje kromosomov enako kot avtosomi
- Meioza pri genotipu XY.
- Pri sesalcih sta oba kromosoma zelo različna. Prilegata se na področjih kromosoma, ki so homologni.
- Pri človeku – na obeh koncih kromosoma so homologne regije - **psevdoavtosomalni regiji** na kromosomu X in Y - 2.6 Mb veliko področje na koncu katke roke in 320 kb veliko področje na koncu dolge roke kromosoma.
- Do prekrivanja genetskega materiala vedno pride v tem območju.
- Psevdoavtosomalni regiji nista podvrženi inaktivaciji kromosoma X (kar bi lahko pričakovali, ker imata oba spola 2 kopiji)
- Zaradi prekrivanja genetskega materiala aleli na psevdoavtosomalnem področju spolnih kromosomov ne kažejo značilnosti X-vezanih ali Y-vezanih lastnosti.
- Pri človeku pride do rekombinacije na večji psevdoavtosomalni regiji, na manjši psevdoavtosomalni regiji rekombinacija ni vedno nujna.



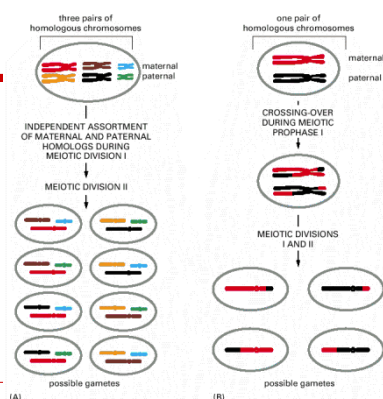
Rekombinacija mišjih kromosomov X Y



- Brez rekombinacije genetskega materiala bi bila vsebina vsakega kromosoma fiksna, spremembe bi bile možne le z mutacijami.
- Rekombinacija omogoča prestavljanje genov in njihovih mutacij – variabilnost kromosomov.
- Rekombinacija omogoča evolucijo organizmov.
- Naravna selekcija potem ohrani (izbere) tiste osebkke, ki so najbolj primerni za preživetje – imajo največ možnosti za ohranjanje določenega genotipa.
- Proces rekombinacije omogoča tudi reparacijo vrzeli v genetskem materialu.

332

Načini
rekombinacije
genetskega
materiala pri
evkariontih



Rekombinacija genetskega materiala pri bakterijah

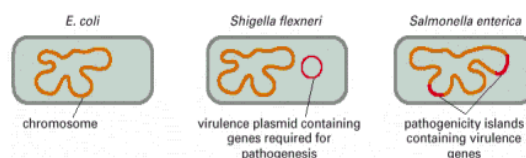
Transformacija
Transdukcija
Konjugacija
(S faktorjem F posredovana spolna transdukcija
"sexdukcija")

334

Genetski material prokariontov

- Kromosom (ima nekaj tisoč genov)
- Plazmid (ima 3 – nekaj 100 genov)
- Episom
- **Plazmid:** genetski material, ki se neodvisno replicira in prenaša se na potomstvo v ekstrakromosomski obliki. Večina plazmidov ni nujno potrebna za preživetje bakterij. Potrebni so le pri nekaterih posebnih pogojih okolja (prisotnost antibiotikov).
- **Episom:** genetski element, ki se obnaša kot avtonomna enota in se razmnožuje neodvisno od kromosoma bakterijskega gostitelja, lahko pa se tudi integrira z bakterijskim kromosomom in se z njim razmnožuje. Primer je bakteriofag lambda ali spolni faktor F v *E. coli*.
- Episomi so genetski elementi, ki se lahko replicirajo
 - kot integralni del kromosoma
 - ali kot avtonomni genetski element.
- Mnogi plazmidi tudi ustrezajo definiciji episoma.

335



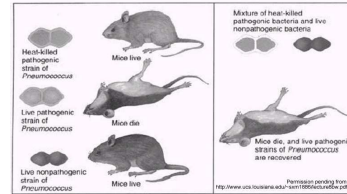
- Genetske razlike med patogenimi in nepatogenimi bakterijami. Nepatogena *E. coli* ima krožni kromosom. *E. coli* je sorodna s patogenimi bakterijama, ki sta pogosti v živilih. *Shigella flexneri* povzroča dizenterijo, *Salmonella enterica* je pogosta pri zastrupitvah s hrano. Genom *S. flexneri* se razlikuje od genoma *E. coli* le na nekaterih lokusih; večina genov, ki določa patogenost, je na plazmidu. Kromosom *S. enterica* ima dva večja inserta – determinante patogenosti, ki se ne nahajajo na kromosomu *E. coli*. V teh insertih so geni, ki določajo virulenco bakterije.

- Bakterije se delijo s preprosto delitvijo. So haploidne, diploidne so le pred delitvijo.
 - Ni procesa mitoze, ni procesa meioze.
- Tudi za prokariote je pomembna rekombinacija genetskega materiala.
- Tri osnovne oblike rekombinacije - prenosa genetskega materiala od ene bakterije na drugo:
 - **Transformacija**: sprejemnik (recipientna bakterija) prevzame golo DNA od donatorske bakterije.
 - **Transdukcija**: bakteriofag prenese bakterijske gene v recipientno bakterijo.
 - **Konjugacija**: DNA se od donatorske bakterije (moške celice) preko konjugacijske cevke prenese v recipientno bakterijo (žensko celico).

337

Transformacija

- *Streptococcus (Diplococcus) pneumoniae* (Griffith – poskus na miškah – 1928; Avery, MacLeod, McCarty – poskus na kolonijah na agar ploščah – 1944).



338

- Naravna transformacija pri bakterijah je aktiven proces, bakterijska celica potrebuje energijo za prevzem molekule DNA.
- Proces se odvija pri bakterijah, ki imajo potrebne encime in druge beljakovine za prevzem in rekombinacijo molekule DNA.
- Bakterijske celice morajo biti kompetentne za transformacijo – vsebovati morajo nek protein na površini celice, ki omogoča prevzem molekule DNA.
- Niso vse celice enako kompetentne ob vsakem času.
- Največ poskusov narejenih na *Streptococcus (D.) pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Hemophilus influenzae*.

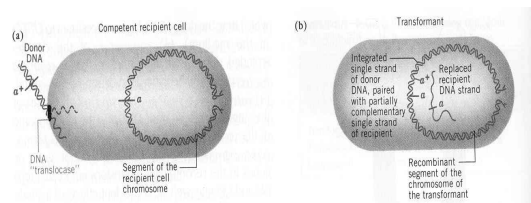
339

Stopnje transformacije (verjetno variirajo pri različnih vrstah)

- Reverzibilna vezava molekule DNA na receptorje na površini bakterijske celice.
- Prevzem molekule DNA.
- Pretvorba dvoverižne molekule DNA v enoverižno (eno verigo razgradijo encimi).
- Integracija cele ali dela donatorske molekule DNA v bakterijski kromosom.
- Izražanje donatorskega gena v rekombinantni (transformirani celici).
- Integracija donatorske molekule DNA v bakterijsko DNA je praviloma specifična za homologno molekulo DNA.
- Integracija nehomologne molekule DNA je možna, vendar v manjši meri.
- Integrirana donatorska molekula DNA je velika najmanj od 500 do 20 000 b(p).
- Samo nekatere prokariotske celice so sposobne prevzeti tujo DNA.

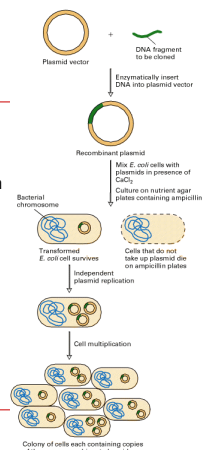
340

Transformacija pri streptokoku nastane heterodupleks (parjenje dveh ne-popolnoma enakih molekul DNA)



341

Splošni postopek za kloniranje delca DNA v plazmidni vektor. Celice bakterij so sposobne prevzeti po postopku pridobivanja kompetence s postopkom obdelovanja celic z visokimi koncentracijami CaCl_2 .



Transdukcija (Zinder in Lederberg, 1952)

- Bakteriofag prenese delček kromosoma od ene bakterije (donator) na drugo (recipient), kar omogoča rekombinacijo genomov dveh bakterij.
 - Generalizirana transdukcija – naključni delček genoma je prestavljen iz ene bakterije v drugo – prenos kateregakoli gena.
 - Specializirana transdukcija – bakteriofag prenaša le določene (specialne) gene bakterijskega kromosoma.

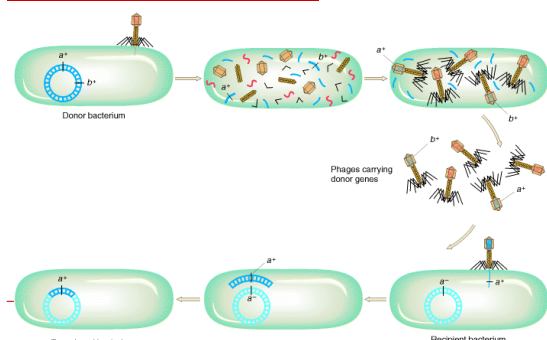
343

Bakteriofagi

- Virulentni fagi:
 - se vedno hitro pomnožijo in povzročijo lizo – razpad celice
- Zmerni ("temperate phage"):
 - se hitro pomnožijo in povzročijo lizo celice
 - ali se vgradijo v kromosom bakterije, se replicirajo in prenašajo na potomstvo, ob določenih pogojih se izrežejo iz kromosoma in se hitro pomnožijo ter povzročijo smrt bakterijske celice.

344

Mehanizem generalizirane transdukcije



347

Generalizirana transdukcija

- Naključni segment bakterijske molekule DNA se "pomotoma" zapakira v glavo faga (namesto fagne DNA) med dozorevanjem faga v bakterijski celici. Nastanejo generalizirani transducirajoči delci.
- Povzročijo jo nekateri virulentni bakteriofagi in zmerni fagi, pri katerih **ni specifične integracije fagnega gena v bakterijski kromosom**.
- Le nekateri virulentni fagi povzročajo transdukcijo (nekateri razgradijo bakterijski kromosom, nekateri ga sploh ne razgradijo in je prevelik za pakiranje v delce virusa, pri nekaterih je proces pakiranja zelo specifičen le za virusno DNA)
 - Fag P1 bakterije *E. coli*
 - Fag P22 bakterije *Salmonella*
 - Faga PBS1 in SP10 *Bacillus subtilis*

346

- Ko fag prenese delec gostiteljske molekule DNA v sprejemno celico, se ta lahko:
 - vgradi v bakterijski kromosom, se replicira in prenaša na potomstvo.
 - ostane prost v citoplazmi. Če se ne vgradi v kromosom, se ne replicira, se ne prenaša na vso potomstvo. Geni pa se lahko prepisujejo.
- Transducirajoči delci nastajajo le v majhnih frekvencah – 1 na 10^4 do 10^7 potomstva v lizatu vsebuje bakterijsko molekulo DNA.
- Pri generalizirani obliki transdukcije lahko pride do prenosa – transdukcije kateregakoli delca genoma.

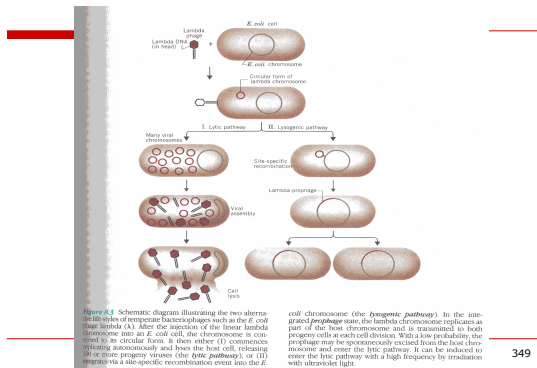
347

Specializirana transdukcija

- Poteka preko **zmernih bakteriofagov**, ki se lahko integrirajo na eno izmed nekaterih **specifičnih** pritrditvenih mest na bakterijski (gostiteljski) celici.
- Takšen virus se lahko replicira
 - v samostojni obliki v celici
 - integriran v bakterijski genom
- Zato ima lastnosti **episoma**.
- Rekombinacija virusne krožne molekule DNA z bakterijsko krožno molekulo DNA nastane na **specifičnih nukleotidnih zaporedjih obeh kromosomov** – "site specific recombination".

348

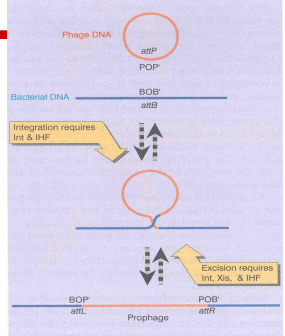
Življenski cikel faga lambda



349

- Integracija kromosoma faga λ v bakterijski genom
- in izrezovanje kromosoma faga λ iz bakterijskega genoma
- Oba procesa sta vezana na specifična nukleotidna zaporedja
- Dokler je kromosom faga λ v lizogeni obliki, je celica odporna na ponovno infekcijo z enakim fagom
- Zmerni fagi lahko spontano (1 na 10^5 delitev) ali inducirano prestopijo v litično stopnjo, takrat se avtonomno replicirajo.

Figure 14.19 Circular phage DNA is converted to an integrated prophage by a reciprocal recombination between *attP* and *attB*; the prophage is excised by reciprocal recombination between *attL* and *attR*.

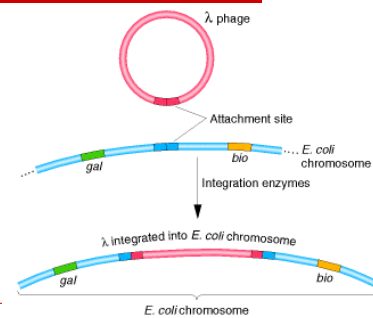


350

- Proces izrezovanja faga je običajno natančen, nadzorovan proces. Občasno pa pride do izrezovanja faga na nukleotidnih zaporedjih poleg pritrditvenega mesta – del bakterijskega kromosoma ostane v fagu, del fagnega kromosoma ostane v bakteriji. Takšne **naključne napake med procesom izrezovanja** profaga so odgovorne za nastanek **specializirane transdukcije**.
- Specializirana transdukcija zato zajema le bakterijske gene, ki ležijo blizu pritrditvenega mesta
 - fag λ – je vstavljen med gen za metabolizem galaktoze in gen za biotin;
 - fag $\phi 80$ je vstavljen blizu gena za triptofan
- Frekvenca transducirajočih delcev, ki nastanejo po indukciji lizogenih celic – 1 na 10^6 potomstva.

351

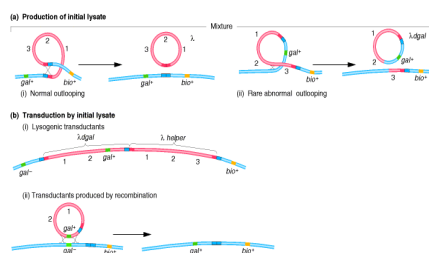
Campbellov model za integracijo faga λ v kromosom *E. coli*. Nastane specifična recipročna rekombinacija med pritrditvenim mestom na krožni DNA-molekuli faga λ in specifičnim območjem na kromosomu *E. coli* med genom za metabolizem galaktoze in genom za biotin.



352

Mehanizem specializirane transdukcije faga λ .

- (a) Lizogena bakterijska kultura lahko proizvede fiziološki fag λ , lahko pa nastane neobičajni delec – λ dgal ("λ-defektni gal")
- (b) Transdukcija z mešanim lizatom proizvede mešano populacijo bakterij z divjim in λ dgal genom.



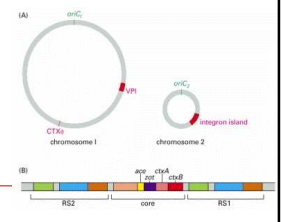
Genetska organiziranost bakterije *Vibrio cholerae*

A) *Vibrio cholerae* ima dva krožna kromosoma. Dva lokusa, ki determinirata patogenost, sta prisotna v patogeni obliki bakterije *V. cholerae* in odsotna v nepatogeni obliki. Verjetno so determinante patogenosti pridobljene le pred kratkim s horizontalnim prenosom genov - CTXφ na kromosomu 1 je integriran bakteriofag, ki nosi gene za toksin kolere.

Otok patogenosti VPI na kromosomu 1 vsebuje gene za dejavnike, ki so potrebni za naselitev črevesja. Otok *integron* na kromosomu 2 je struktura, ki omogoča postopno pridobivanje novih genov – vstavljanje novih delcev DNA nizdol (downstream) močnega transkripcijskega promotorja. Pri *V. cholerae* integron ni potreben za virulenco. Pri drugih bakterijah pa podobna zaporedja vsebujejo gene za virulenco in gene, ki so vključeni v rezistenco na antibiotike.

(B) Mapa lokusa CTXφ. Geni, ki kodirata dve podedeni toksina kolere, sta *ctxA* in *ctxB*. Tudi drugi geni (*ace* in *zot*) sodelujejo pri virulenci.

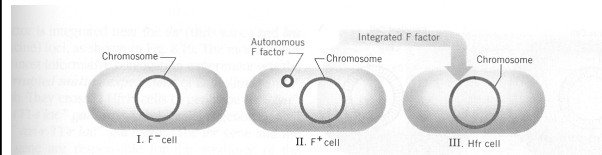
Obdajajoči zaporedji (ponovitve) RS2 in RS1 sta vključeni v insercijo genoma bakteriofaga v kromosom.



Konjugacija (1946 – Lederberg in Tatum)

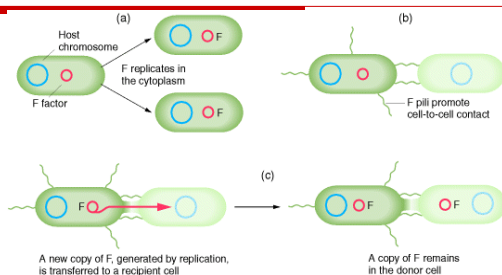
- Med konjugacijo se molekula DNA prenese iz donatorske celice (moške) v recipientno celico (žensko) preko konjugacijske cevke, ki se oblikuje med tema celicama.
- Donatorska celica – ima na površini celice posebne podaljške – **F-piluse**.
- Sinteza F-pilusov kontrolirajo geni na mali krožni molekuli DNA – **dejavnik F/F-faktor** (fertility factor; spolni faktor; F-plazmid).
- Dejavnik F je lahko samostojen v celici in se avtonomno replicira (celice F^+), ali pa je integriran v kromosom bakterije (**Hfr-celica** – **high frequency recombination**). Ima lastnosti episoma.
- Celice, ki imajo F-plazmid, sintetizirajo konjugacijsko cevko in prenesejo molekulo DNA v celico F^- .

355

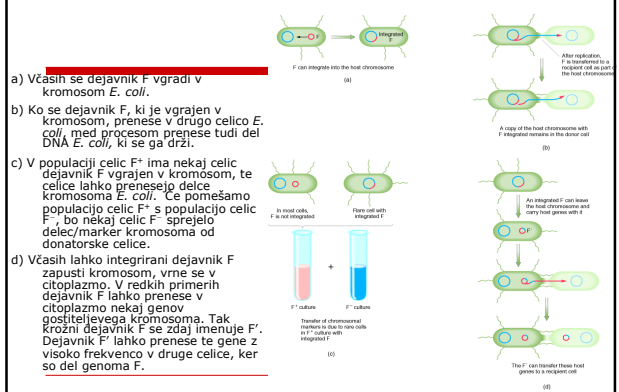


356

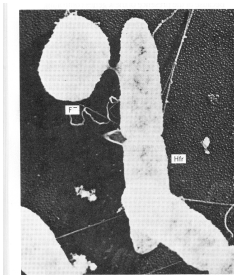
Lastnosti dejavnika F pri *E. coli*



Prenos kromosoma *E. coli* s posredovanjem dejavnika F



Celica *E. coli* med konjugacijo

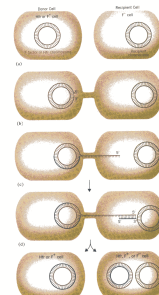


359

Mehanizem prenosa DNA pri konjugaciji

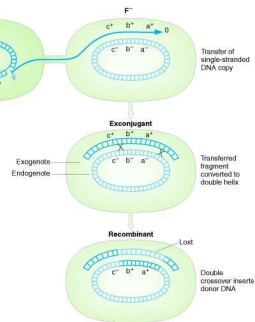
- enak pri celicah F^+ in pri celicah Hfr

- Encim endonukleaza zareže specifično mesto na molekuli DNA na dejavniku F.
- 5' konec molekule DNA se prenese skozi konjugacijsko cevko v recipientno bakterijo.
- Proces replikacije "rolling circle replication"



360

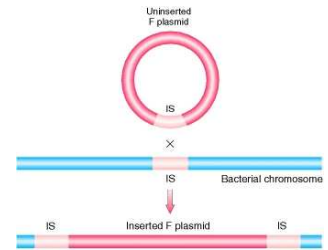
Prenos delca enoverižne molekule donatorskega kromosoma v F- celico. Rekombinacija z recipientnim kromosomom. Prekrižanja lahko nastanejo na različnih lokacijah. Replikacija se prične na začetku replikacije (o – origin), ta del enoverižne DNA se prvi prenese v recipientno celico, faktor F gre praviloma zadnji.



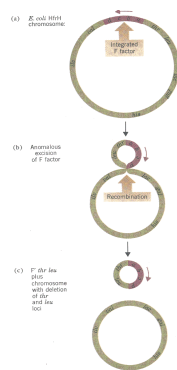
Integracija plazmida F

Včasih nosi plazmid F znotraj svojega genoma eno ali več insercijskih zaporedij (element IS). Element IS je mobilni delec DNA, ki se lahko premika iz enega mesta kromosoma na drugo mesto kromosoma, ali med različnimi kromosomi in plazmidi.

Značilni elementi IS na plazmidu F in na kromosomu omogočajo homologno prekrižanje in vgraditev/izrez plazmida.

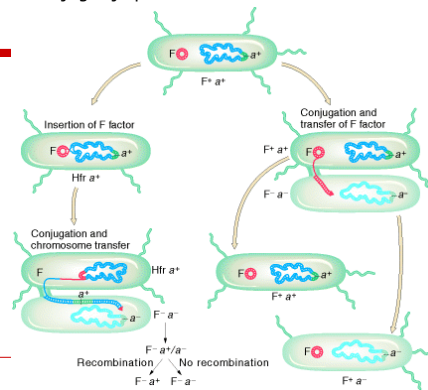


- Naključne napake pri izrezovanju F-faktorja – nastanek F'-faktorja ("sexdukcija")



363

Povzetek različnih dogodkov, ki se lahko zgodijo med procesom konjugacije pri *E. coli*.



- Kriteriji za določanje oblike prenosa genetskega materiala iz ene bakterijske celice v drugo:
 - **Transformacija:** ni potreben celični kontakt, proces je občutljiv na encim DNazo.
 - **Transdukcija:** ni potreben celični kontakt, proces ni občutljiv na DNazo.
 - **Konjugacija:** potreben je celični kontakt, proces ni občutljiv na DNazo.

365

Gensko kartiranje pri bakterijah

- Ocenjevanje razdalje med geni na osnovi procesov transdukcije in konjugacije.

366

Test prekinjenih parjenj *E. coli*

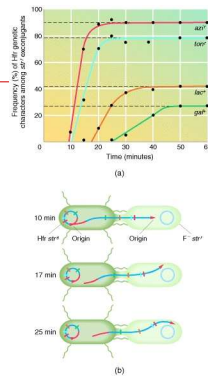
Celice F^- z genom str^r so križane s celicami Hfr, ki imajo gen str^s . Celice F^- imajo nekaj mutacij (genetski markerji azi , ton , lac , in gal), ki celicam onemogočajo izvedbo specifičnih metabolnih poti.

Celice Hfr so sposobne izvesti te metabolne poti. V različnih intervalih po pomešanju celic F^- in Hfr, prekinemo konjugacijo med njimi z mešanjem, odvezamo celice in jih nasadimo na gojišče s streptomycinom.

Antibiotik ubije celice Hfr, omogoča pa rast celic F^- , ki so prevzele različne gene of Hfr – odvisno od časa prekinitve konjugacije.

(a) Graf – frekvenca rekombinacij posameznih označevalcev, prikazana s funkcijo časa po parjenju. Prenos posameznih donorskih alelov za posamezno metabolno pot je odvisen od dolžine konjugacije.

(b) Shematski pregled prenosa označevalcev po določenem času.



E. L. Wollman, F. Jacob, and W. Hayes, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 21, 1956, 141.)

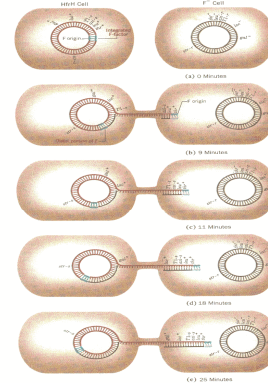
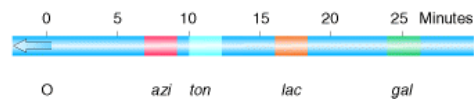


Figure 8.13 Interpretation of the interrupted mating data of Jacob and Wollman (Fig. 8.12) in terms of the linear transfer of the Hfr1 chromosomes to the F^- cells. The genetic markers carried by the Hfr1 strain are all dominant or codominant (both alleles expressed) to the alleles carried by the F^- strain. The times given in minutes since conjugation was initiated are drawn to scale distances between minutes.

Linearni prenos genov med prekinjenim procesom parjenja bakterij (Jakob in Wollman, 1961).

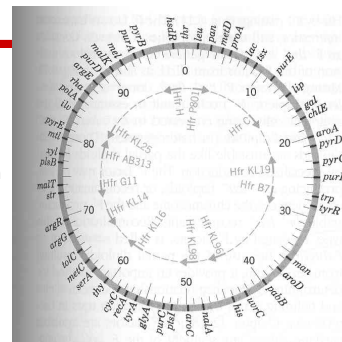
368



- Karta kromosoma, pripravljena na osnovi poskusa, prikazanega na prejšnjem diapozitivu.
- Prekinjeno parjenje celic *E. coli* – karta je pripravljena na osnovi časa, ko se je določen alel iz donatorske celice pojavil v celici, ki pred pajenjem tega alela ni imela. Enote za razdaljo so prikazane v minutah. Puščica kaže smer prenosa alelov iz donatorske celice.
 - azi^- – odpornost na natrijev azid;
 - ton^- – odpornost na bakteriofag T1;
 - lac^+ , gal^+ – sposoben uporabljati laktozo in galaktozo

Čas, potreben za konjugacijski prenos posameznih genov

- Mapa bakterije *E. coli*, seva K12, razdeljena na 100 minutnih intervalov
- Prikazana so mesta integracije F-faktorja

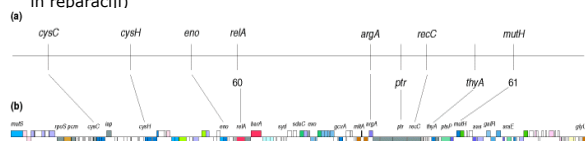


370

Primerjava genetske in fizične karte gena *E. coli*.

(a) Markerji na genetski mapi iz leta 1990 (60 – 61 minut).

(b) Natačni položaj vsakega gena na osnovi sekvenciranja nukleotidnih zaporedij DNA gena *E. coli*. (rdeče – regulatorna vloga; temno modro – delovanje pri replikaciji DNA, rekombinaciji in reparaciji)



371

Transpozicijski genetski elementi

- Barbara McClintock – 1940 – odkrila genetske elemente na kromosomih, ki lahko preskakujejo po ali med kromosomih.
- Nobelova nagrada za fiziologijo – 1983
- Proučevala različno obarvanost koruznih zrn.



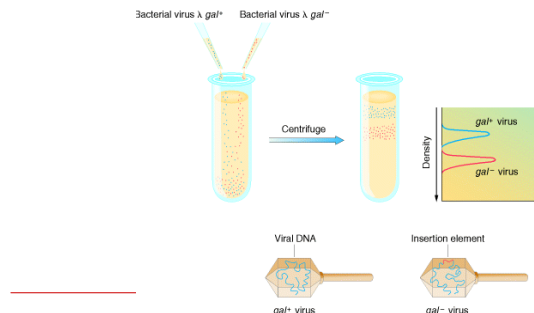
372

Transpozicija

- Prenos delca kromosoma iz enega položaja genoma na drug položaj.
- Prenese se del gena, en gen, skupek vezanih genov – genetski element.
- **transpozicijski genetski elementi** (kasete, skakajoči geni, potepuški geni, mobilni geni, mobilni genetski elementi, transpozoni)
 - odsek molekule DNA, ki se premika iz enega mesta v genomu na drugo mesto znotraj istega kromosoma ali med različnimi kromosomi
- ugotovljen pri fagih, bakterijah, glivah, rastlinah, virusih, insektih, sesalcih.

373

Insercija delca DNA med genom za metabolizem galaktoze – dokazovanje večjega delca virusne molekule DNA s centrifugiranjem v gradientu



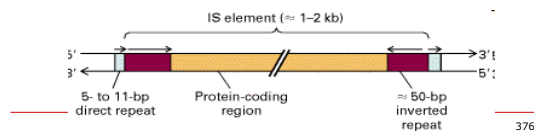
Transpozicijski elementi pri prokariotih

- Insercijska zaporedja
- Transpozoni

Insercijska zaporedja (Insertion sequences – IS)

Struktura IS-elementa:

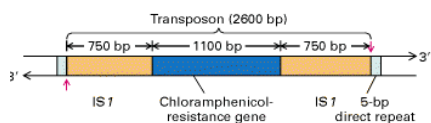
Na sredini IS je gen, ki kodira encim(e) za transpozicijo (gen za transpozazo), gen na vsaki strani omejuje obrnjeno zaporedje (inverted repeat), nato na vsaki strani sledi direktna ponovitev zaporedij. Puščice kažejo orientacijo nukleotidnih zaporedij.



376

Transpozoni (Tn)

So transpozicijski elementi, ki imajo poleg IS (genov za transpozicijo) tudi druge gene, običajno gene, ki prenašajo rezistenco na določene antibiotike. selektivna izbira Tn, ki nosi gen za rezistenco na antibiotik



377

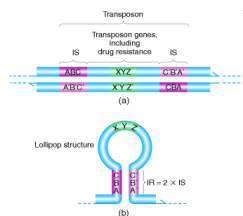
Različne oblike transpozonov



378

- Transpozon oblikuje značilno zanko – "lolipop"

- IR – inverted repeat – komplementarnost baz



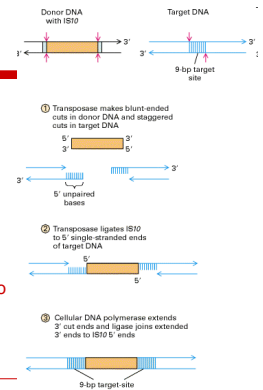
379

Model konzervativne transpozicije

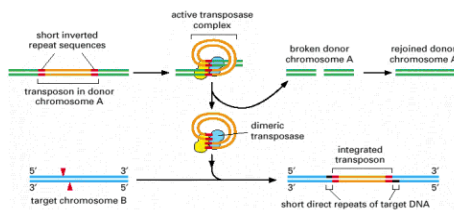
- Encim **transpozaza**, ki jo kodira IS, **zareže** obe strani donatorjeve DNA med terminalno direktno ponovitvijo zaporedij DNA in invertirno ponovitvijo zaporedij DNA.

- Transpozaza naredi **reze v sprejemni DNA**
- Transpozaza **katalizira tudi ligacijo** zarezanih strani DNA.

- Manjkajoča DNA je zapolnjena s polimerazo DNA.



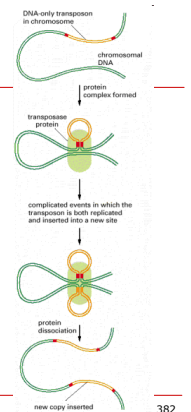
□



381

Model replikativne transpozicije

- Replikacija in insercija nove kopije genetskega elementa
 - transpozaza in resolvaza

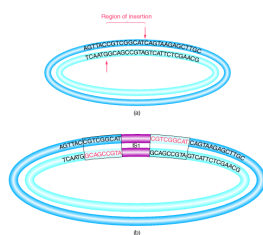


382

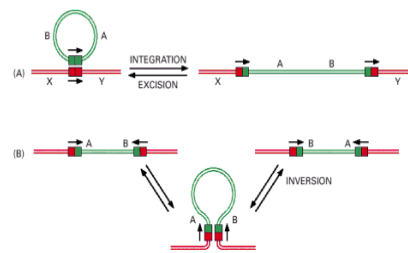
Posledice transpozicije

- na mestu integracije transpozicijskega elementa – formiranje ponovitev nukleotidnih zaporedij

- Mutacije
 - Delecije
 - Insercije
 - Inverzije

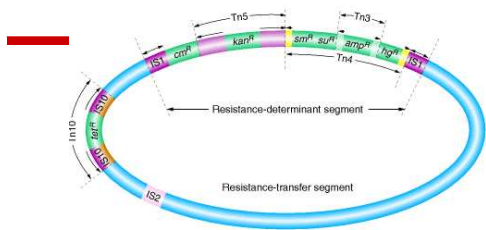


383



384

Plazmid z več geni za rezistenco na antibiotike



- Vloga transpozicijskih genetskih elementov v evoluciji plazmidov, ki nosijo rezistenco na antibiotike.

Transpozicijski elementi pri evkariontih

- Retrovirusi (RNA virusi)
- Retrotranspozoni – retropozoni
 - preko RNA posrednika – preko reverzne transkriptaze in encima integraze se prepisana DNA vgradi v genom gostitelja
 - Virusni retrotranspozoni
 - Nevirusni
 - LINE ("long interspersed elements")
 - SINE ("short interspersed elements")

- Kakšno evlucijsko vrednost ima mešanje genetskega materiala.
- Zakaj so bratje in sestre istih staršev različni. Navedite mehanizme.

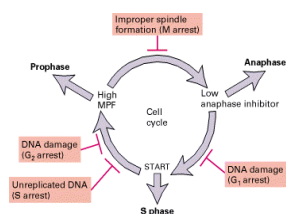
Kromosomske aberacije

- Nepravilnosti v številu kromosomov
- Nepravilnosti v strukturi kromosomov
- **Aberacija (SMS):** odklon od navadnega, značilnega ali normalnega (po obliki, zgradbi, legi, poteku, številu, stanju, funkciji, izvoru ali razvoju); sin. Aberratio
- Kromosomska aberacija – **mutacija**
 - anevploidije – odstopanja v številu posameznih kromosomov
 - Poliploidija – več setov kromosomov
 - strukturne aberacije – odstopanja v strukturi kromosomov

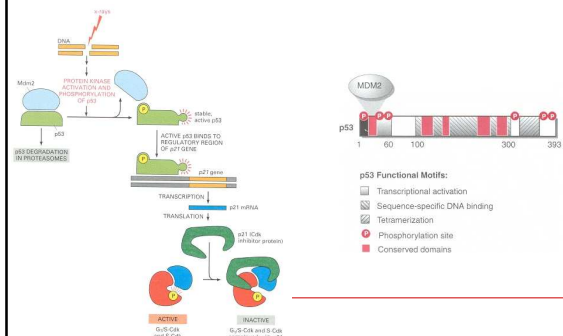
388

Štiri nadzorne točke celičnega ciklusa

- Nadzorne točke, kjer lahko pride do zaustavitve celičnega ciklusa.
- Okvare v DNA zaradi iradiacije ali kemične modifikacije preprečujejo celicam v stopnji G1 nadaljevanje v stopnjo S in celicam v G2 nadaljevanje v stopnjo M (protein p53).
 - Nepodvojena DNA ne vstopi v mitozo.
 - Okvare v oblikovanju delitvenega vretena ali pritrditve kinetohor na delitveno vreteno preprečuje vstopanje v anafazo.

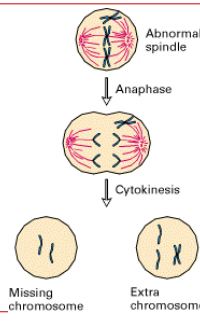


Protein p53 – v celicah v nizkih koncentracijah, ob poškodbi DNA se koncentracija poviša, mutacija P53 – ni nadzora DNA - značilno za mnoge oblike tumorjev

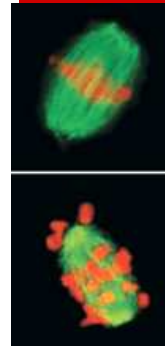


Napake v celičnem ciklusu

- Nondisjunction – nerazdelitev kromosoma – nastopi, če kromosomi stopijo v anafazo, preden se kinetohore obeh sestrskih kromatid pripenjo na mikrotubule delitvenega vretena.
- Zakasneli kromosom med anafazo - kromosom ne prispe pravočasno do pola celice, zato se ne vključi v hčerinsko celico.
- Zato ena hčerinska celica vsebuje dve kopiji enega kromosoma, druga hčerinska celica pa tega kromosoma nima, med procesom zakasnele anafaze se lahko posamezni kromosom izgubi.



Prileganje kromosomov pred delitvijo celice Obdelovanje celic s BPA



• Zgornja slika prikazuje normalno metafazo celice. Kromosomi (obarvano rdeče) so pravilno razporejeni.

• Spodnja fotografija prikazuje prileganje kromosomov v celici, ki je bila obdelovana z bisfenolom A. Kromosomi so razmetani po celici. Ko se delitev celice zaključi, je velika verjetnost, da bodo kromosomi nepravilno razporejeni v posamezni hčerinski celici – posledica je lahko aneuploidija.

• Hunt et al. 2003

• TD1 (tolerable daily intake) 0,05 mg/ kg telesne teže

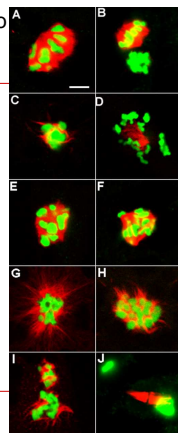
Vpliv mikotoksinov na delitveno vreteno *in vitro*

Malekinejad H et al., Biol Reprod 2007;77:840-847

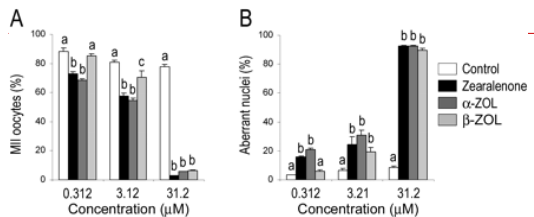
Morfologija delitvenega vretena v meiozi po izpostavljenosti oocitov prašičev mikotoksinom.

- Oociti so zoreli 30 (A, C, E, G, I) ali 40 (B, D, F, H, J) ur:
- s kontrolnim medijem (A, B)
- z estradiolom (C, D),
- zearelenom - ZEA (E, F),
- deoksinivalenol DON (G, H), vsi konc. 3,12 $\mu\text{mol/L}$,
- ali kombinacija ZEA in DON (1.56 $\mu\text{mol/L}$ vsak).

DNA (zeleno) in mikrotubuli (rdeče) - CLSM.



Vpliv mikotoksinov na delitveno vreteno – *in vitro*



Grafi prikazujejo zorenje in aberacije delitvenega vretena po obdelovanju z zearelenonom in metaboliti. Oociti so 44 ur zoreli v prisotnosti ZEA, α -ZOL, in β -ZOL pri prikazanih koncentracijah (v $\mu\text{mol/L}$).

Ocenjen je bil delež oocitov z delitvenim vretenom v stopnji MII (A)

ali nepravilno jedro celice (B).

Stolpci predstavljajo povprečje $\pm$ SEM

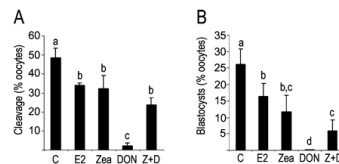
Vpliv mikotoksinov na delitveno vreteno

- Graf prikazuje sposobnost razvoja oocitov po izpostavljenosti mikotoksinom.

- Oociti so 40 ur zoreli v prisotnosti navedenih sestavin, bili izpostavljeni fertilizaciji in gojeni v gojišču.

- Po 2 dnevih je bil ocenjen delež brazdanih oocitov (A)
- Delež blastocist je bil ocenjen po 6 dnevih (B).

Stolpci predstavljajo povprečje $\pm$ SEM



Kromosomske aberacije - nastanejo zaradi napak med mitozo, meiozo, med fertilizacijo

- Odstopanja v številu kromosomov (pojavlja se v 5% meiozi)

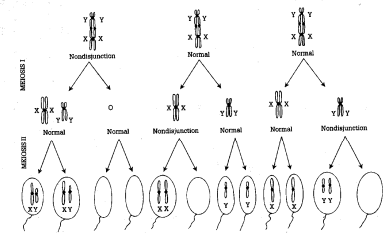


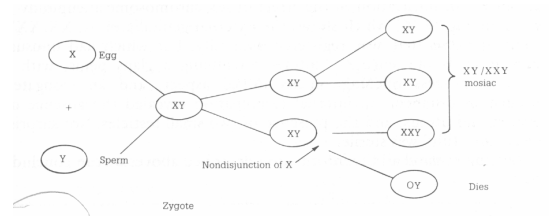
Fig. 4.14. Nondisjunction of sex chromosomes in an XY male. 'Normal' refers to normal disjunction, as illustrated in more detail in Fig. 1.3.

Primeri zigot, ki lahko teoretično nastanejo iz aneuploidnih spolnih celic

		SPERM						
		Normal		Abnormal				
		X	Y	XY	XX	YY	O	
EGGS	Normal	X	XX	XY	XXY	XXX	XXY	XO
	Abnormal	XX	XXX	XXY	XXXY	XXXX	XXYY	XX
	O	XO	YO	XY	XX	YYO	O	

397

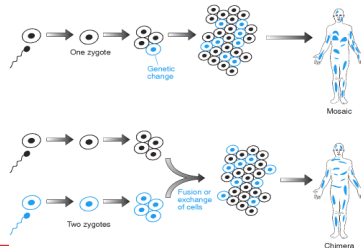
Oblikovanje osebkov s celicami z različnimi kariotipi



398

Mikroploidije: mozaični organizmi in himere

- Mutacija v vseh celicah organizma – konstitucionalna mutacija
- Sprememba v nekaterih celicah organizma – **mozaik**
- Združitev celic različnih linij v en organizem – **himera**

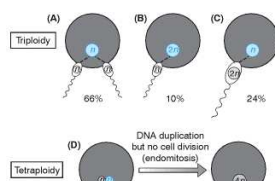


400

- **Mozaicizem** – prisotnost dveh ali več celičnih tipov, ki se razlikujejo v kariotipu, pri istem osebk. **Kromosomski mozaicizem** – pri katerem zaradi napake med mitozo nastanejo celice s spremenjenim številom kromosomov, ki so mozaično razvrščene med normalnimi celicami.
- Kariotip XY/XXY ali XXY/XXYY – je posledica nepopolnega ločevanja kromosomov med mitozo v zgodnjem embrionalnem razvoju.
- Aneuploidije spolnih kromosomov so praviloma povezane z motnjami v spolnem razvoju osebk.

Izvor triploidije ali tetraploidije

- **A)** Fertilizacija haploidnega jajčeca z dvema haploidnima spermijema istočasno (pri ljudeh najpogostejša oblika).
- **B)** Lahko je vzrok fertilizacija haploidnega spermija z diploidnim jajčecem ali **C)** haploidnega jajčeca z diploidnim spermijem. Večina triploidnih zarodkov spontano abortira, redko preživijo, vendar le do rojstva.
- **D)** Tetraploidija nastane zaradi napake v prvi mitotski delitvi po fertilizaciji, zarodek pri ljudeh se ne razvije.
- Konstitucionalna poliploidija je redka, nekatere celice v organizmu pa so lahko poliploidne.



Poliploidije pri ljudeh		
Triploidije	(69,XXX, XXY ali XYY)	1-3% vseh spočetih zigot pri človeku, večinoma ne preživijo do rojstva, niso vitalni
Aneuploidije pri ljudeh		
Avtosomi	nulisomija (manjka par homolognih kromosomov)	Letalno pred implantacijo
	monosomija (manjka en kromosom)	Letalno med embrionalnim razvojem
	trisomija (en dodatni kromosom)	Običajno letalno med embrionalnim ali fetalnim razvojem
Spolni kromosomi		trisomija 13 (Patau sindrom) in trisomija 18 (Edwardov sindrom) lahko preživijo do rojstva
		Trisomija 21 (Downov sindrom) lahko preživijo do 40 ali več let
	XXX, XXY, XYY	Relativno manjši problemi, normalna življenska doba
	45,X	Turnerjev sindrom - v 99% spontani abortus, preživeli so infertilni, kažejo manjše fiziološke značilnosti

Odsotnost kromosoma X – XO

- Oblika monosomije.
- Nastane zaradi nepravilnega ločevanja kromosomov med mejozo.
- Pojav se pojavlja pri mnogih živalskih vrstah in pri človeku (Turnerjev sindrom).
- Fenotip - nižje rasti, nerazviti ovariji, nerazvit uterus, okvare kardiovaskularnega sistema.
- Običajno nefertilne samice.

403

Turnerjev sindrom (XO)

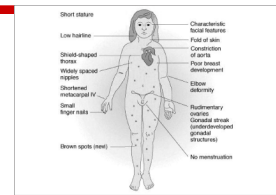
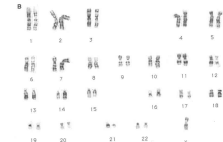


Figure 2. Clinical-phenotypic findings in Turner.¹¹



404

Trije kromosomi X – XXX

- Oblika trisomije.
- Vidni sta dve Barr-ovi telesci – le en kromosom je aktiven.
- Nastane zaradi nepravilnega ločevanja kromosomov med mejozo.
- Redek primer pri ljudeh.
- Relativno normalen fenotip, lahko fertilne samice.

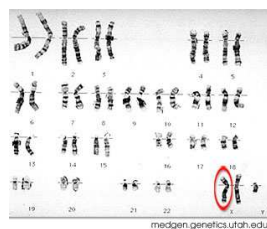
405

Kromosomi XXY

- Kromosom Y pri sesalcih definira moški spol.
- Običajno sterilni samci.
- Pri človeku (Klinefelterjev sindrom): moški, razvita prsa, mali testisi, slaba odlakanost, mentalna zaostalost.
- Enak sindrom je poznan pri mačkah, miših ...
- Več je kromosomov X pri moških, hujša je telesna in mentalna zaostalost.

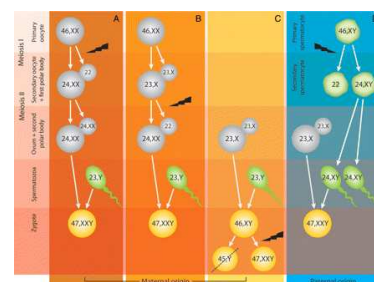
406

Klinefelter-jev sindrom (XXY, XXXY, XXXYY, XXXXXY,...)



407

Različni vzroki nerazdvajanja spolnih kromosomov – nastanek KS: pri meiozi I matere (A), meiozi II pri materi (B), med prvo delitvijo zigote (C), med mejozo I pri očetu (D).



Kariotip osebe z Down-ovim sindromom

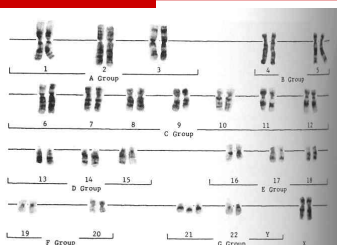


Figure 19.3 Karyotype of a child with Down syndrome, showing trisomy for chromosome 21 (47,XX,+21). (Courtesy of R. M. Fineman.)

409

Nekatere aneuploidije pri ljudeh

TABLE 19.1 Aneuploidy Resulting from Nondisjunction in the Human Population

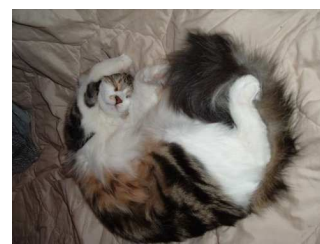
CHROMOSOME NOMENCLATURE	CHROMOSOME FORMULA	CLINICAL SYNDROME	ESTIMATED FREQUENCY AT BIRTH	MAIN PHENOTYPIC CHARACTERISTICS
47,+21	2n + 1	Down	1/700	Short broad hands with simian-type palmar crease, short stature, hyperflexibility of joints, mental retardation, broad head with round face, open mouth with large tongue, epicanthal fold.
47,+13	2n + 1	Trisomy 13	1/5000	Mental deficiency and deafness, minor muscle seizures, cleft lip and/or palate, polydactyly, cardiac anomalies, posterior beel prominence.
47,+18	2n + 1	Trisomy 18	1/6000	Multiple congenital malformation of many organs; low-set, malformed ears, receding mandible, small mouth and nose with general elfin appearance; mental deficiency; horseshoe or double kidney; short sternum. 90% die in the first 6 months.
45,X	2n - 1	Turner	1/500 female births	Female with retarded sexual development, usually sterile, short stature, webbing of skin in neck region, cardiovascular abnormalities, hearing impairment.
47,XXY 48,XXYY 49,XXYY 50,XXXXYY 51,XXXXYY	2n + 1 2n + 2 2n + 2 2n + 3 2n + 4	Klinefelter	1/500 male births	Male, subfertile with small testes, developed breasts, feminine pitched voice, long limbs, knock knees, rambunctious tallness.
47,XXX	2n + 1	Triple X	1/700	Female with usually normal genitalia and limited fertility. Slight mental retardation.

Kromosomske aberacije v številu kromosomov pri živalih

Aneuploidije

411

Pippin (XXY)



Najpogostejša monosomija pri konju
63, XO
5 letna kobila, toplokrvna, neplodna kobila, nižje rasti



413

Trisomija pri konju
65, XXY
sterilni žrebec, dodatni X kromosom povzroča motnje pri razvoju gonad, v testisih ni proizvodnje spermijev



414

Aneuploidije avtosomov

telica – trisomija kromosoma 24 (61, XX, +24); prognatija spodnje čeljusti (štrleča čeljust), nepravilno razvite genitalije, srčne napake, slaba rast
(prognatija -e ž nenormalno navzpred štrleč ena ali obe čeljusti)



415

- Trisomija kromosoma 18 pri govedu (61, +18); letalna brahignatija (kratka spodnja čeljust) – teleta poginejo kmalu po rojstvu.
- Pri vseh ugotovljenih avtosomalnih trisomijah pri živalih je bila ugotovljena trisomija malih kromosomov.
- Avtosomalna monosomija ni bila ugotovljena pri živih živalih.
- Triploidni piščanci – linija piščancev v Avstraliji, kjer ima potomstvo v ca 12-odstotkih triploidni status. Vendar tudi te živali ne doživijo polne življenske dobe.

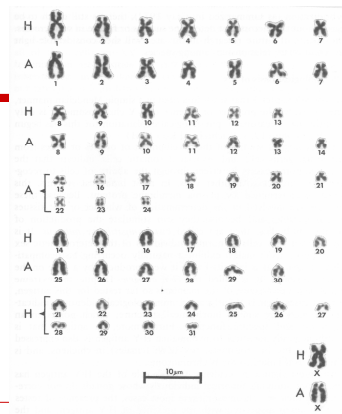
416

Trisomija majhnega akrocentričnega kromosoma 5 letna toplokrvna kobila, plodnostne motnje, mali uterus, funkcionalni ovariji, slaba rast, šepavost



417

Medvrstna hibridizacija - kariotip mule



(An updated catalogue is accessible via World Wide Web on the Internet at: <http://morgan.angis.su.oz.au/>)

Aneuploidy of sex chromosomes

XO buffalo, cat, dog, pig, horse, sheep
XXX cattle, dog, horse, buffalo
XXY cat, cattle, dog, pig, sheep
XXXY horse, pig
XXXXY horse

Aneuploidy of autosomes

trisomy 12, trisomy 16, trisomy 17, trisomy 18, trisomy 20, trisomy 22, trisomy 23, trisomy 24 cattle

419

trisomy 23, trisomy 26, trisomy 28, trisomy 30	horse
Phallo	chicken
triploidy	chicken
Translocation, reciprocal	cattle
18/9, 8/13, 8/15, 10/11, 20/24, Y/17	chicken
1/4, 2/1, Z-metochromosome	horse
1/5	pig
1/6, 1/7, 1/8, 1/11, 1/14, 1/15, 1/16, 1/17, 2/4, 2/4/15, 2/4, 3/7, 4/13, 4/14, 5/8, 5/14, 5/15, 6/14, 6/15, 7/11, 7/12, 7/13, 7/17, 8/14, 9/11, 11/15, 12/14, 13/17, 14/15, 15/16, 16/17, 20/23, 20/24	sheep
Translocation, tandem	cattle
1/16, 1/18, X/23	horse
8/15	blue fox
Translocation, centric fusions	cattle
23/24	cat
1/4, 1/21, 1/23, 1/26, 1/28, 1/29, 2/4, 3/27, 4/4, 4/8, 5/18, 5/23, 5/26, 6/28, 7/12, 7/21, 8/9, 9/23, 11/21, 11/22, 13/21, 14/20, 14/21, 14/26, 15/24, 16/18, 17/27, 27/29	dog
6/15	goat
1/26, 6/26, 7/25, 8/11	pig
13/17	
Centric fusion	donkey
3	
Deletion	horse
X	cattle
Insertion	cat
16	
Inversion, paracentric	pig
8	
Inversion, pericentric	cattle
14, X	chicken
2	
bochromosome	cattle
Y	
Sex reversal	dog, goat, horse, llama, pig
XX male	cat, cattle, horse, sheep
XY female	

420

Primeri aneuploidije spolnih kromosomov pri različnih živalskih vrstah

hipoplazija - e ž: nezadostna celična in volumenska razvitost kateregakoli organa ali tkiva;
sin. hypoplasia; prim. agenezija, atrofija: ~ emalja, ~ pljuč;
~ jajčnika zmanjšan volumen jajčnika, normalno v meni;
sin. hypoplasia ovarii

Table 4.4. Examples of sex chromosome aneuploidy in domestic animals (From Gustavson 1980b, who provides a reference for each example given)

Sex chromosomes	Species	Main phenotypic effects
XO	Pig	Intersexuality, ovarian hypoplasia
	Horse	Ovarian hypoplasia (died before puberty)
XO/XX	Cat	Ovarian hypoplasia
XO/XX/XY	Pig	Intersexuality
XXX	Cattle	No effects, ovarian hypoplasia
	Horse	Infertility
XXY	Cattle	Testicular hypoplasia
	Sheep	Testicular hypoplasia
	Pig	Testicular hypoplasia
	Dog	Testicular hypoplasia
	Cat	Testicular hypoplasia
XXY/XY	Cattle	Testicular hypoplasia
XXY/XX	Cattle	Intersexuality
	Pig	Intersexuality
	Cat	Testicular hypoplasia
XXY/XX/XY	Cattle	Testicular hypoplasia
XXY/XY/XO	Cattle	Testicular hypoplasia
XXY/XY/XX/XO	Horse	Cryptorchidism
XXX	Horse	Intersexuality
XXX/XXY	Pig	(No information)
XXY/XY	Cattle	No effects

Poliploidija pri ribah (več setov kromosomov)

- Pri nekaterih vrstah rib kratkotrajna izpostavljenost jajčnih celic povišani ali znižani temperaturi prepreči mejozo II, jajčne celice ostanejo v diploidnem stanju.
- Po fertilizaciji s haploidnim spermijem pride do triploidije.
- Triploidne ribe so sterilne.
- So pa zelo vitalne in hitreje rastejo (boljši prirast – ekonomsko bolj zanimive).

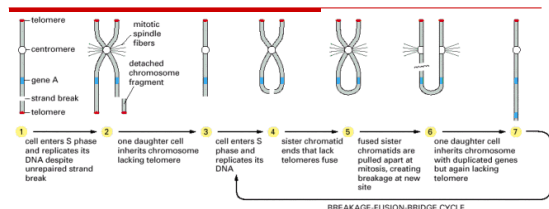
422

Kromosomske aberacije v strukturi kromosomov

423

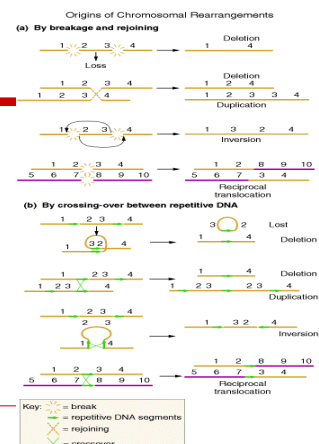
Vzroki

- Večina kromosomskih aberacij nastane zaradi:
 - napak pri prelomih kromosomov (žarčenje, kemikalije) in napačnih popravilnih mehanizmi
 - napak pri rekombinaciji
 - napak pri ločevanju kromosomov med mitozo ali mejozo.
- Uravnotežene kromosomske aberacije – ni izgube ali pridobitve kromosomskega materiala.
- Neuravnotežene kromosomske aberacije - izguba ali pridobitev kromosomskega materiala.



- Replikacija okvarjene molekule DNA lahko pelje do kromosomske aberacije – amplifikacije gena in izgube gena. Shema prikazuje nekaj možnih mehanizmov. Proces se začne z naključno okvaro molekule DNA v celici, kjer protein p53 ni funkcionalen – celica stopi v stopnjo S.

Oblike kromosomskih reorganizacij



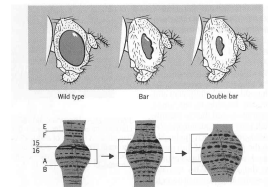
Delecije

- Kromosom, prelomljen na enem mestu – terminalna delecija
- Kromosom, prelomljen na dveh mestih – interkalarna (vmesna) delecija
 - Odlomljeni del kromosoma je med mitozo izgubljen, če se v celici ne pripne na kromosom s centromero.
 - Delecija v somatski celici – delecijo dedujejo le celice, ki so se iz te celice razvile
 - Delecija v zarodni celici – vse celice, ki zrastejo iz te celice, dedujejo delecijo.
 - Pojav psevdodominance – dominantni gen je izgubljen z delecijo, fenotip je odvisen od recesivnega gena.

427

Duplikacije

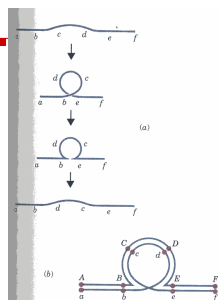
- Dodajanje delcev kromosoma:
 - Nekatere duplikacije se obnašajo kot dominantne ali recesivne, nekatere imajo kumulativni učinek



428

Inverzija

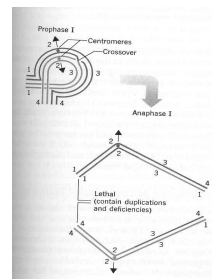
- Geni so postavljeni v obrnjenem redu. Del kromosoma
 - se odlomi,
 - obrne se za 180°
 - in se ponovno zlepi v kromosom.
- Prelomi se pojavljajo ob zankanju molekule DNA.
- Vendar zaradi zankanja obstaja mehanizem za prileganje komplementarnih delov DNA – kljub inverziji.



429

Posledice inverzije med meozo in rekombinacijo (crossover)

- Pride do duplikacij in delecij po rekombinaciji genetskega materiala



430

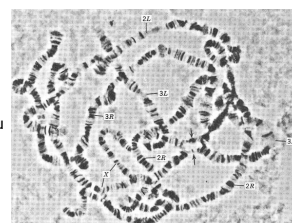
Inverzije in delecije

- Prelom kromosoma na dveh mestih.
 - **Inverzija** – prerazporeditev genetskega materiala – običajno normalni fenotip, aberacija je praviloma spregledana tudi pri kariotipizaciji.
 - **Delecija** – izguba genetskega materiala – običajno povzročajo hude anomalije.
- So le redko ugotovljene pri domačih živalih.

431

Translokacije

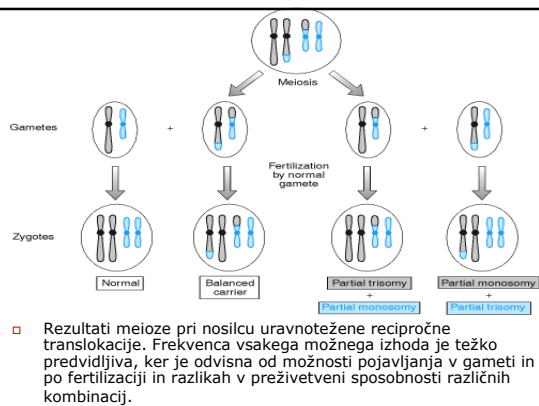
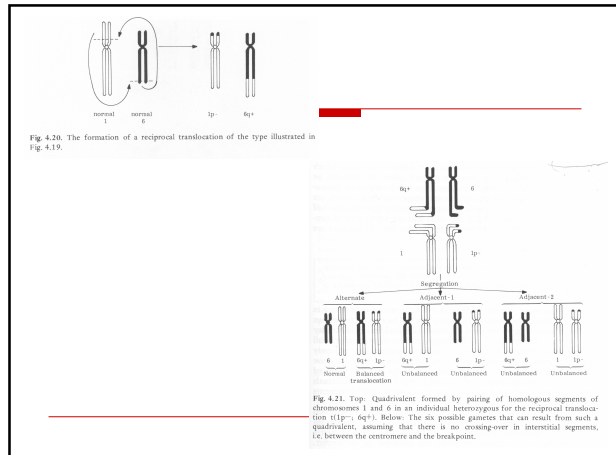
- Del kromosoma se odlomi in se prilepi na nehomologni kromosom.
- Pogosto med spolnimi kromosomi
- Pogosto pri rastlinah – prispeva k evolucijskemu razvoju.



432

- **Recipročna translokacija:** oblika kromosomske prerazporeditve, ki vsebuje zamenjavo delov kromosomov med dvema kromosomoma, ki ne pripadata paru homolognih kromosomov.
- Mnogo različnih recipročnih translokacij so ugotovili pri domačih živalih.
- Specifična recipročna translokacija
 - prelom kromosoma 11, prelom kromosoma 15
 - zamenjava kromosomskega materiala med kromosomom 11 in 15.

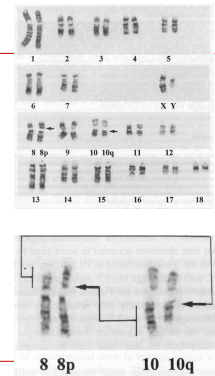
433



435

Recipročna translokacija pri domačih prašičih

- Pri domačih prašičih je od kromosomskih aberacij najbolj pogosta (poznana) recipročna translokacija.
- Kariotipizacija je bila opravljena pri teh prašičih zaradi slabega razploda (1 – 6 pujskov/na gnezdo).
- Pri osebkih s translokacijo avtosomov je bila velikost gnezda 30 – 50-odstotkov manjša. Če je prišlo do translokacije med avtosomi in spolnimi kromosomi, je bila pogosta sterilnost.
- Translokacije so ugotavljali večinoma pri merjäsčih – bolj intenzivna raba za reprodukcijo, zato so napake v plodnosti hitreje opazne.

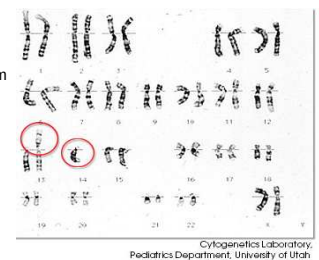


- Živali z recipročno translokacijo:
 - Lahko imajo normalni fenotip – genetski material je količinsko enak, vendar je prerazporejen med kromosomi,
 - vendar imajo signifikantno zmanjšano reprodukcijo. **Neuravnotežen genetski material med meozo I** – nekatere gamete imajo preveč ali premalo kromosomskega materiala. Po oploditvi ima zigota neuravnotežen genetski material – pezigodnje odmiranje ploda.
 - Recipročna translokacija se deduje – prenaša se na potomce.
 - Če pride do oploditve med dvema gametama z enako translokacijo – normalni fenotip z normalno fertiliteto.

437

Centralna fuzija – dva akrocentrična kromosoma se združita v en metacentrični kromosom Robertsonova translokacija kromosoma

- Osebkimajo en kromosom manj, vendar imajo ves genetski material dveh kromosomov združen v enem kromosomu. Fenotip je normalen.

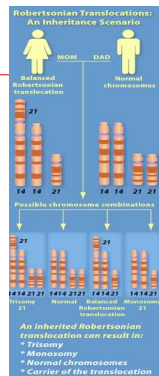


438

Usoda spojenega kromosoma po meiozi in fertilizaciji

■ Potomstvo osebkov z Robertsonovo translokacijo je lahko:

- normalno
- s spojenim kromosomom (enak kot starši)
- brez enega kromosoma (monosomija)
- z dodatnim kromosomom (trisomija)
 - monosomija in trisomija - zgodnje embrionalno odmiranje pri govedu.



439

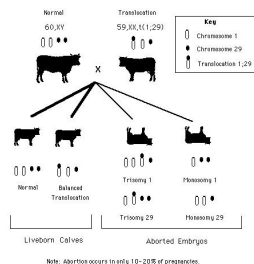
Robertsonova translokacija kromosoma

- Različna usoda zarodnih celic z neuravnovešeno Robertsonovo translokacijo (heterozigotno) pri ovnih in pri bikih.
- Pri govedu je verjetno ekonomsko upravičeno s selekcijo izločati nosilce Robertsonove translokacije kromosomov 1/29.
- t(1;29) se pojavlja pri večini evropskih pasem govedi.
- T(14;20) redko pri pasmi simental.
 - Pri ovnih – spermatoцитi z neuravnovešeno translokacijo ne preživijo – ca 5% manjša proizvodnja spermijev – **plodnost izgleda normalna**.

440

Robertsonova translokacija kromosoma

- Pri bikih – spermiji z neuravnovešeno translokacijo preživijo – so sposobni fertilizacije – vendar plod (s trisomijo ali monosomijo) ne preživi – **slabša reprodukcijska sposobnost**.



Učinek položaja (position effect)

- Kadar količina genetskega materiala ni spremenjena, spremenjen je le položaj gena – govorimo o učinku položaja.
 - Delovanje gena je oslabiljeno, kadar je prestavljen v območje heterokromatina.
- Kromosomske aberacije pomembno prispevajo k razvoju vrst in genski izolaciji vrst.

442

Izokromosomi

- Kromosom z genetsko in morfološko enakimi rokami.
 - posledica nepravilne cepitve kromosoma v med meiozo. Namesto longitudinalne cepitve pride do transverzne cepitve centromere.
 - posledica podvojitve ene roke kromosoma
- Le redko ugotovljena aberacija pri domačih živalih.

443

XX-samci, XY-samice

- Molekularne raziskave so v primeru fenotipskega XX-samca pokazale insercijo delca kromosoma Y, ki vsebuje gen *SRY*
- XY-samice:
 - Delecija kromosoma Y (gena *SRY*) ali
 - Mutacija gena *SRY* na kromosomu Y ali
 - Pomanjkanje receptorja za moške spolne hormone (gen za receptor za androgen na kromosomu X – gen *AR*).

444

Ugotovljene kromosomske aberacije pri zgodnjih spontanah abortusih pri ljudeh

Anomalija	frekvenca
triploidija	10%
tetraploidija	5%
trisomija	30%
Turnerjev sindrom (45 X)	10%
drugo	5%
Skupno	60%

445

trisomy 23, trisomy 26, trisomy 28, trisomy 30	horse
Polyploidy	chicken
Translocation, reciprocal	cattle
1/89, 8/13, 8/15, 10/11, 20/24, Y/17	chicken
1/4, Z/1, Z/microchromosome	horse
1/5	pig
1/6, 1/7, 1/8, 1/11, 1/14, 1/15, 1/16, 1/17, 2/4, 2/4/15, 2/14, 3/7, 4/13, 4/14, 5/8, 5/14, 5/15, 6/14, 6/15, 7/11, 7/12, 7/13, 7/17, 8/14, 9/11, 11/15, 13/14, 13/17, 14/15, 15/16, 16/17, X/13, X/14	sheep
1/20, 15/24, 23/24	cattle
Translocation, tandem	horse
1/16, 1/18, X/23	blue fox
X/15	cattle
Translocation, centric fusions	
23/24	dog
1/4, 1/21, 1/23, 1/26, 1/28, 1/29, 2/4, 3/27, 4/4, 4/8, 5/18, 5/23, 5/26, 6/28, 7/12, 7/21, 8/9, 9/23, 11/21, 11/22, 13/21, 14/20, 14/21, 14/28, 14/29, 16/18, 21/27, 22/29	goat
1/31, 13/23, 21/33	sheep
6/13	pig
1/20, 6/26, 7/25, 8/11	donkey
13/17	
Centric fusion	
3	horse
Deletion	
X	cattle
Insertion	
16	pig
Inversion, paracentric	cattle
8	chicken
Inversion, pericentric	
14, X	cattle
2	chicken
Isochromosome	
Y	cattle
Sex reversal	
XX male	dog, goat, horse, llama, pig
XY female	cat, cattle, horse, sheep

446

Evolucija kariotipov

- Centralno spajanje akrocetričnih kromosomov
 - Koza *Capra hircus* ($2n = 60$)
 - Ovca *Ovis aries* ($2n = 54$)
 - Konj Przewalski – *Equus przewalskii* ($2n = 66$)
 - Konj *Equus caballus* ($2n = 64$)
- Kromosom X je visoko ohranjen skozi evolucijo – spolno vezane lastnosti so podobne pri različnih živalskih vrstah.

447

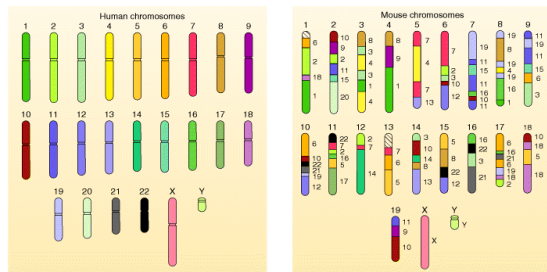
Kariotipi nekaterih domačih živali

Table 4.1. A summary description of the karyotypes of eight common domestic mammals

Species	Diploid number ($2n =$)	Autosomal pairs		Sex chromosomes	
		Metacentrics	Acrocentrics or telocentrics	X	Y
Cat, <i>Felis catus</i>	38	16	2	M	M
Dog, <i>Canis familiaris</i>	78	0	38	M	A
Pig, <i>Sus scrofa</i>	38	12	6	M	M
Goat, <i>Capra hircus</i>	60	0	29	A	M
Sheep, <i>Ovis aries</i>	54	3	23	A	M
Cattle, <i>Bos taurus</i>	60	0	29	M	M
Horse, <i>Equus caballus</i>	64	13	18	M	A
Donkey, <i>Equus asinus</i>	62	24	6	M	A

After Ohno (1968) and Eldridge and Blazak (1976).
M = Metacentric; A = Acrocentric.

448



Sintena kromosomov miši in človeka. Zaradi evolucijske oddaljenosti so mnoge reorganizacije delcev kromosoma postavile homologne segmente kromosomov na različne kromosome v različnih kombinacijah (po Lisa Stubbs, LLNL).

sintena (*synteny*; *Synthenie*) vezava genov (*linkage*) na *istem* kromosomu.

449

Stabilnost kromosomov

- Na kromosomih se nahajajo nekatera specifična mesta, kjer so kromosomi bolj lomljivi (*fragile sites*)
 - pri psu – položaj na Xp22; Xq21; Xq27.
- V karcinomskem (rakavem) tkivu – mnogo različnih kromosomskih aberacij: aneuploidije, poliploidije, translokacije, centralne fuzije, delecije, izokromosomi (posledica nenadzorovane celične delitve).
- Količina DNA v posamezni celici pri različnih sesalcih je praviloma enaka, čeprav je število kromosomov pri različnih živalskih vrstah različno – posledica reorganizacije kromosomov – evolucija kromosomov.

450

Prenatalna diagnostika spola pri živalih

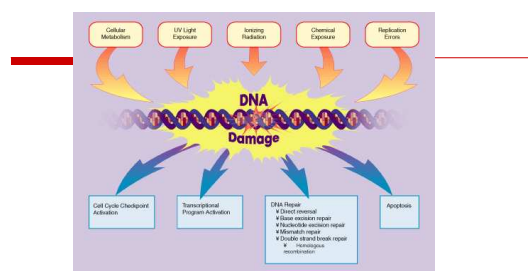
- Amniocenteza – proučevanje celic iz amniotske tekočine – citogenetika
- Ugotavljanje Barr-ovih teles.
- Ugotavljanje testosterona v alantoisni tekočini.
- Pri embriotransferju – biopsija trofoblasta – pri govedu 14 dnevni embrij.
- Ločevanje spermijev z X ali Y.

451

Mutacije

Spontane mutacije
Inducirane mutacije
Molekularne osnove mutacij
Frekvenca mutacij

452



- Dedovanje je osnovano na lastnostih DNA in genov, ki se zvesto prenašajo na potomstvo.
- V celicah obstajajo zaščitni mehanizmi, ki preprečujejo nastanek napak.
- Vendar se kljub temu pojavljajo napake/spremembe v dednem materialu – mutacije.
- Izraz mutacija se nanaša na proces nastanka spremembe in na samo spremembo v dednem zapisu.
- V širšem pomenu se nanaša na kakršnekoli spremembe v dednem zapisu:
 - spremembe v številu kromosomov,
 - spremembe v strukturi kromosomov,
 - spremembe v posameznih kromosomih,
 - spremembe v posameznih genih.

454

- V ožjem pomenu se izraz mutacija nanaša na spremembe v posameznem genu.
- Mutant – gen ali organizem po genski mutaciji.
- Mutacije so vir genetskih variacij organizmov – rekombinacije jih prerazporejajo v nove kombinacije, naravna ali izbrana selekcija pa ohranja želene gene v primernem okolju.
- Premočne mutacije – onemogočena rekombinacija pri gametogenezi.
- Potrebno je ravno pravo ravnovesje med ohranjenostjo dednega materiala in nastajanjem novih mutacij.

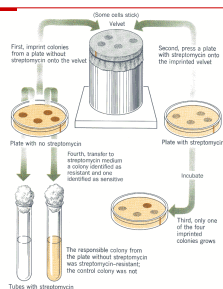
455

- Spontane mutacije – nastanejo brez znanega vzroka, lahko med replikacijo DNA.
- Inducirane mutacije – nastanejo zaradi izpostavljenosti mutagenim agensom iz okolja (ionizirajoča sevanja, ultravijolična svetloba, različne kemikalije, ki reagirajo z DNA).
- Polimeraza DNA med polimerizacijo naredi napako s frekvenco 10^{-5} . Pri preverjanju naredi napako s frekvenco 10^{-10} ($10^{-5} \times 10^{-5}$). Obstajajo pa še drugi popravljalni mehanizmi, ki zredcirajo frekvenco napak.
- Težko je oceniti vzrok nastanka mutacije: spontani ali inducirani. Ocenjujemo na nivoju populacije (obdelovana in kontrolna skupina).

456

So mutacije naključne ali jih usmerjajo vplivi okolja

- J in EM Lederberg – nasajanje replik bakterijskih kultur – preskušanje odpornosti na streptomycin
- Okolje izbere že obstoječe mutacije, ki imajo boljši fenotip za preživetje.
- Mutirani osebki imajo prednost – preživi in ima potomce

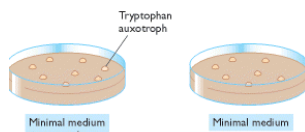


457

- Učinki mutacij so lahko zelo različni - od sprememb, vidnih le s specialnimi genetskimi tehnikami (izoaleli) do letalnih sprememb, če se pojavijo v genih, ki so nujni za obstoj organizma.
- Dominantnost mutacij
- Recesivnost mutacij
- Mutacije, vezane na spol
 - Izražene pri hemizigotih (moški spol pri sesalcih, ženski spol pri pticah)
 - recesivne letalne bodo spremenile razmerje med spoloma, ker hemizigoti ne preživijo.

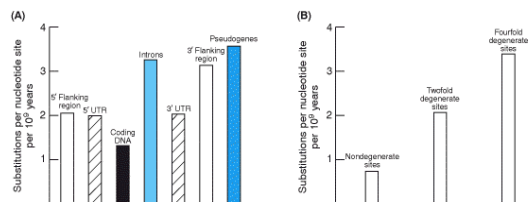
458

- Pogojno letalne mutacije
 - letalne v določenem okolju
 - vitalne v drugem okolju
- auktotropne mutacije - organizem ne proizvaja določene esencialne snovi, preživi le v okolju, kjer je ta snov dodana,
- na temperaturo občutljive mutacije



459

Stopnja substitucij nukleotidov je različna v različnih delih genoma.



Mutacije v somatskih celicah, mutacije v zarodnih celicah

Pomen mutacije je odvisen od mesta, kjer nastane v somatskih celicah ali v zarodnih celicah.

Mutacije, ki nastanejo v somatskih celicah (npr. kostni mozeg, jetra) lahko:

- okvarijo celico,
- pretvorijo celico v rakavo celico,
- uničijo celico.

Kakršenkoli je že učinek, mutacija je izgubljena, ko celica, v kateri je nastala, odmre.

Mutacije v zarodnih celicah pa bomo našli v vseh celicah, ki izhajajo iz te mutirane zarodne celice. Vključno z zarodnimi celicami tega osebk, ki bodo prenesle mutacijo na naslednjo generacijo. In te na naslednje generacije.

461

Oblike točkovnih mutacij:

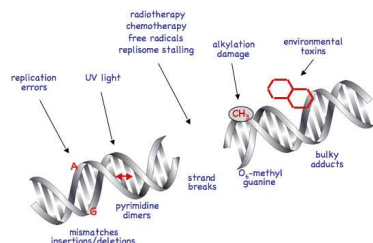
- Pri baznem parjenju en purin oz. pirimidin zamenja drug purin oz. pirimidin – tranzicija.
 - Pri baznem parjenju pirimidin zamenja purin in obratno – transverzija.
 - Dodatek ali izguba baznega para v molekuli DNA – premik/spremembabralnega okvira ("frameshift mutation").
- Te oblike so pogoste pri spontanah mutacijah.

Na nastanek točkovnih mutacij vpliva:

- natančnost replikativnega aparata,
- učinkovitost reparacijskega aparata,
- izpostavljenost mutagenov v okolju.

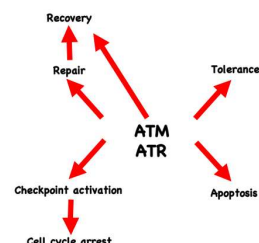
462

DNA je izpostavljena mnogim vplivom



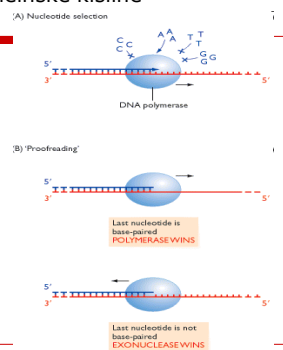
Sprememba DNA

- Popravljalni mehanizmi
- Apoptoza
- Toleranca:
 - Sprememba zaporedja



Sodelujeta protein kinazi:
ATM in ATR

Preverjanje sinteze nukleinske kisline ("proofreading")



465

Mutageni

Sprememba iz fiziološke celice v mutirano celico lahko nastane pod vplivom nekaterih dejavnikov – mutagenov, ki povzročajo okvare molekule DNA.

- Genetski:
 - proto-onkogeni: tumorski supresorski geni; geni, ki vplivajo na apoptozo; geni, ki sodelujejo pri delitvi celice
- Kemični:
 - Analogi baz – podobna struktura dušikovim bazam, vgradijo se v molekulo DNA med replikacijo, vendar so dovolj drugačni, da povzročijo napačno parjenje baz.
 - 5-bromouracil
 - 2-aminopurin
 - Akridinska barvila – zelo močni mutageni – inducirajo zamikbralnega okvira. Vrinejo se med bazne pare, spremenijo konformacijo dvojne vijačnice, med replikacijo pride do dodajanja posameznih baznih parov – zamik.
 - Aflatoksin – vezava na DNA, vpliva na replikacijo in transkripcijo
 - Alkalirajoči in hidroksilirajoči agensi – prenos metilne ($-\text{CH}_3$) ali etilne skupine ($-\text{C}_2\text{H}_5$) na baze, njihov bazni potencial se spremeni – sledi tranzicija.

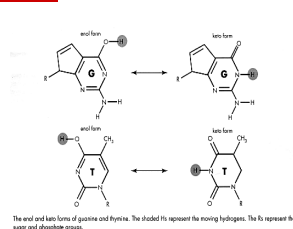
466

Mutageni

- Fizikalni
 - UV-sevanje – točkovne mutacije;
 - ionizirajoče sevanje – prelomi DNA, inverzije, delecije, translokacije)
- Virusni
 - hepatitis B
- Imunski
 - imunske celice, ki nastajajo pri kroničnih vnetjih proizvajajo mutagene snovi)
- Endokrini
 - estrogeni, TSH

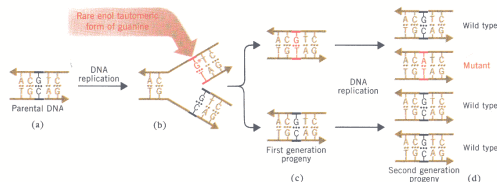
467

- Strukture dušikovih baz v molekuli niso statične. Vodikov atom se lahko premika iz enega položaja na purinu ali pirimidinu na drugega.
- Pojav tautomerije – lastnost nekaterih organskih spojin, da reagirajo po dveh izotomernih formulah.
- S tem se spremeni potencial za parjenje baz.
- Redek pojav, vendar možen. Keto in amino oblike so bolj stabilne, enolne in imino oblike se občasno pojavijo za krajši čas. Možno bazno parjenje: A-C, G-T.
- Posledica je nepravilno ("mismatched") bazno parjenje – mutacija.



468

Mutacija, nastala zaradi tautomernih oblik dušikove baze



469

Mutacije, inducirane z ionizirajočimi žarki (X, alfa, beta, gama žarki radioaktivnih izotopov, kozmični žarki)

- Med prehodom skozi tkivo ionizirajoči žarki z visoko energijo trčijo v atome, povzročijo sproščanje elektronov, ostanejo pozitivno nabiti ioni – močno reaktivni prosti radikali. Ti ioni ponovno trčijo z drugimi molekulami in proces se nadaljuje.
- Povečana reaktivnost atomov v molekuli DNA – posledica so mutageni učinki.
- Radiacija lahko povzroči tudi prelome molekule DNA, kar celični mehanizem za reparacijo ne more popraviti. Posledica so lahko kromosomske aberacije.
- Obstaja linearna povezava med dozo ionizirajočega sevanja in nastankom induciranih mutacij.
- Varna doza iradiacije? Vsaka lahko povzroči mutacijo.

470

Tipične radiacijske doze (v mrem – efektivni biološki učinek radiacije)

- Kozmična radiacija
 - 25 mrem na 0 m nadmorske višine/leto
 - 50 mrem na 1600 nadmorske višine/leto
- Let z letalom
 - 0,5 mrem/uro
- Sevanje iz površine zemlje (uran, torij ...)
- Vdihavanje radona
 - 15 mrem – 1000 mrem/leto
- Vdihavanje radona
 - 200 mrem/leto
- Sevanje hrane
 - 15 mrem/leto
- Sevanje ljudi
 - 40 mrem/leto
- Diagnostika
 - RTG okončin -1 mrem
 - RTG zob -1 mrem
 - Chest Xray: 6 mrem
 - RTG vratu, lobanje: 20 mrem
 - RTG medenice: 65 mrem
 - Barium Enema: 405 mrem

471

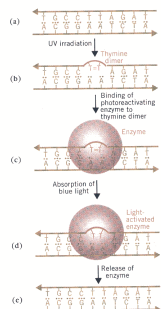
Ultravijolično žarčenje

- UV-žarki nimajo dovolj energije za ionizacijo, vendar jih nekatere snovi (npr. purini in pirimidini) absorbirajo in postanejo bolj reaktivne.
- Ne penetrirajo globoko v tkivo (imajo malo energije) – nevarni za enocelične organizme.
- Molekula DNA najbolje absorbira UV žarke valovne dolžine 254 nm – ti žarki so tudi najbolj mutageni.
- Pride do **dimerizacije timinov**.

472

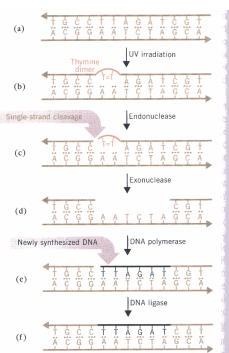
Reparacijski mehanizmi

- Fotoreaktivacija – encim se veže na DNA in razcepi dimerne oblike bp.



473

- Reparacija z izrezovanjem: sodelujejo encimi endonukleaza, eksonukleaza, polimeraza, ligaza.



474

Okvare popravljalnih (reparacijskih) mehanizmov molekule DNA (pri ljudeh)

- Xeroderma pigmentosum
 - avtosomalna recesivna okvara reparacijskega mehanizma pri ljudeh,
 - poznanih več različnih oblik – mutacije na različnih kromosomih, geni, ki kodirajo:
 - Različne helikaze
 - Endonukleaze,
 - Eks nukleaze
 - Proteine, ki se vežejo na poškodovano DNA,
 - Različne senzorje poškodb DNA
 - Povečana občutljivost na sončne žarke, fotosenzibilnost
 - Povečana pogostost karcinoma kože,
 - Pogostost
 - 1/1 000 000 v ZDA,
 - 1/ 40.000 na Japonskem

475

Okvare popravljalnih (reparacijskih) mehanizmov molekule DNA (pri ljudeh)

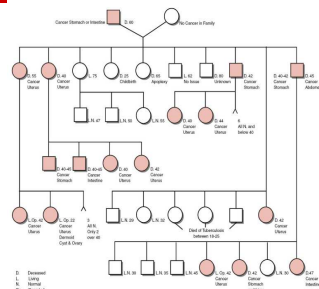
- Dedni nepolipozni kolorektalni kancer – (hereditary nonpolyposis colorectal cancer - HNPCC) okvara reparacijskega sistema za napačno vgrajene nukleotide
 - ena izmed najpogostejših obolenj,
 - Različni podatki o pogostosti (prizadet 1 od 200 ljudi v zahodnem svetu)
 - geni za encime za izrezovanje napačno vstavljenega nukleotida so okvarjeni
 - Poznanih vsaj 6 različnih mutacij na različnih genih
 - Avtosomalna dominantna dedna bolezen

Dedovanje rakavih obolenj v družini G

Roza obarvane osebe so imele obliko rakavega obolenja. Viden je dominantni vzorec dedovanja razvoja rakavega obolenja debelega črevesa, želodca, maternice (sindrom dednega nepolipoznega kolorektalnega raka - HNPCC)

Predispozicija za HNPCC je posledica mutacije alela, ki kodira proteine za reparacijo DNA

(družino je opisal AS Warthin, 1913)(Fearon ER, Vogelstein B. Tumor suppressor and DNA repair gene defects in human cancer. In: Holland JF, Frei E, Bast RC, et al, editors. Cancer medicine, 4th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1997. p. 97–117).



Frekvenca mutacij

- Nekateri geni so bolj nagnjeni k mutacijam.
- Znanstveniki se strinjajo, da je v okolju že preveč mutagenih onesnaževalcev okolja.
- Pri sesalcih je več mutacij pri gametah samcev kot samic.

478

Nomenklatura za imenovanje mutacij - Antonarakis *et al.* (1998)

Zamenjave aminokislin

Uporabimo črkovne znake za kode:

A, alanin; C, cistein; D, asparaginska kislina; E, glutaminska kislina; F, fenilalanin; G, glicin; H, histidin; I, izolevcin; K, lizin; M, metionin; N, asparagin; P, prolin; Q, glutamin; R, arginin; S, serin; T, treonin; V, valin; W, triptofan; Y, tirozin; X stop kodon. Uporabimo lahko tudi trčkovne oznake.

- **R117H** ali **Arg117His** – arginin na položaju 117 je zamenjan s histidinom.
- **G542X** ali **Gly542Stop** – glicin na položaju 542 je zamenjan s stop kodonom.

Zamenjave nukleotidov

- A na začetnem kodonu ATG se številči kot +1. Položaja 0 ni. Podamo številko nukleotida, temu sledi sprememba.
 - **1162G>A** – gvanin na položaju 1162 je zamenjal adenin.
- Spremembe znotraj intronov - specificiramo številko introna z IVSn ali številko nukleotida najbližjega eksona.
 - **621+1G>T** ali **IVS4+1G>T** – gvanin na prvem nukleotidu v intronu 4 je zamenjal timin; ekson 4 se zaključuje na nukleotidu 621.

Delecije in insercije

Oznako **del** uporabljamo za delecijo, oznako **ins** uporabljamo za insercijo.

- **F508del** – delecija fenilalanina na položaju 508.
- **6232-6236del** ali **6232-6236delATAAG** – delecija 5 nukleotidov, ki jih lahko specificiramo, od nt 6232.
- **409-410insC** – med nt 409 in 410 je vstavljen C.

- Zamik bralnega okvirja (frameshift mutacija).
- Mutacija s spremenjenim smislom (missense mutation) – sprememba v enem baznem paru molekule DNA, ki spremeni kodon v drug kodon, ki kodira drugo AA.
- Nesmiselna mutacija (nonsense mutation) - sprememba v enem baznem paru molekule DNA, ki spremeni kodon v stop kodon.

Občutljivost na ivermektin pri ovčarjih

- Toksičnost antiparazitika ivermektina na ovčarje je bila prvič opisana 1983.
- Ivermektin povzroča nevrološko toksičnost pri nekaterih ovčarjih v dozah – 1/200 doze, ki deluje toksično pri drugih pasmah psov.
- Klinični znaki zastrupitve z ivermektinom – hipersalivacija, ataksija, slepota, koma, respiratorne težave, smrt.
- Mnoge raziskave so bile opravljene po letu 1983, pred kratkim so veterinarji iz WSU ugotovili, da gre za **delecijsko mutacijo gena MDR1**.
- Prizadeti psi imajo mutacijo gena **MDR1** (multi drug resistance gene), takšne živali so občutljive na različna zdravila, nekatere antibiotike, zdravila za rakava obolenja, steroide, antiparazitike, zdravila za srce.
- Gen **MDR** kodira velik transmembranski protein – P-glikoprotein, ki je del možgansko-krvne barriere. P-glikoprotein deluje kot zaščita – za transport različnih zdravilnih substratov iz možganov nazaj v krvni obtok.

482

Pasme psov – pogoste nosilke mutacije gena MDR1

- Devet sorodnih pasem psov:
- zgoraj – od leve proti desni: škotski ovčar, McNab in šetlandski ovčar.
- sredina – avstralski ovčar, angleški ovčar, pritlikavi avstralski ovčar.
- Spodaj – dolgoblaki wipet, staroangleški ovčar in silken windhound.



483

Zdravila, ki delujejo toksično v primeru mutacije gena MDR1 (Poročajo o mnogih različnih zdravilih, verjetno bo seznam še daljši)

- Antiparazitiki
 - Ivermectin
 - Selamectin
 - Moxidectin
- Zdravila za srce
 - Digoxin
 - Quinidine
- Zdravila za kardiovaskularna obolenja
 - Loperamid
 - Domperidon
- Imunosupresorji
 - Cyclosporin A
 - Tacrolimus
- Steroidi
 - Dexamethasone
 - Hydrocortisone
- Zdravila za zdravljenje rakavih obolenj
 - Vincristine
 - Vinblastine
 - Doxorubicine
- Narkotiki
 - Ondansetron
- Zdravila z antimikrobnim delovanjem
 - Erythromycin
 - Grepafloxacin

484

- J Vet Pharmacol Ther. 2005 Dec;28(6):545-51. [Related Articles](#), [Links](#)

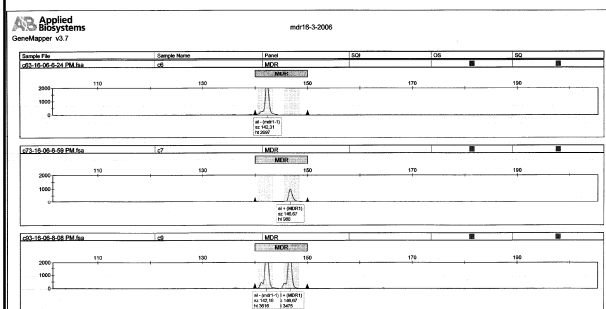
Frequency of the nt230 (del4) MDR1 mutation in Collies and related dog breeds in Germany.

Geyer J, Doring B, Godoy JR, Leidolf R, Moritz A, Petzinger F.

Institute of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Justus-Liebig-University of Giessen, Giessen, Germany.

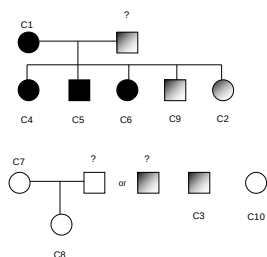
MDR1 (ABCB1) P-glycoprotein exerts a protective function in the blood-brain barrier thereby limiting the entry of many drugs and other xenobiotics to the central nervous system. A nonsense mutation has been described for Collies and related dog breeds which abolishes this function and is associated with increased susceptibility to neurotoxic side effects of several drugs including ivermectin, moxidectin and loperamide. In order to evaluate the occurrence and frequency of this nt230 (del4) MDR1 mutation in Germany, we screened 1500 dogs. Frequency of the homozygous mutated genotype was highest for Collies (33.0%), followed by Australian Shepherd (6.9%) and Shetland Sheepdog (5.7%). Thirty-seven percent of the Waller dogs and 12.5% of the Old English Sheepdogs were heterozygous for the mutant MDR1 (-) allele. Considering the predominant role of MDR1 P-glycoprotein in drug disposition and in particular for blood-brain barrier protection, MDR1 genotype-based breeding programs are recommended for improving the safety of drug therapy in these canine breeds.

485



486

Študije v Sloveniji (avstralski ovčarji)



Prizadetost psov

Približno 3 od 4 škotskih ovčarjev v ZDA imajo mutirani gen *MDR1*. Frekvenca je približno enaka v Franciji, Avstraliji. Mutacijo so ugotovili tudi pri šetlanskih ovčarjih, avstralskih ovčarjih, nemških ovčarjih, hrtih in mnogih mešancih.

488

- Wolfe-Simon, Felise, s sod. (2010). »A Bacterium That Can Grow by Using Arsenic Instead of Phosphorus«.

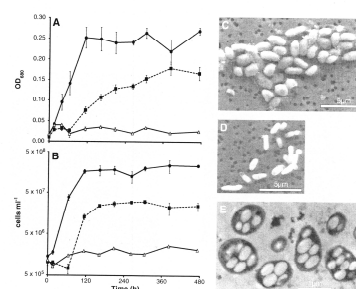
Science (*Science Express*).



- Za življenje nujno potrebni:
 - kisik, ogljik, vodik, dušik, fosfor in žveplo.
- Ion AsO_4^{3-} ima enako strukturo in vezalna mesta kot fosfat. Zaradi te podobnosti lahko vstopi v celico s transportnim mehanizmom za fosfatne ione, zato je arzen zelo toksičen za večino organizmov.

- Bakterija izolirana blata iz jezera Mono v Kaliforniji (visoka konc. Arzena v jezeru).
- Gojenje bakterij v gojiščih z arzenom, brez fosforja.
- Po več pasažah – rast bakterije z arzenom.
- Sev bakterije GFAJ-1 (*Halomonadaceae*), za katero sklepajo, da lahko fosfor v ključnih biomolekulah nadomesti z arzenom.

Črni krogi – prisotnost fosforja
črni kvadrati – prisotnost arzena
beli trikotniki – brez fosforja, brez arzena



- Označevanje z radioaktivnim arzenom – arzen so našli v frakcijah, kjer se običajno v enakih razmerjih nahaja fosfor:
 - proteini, lipidi, ATP, nukleotidi ...



Bolezni (lastnosti), ki se pojavljajo v družini

Vpliv okolja
Vpliv dednosti
Vpliv enega gena
Penetranca
Multifaktorielne bolezni

495

Družinske bolezni

- Incidenca (obolevnost) pri sorodnikih obolelega oseba je večja, kot v splošni populaciji
- Zaradi okolja - enaki pogoji okolja za vso družino – (lahko tudi enak patogen)
- Zaradi okvare dednega materiala
- Možna kombinacija pogojev okolja in okvar dednega materiala – sodelovanje več dejavnikov pri nastanku obolenja

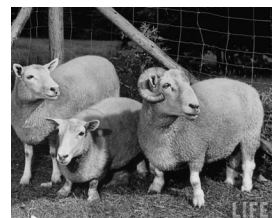
496

- Večina lastnosti je določena z delovanjem več genov na različnih lokusih.
- Le redke lastnosti so takšne, da jih določa delovanje enega samega gena.
 - vendar povzročajo veliko škodo, zaradi možnosti hitrega širjenja enega samega mutiranega gena (npr. PSS).

497

Prva ugotovljena dominantna mutacija v zarodnih celicah

- Vpliv dominantne germinalne mutacije – Seth Wright 1791 – razvil je pasmo kratkonogih ovc – pasma ancon, kasneje se je ta pasma oplenitila s pasmo merino.



498

Ovce - ancon

- *achondroplasia* (hrustanec se ne razvija pravilno – grško – *a* – ne; *chondros* – hrustanec; *plassein* – oblikovanje; oblika pritlikavosti)
- Koristno za živinorejsko proizvodnjo (?)
 - Živali so slabše okretne, so manj živahne, bolje priraščajo
- Verjetno slabša sposobnost preživetja v naravi
 - Opazne tudi druge anomalije: šibkejši sklepi, nenormalna hrbtnica in lobanja, nenaravno ukrivljene prednje noge

Izguba funkcije

499

Citrulinemia pri teletih (holstein- frizijska pasma)

- Teleta normalna ob rojstvu
- Nekaj ur po rojstvu – depresija
- Po nekaj dneh – depresija, nestabilna hoja, pena na gobcu.
- Smrt po 3 – 5 dneh.
- Dedna avtosomalna recesivna bolezen
- Diagnoza –
 - zastrupitev z amoniakom.
 - Genetski testi –homozigotni ASS⁻ osebk

Metabolizem amoniaka

- amoniak
- citrulin
 - (encim **argininosukcinat sintetaza** (ASS) je vključen v pretvorbo citrulina in aspartata do argininosukcinata)
- argininosukcinat
- arginin
- urea
- Odsotnost encima ASS – kopičenje citrulina in amoniaka.
- Mutacija na kodonu 86 (CGA – arg > TGA – stop kodon) gena za ASS – substitucija.

Raven izražanja ASS

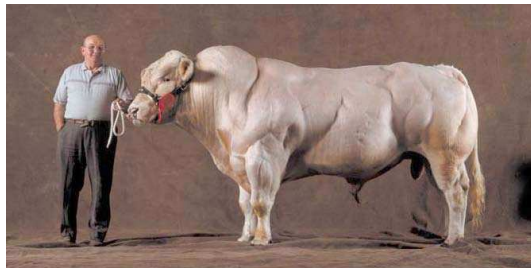
- Homozigotni ASS⁺
- Heterozgotni ASS⁺/ASS⁻
- Homozigotni ASS⁻

- Pojavnost pogosta v Avstraliji med pasmo holstein (konec 20. stol).
- Plemenjak Linmack Kriss King (sin nosilca Gray View Crisscross).
- V Nemčiji 17% heterozigotov pasme holstein v letu 1989.
- Testiranje je omogočilo zmanjšanje pojavnosti citrulinemije.
- Študija iz leta 1996 – nobenega nosilca gena v populaciji govedu pasme holstein v Nemčiji.

- Pasma govedu belgijsko plavo govedo (Belgian Blue) ima 20 – 30 odstotkov več mišičnine kot običajne pasme govedu, meso vsebuje manj maščobe in je zelo nežno.
- Rast mišičnine regulirajo mnogi proteini, med njimi tudi miostatin. Pri belgijskem plavem govedu mutacija inaktivira gen za miostatin, zato mišice nekontrolirano rastejo (muskularna hiperplazija).
- Podobna mutacija istega gena je odgovorna za zelo močno mišičnino pri govedu piedmonteze (Piedmontese).
- Ta mutacija je lahko koristna za proizvodnjo živil živalskega izvora, vendar ima stranske učinke za govedo. Znani so problemi z reprodukcijo.

504

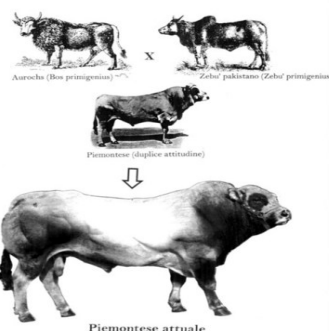
Belgijsko plavo govedo



Govedo piedmonteze



507



Mutacija gena za miostatin pri piedmontese izvira iz konca 19. stoletja



Tehnike molekularne genetike so omogočile identifikacijo gena, ki povzroča razvoj dejavnika dvojne mišice (double muscle faktor).

- Mutacija se nahaja na genu za miostatin na 2 kromosomu.
- Autosomalna recesivna mutacija.
 - Mutacija pri pasmi piedmontese - tranzicija G-A v genu za miostatin, sprememba cisteina v tirozin.
 - Belgijsko plavo - delecija 11 bp v genu za miostatin - zamik bralnega okvira.

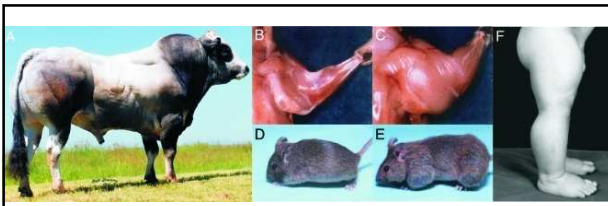
Mutacija povzroči povečan razvoj mišične mase, povečana količina mišičnih vlaken, zmanjšana je količina maščobe med mišičnimi vlakni, manj je veznega tkiva - zelo nežno meso. 20-odstotkov več mišičnine.

Miostatin - transformirajoči rastni faktor- β (transforming growth factor- β ; TGF- β)

509

- V laboratoriju so raziskovalci z mutacijo gena za miostatin *in vitro* ustvarili linijo mišičaste miške (mighty mouse)
- Podobne preiskave za terapijo pri ljudeh:
 - Za obolenja, kjer pride do izgube mišične mase
 - zdravljenje nekaterih oblik debelosti
 - zdravljenje mišične slabosti zaradi drugih obolenj - AIDS
 - body building.

510



"Dvojna muskulatura" – fenotip okvarjenega gena za miostatin.

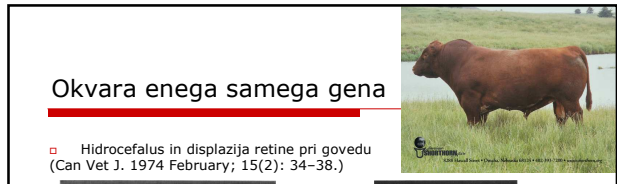
A, Mišična hiperplazija pri govedu piedmonteze – mutacija gena za miostatin s spremenjenim smislom.

B in C, Mišičnina prednje tace miši divjega tipa (B) in miši z izbitim genom za miostatin (C).

D in E, Divji tip (D) in transgena miš (E).

F, Mišičnina 7-mesečnega fanta z mutacijo gena za miostatin.

Okvara enega samega gena



- Hydrocephalus in displazija retine pri govedu (Can Vet J. 1974 February; 15(2): 34–38.)
- hydrocephalus - povečana količina cerebrospinalnega likvorja v možganskih ventriklih, zaradi česar se ti razširijo, pri teletu/dojenčku se poveča obseg glave, pri odraslem naraste intrakranialni tlak; sin. hidrocefalija, vodenoglavost
- displazija - nepravilen razvoj, velikost, oblika in zgradba celic, tkiv, organov, udov, telesa

Rodovnik – pojavnost displazije mrežnice pri govedu pasme shorthorn

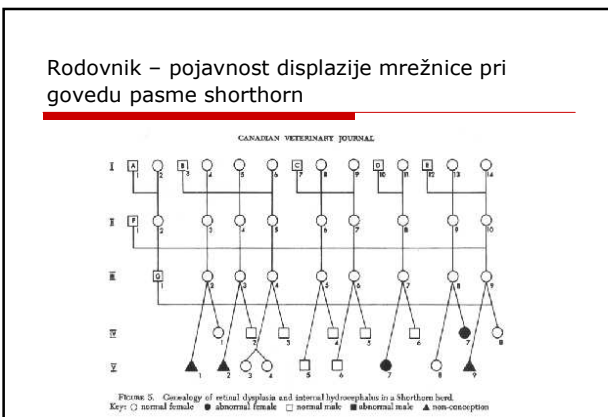


FIGURE 3. Genealogy of retinal dysplasia and internal hydrocephalus in a Shorthorn herd.

Key: □ normal female, ● abnormal female, □ normal male, ■ abnormal male, ▲ non-conception

- Autosomalni recesivni gen pri govedu shorthorn
- Vsi homozigotno recesivni osebki so prizadeti
- Vsi osebki, ki imajo vsaj en dominantni gen (alel) so zdravi.
 - učinek vse ali nič (popolnoma zdrav ali z vsemi znaki bolezni) – popolna penetranca gena.
 - Podvrženost obolenju je determinirana le z genotipom, vplivi okolja le redko sodelujejo pri nastanku bolezni.
 - Vsi potomci obolenih živali so oboleni (aa x aa, dobimo le aa).

Nepopolna penetranca (prodornost učinka gena)

- Sindrom maligne hipertermije pri prašiču (tudi prašičji stresni sindrom - PSS)
 - Dedna avtosomalna recesivna okvara:
 - značilna povišana telesna temperatura, togost mišičnine, metabolična acidoza, ki lahko vodi v smrt živali.
- Bolezen izzovemo, če žival izpostavimo stresu ali halotanu (inhalacijski anestetik).
- Dovzetni prašiči hitro reagirajo – ca. dve minuti po izpostavljenosti opazimo krč mišic. Če dovolj zgodaj odstranimo vzroke, se žival po petih minutah povrne v zdravo stanje.
- Parjenje dovzetnih prašičev: aa x aa
- Halotanski test na potomcih: 98-odstotkov dovzetnih
- Vsi imajo genotip aa, vendar niso vsi popolnoma dovzetni – nepopolna penetranca gena.

Prašičji stresni sindrom (PSS)

- Mutacija gena za rianodinski receptor (gen *RyR1*) – kalcijev kanal na sarkoplazemskem retikulumu skeletnih mišic.
- Gen *RyR1* na 6 kromosomu citozin > timin na položaju 1843 povzroči zamenjavo arginina na položaju 615 v cistein proteinu receptorja.
- Ugotavljanje:
 - s kliničnimi testi
 - z genskim testom – PCR.

Znaki

- Povečanje telesne temperature (Sindrom maligne hipertermije),
- Tresenje togost mišic
- Pospešeno dihanje
- metabolična acidoza
- po zakolu – belo mehko vodeno meso (BMV).

- V Sloveniji testiranje od leta 1994.
- Spremljanje frekvence mutiranih alelov.
- Največ pri pasmi prašičev pietrain, najmanj pri pasmi duroc in large white.

- Penetranca – delež osebkov z nekim genotipom, ki ima ta genotip izražen v značilnem fenotipu.
 - penetranca – stopnja izražanja;
 - genska ~ lastnost gena, da se izrazi 100-odstotno ali ne (če se ne, ima manjšo penetranco); prim. ekspresivnost gena.
- Če je 100-odstotkov genotipov izraženih v za ta genotip značilnem fenotipu, govorimo o 100-odstotni, popolni penetranci. Če je manj kot 100-odstotni delež recesivnih homozigotov izraženih, je penetranca nepopolna. Pri prašičjem stresnem sindromu je penetranca nepopolna (98-odstotna).
- Pri takih genotipih je izraženosn gena (dovzetnosti) odvisna od vplivov okolja.

519

Policistična degeneracija ledvic – PKD (polycystic kidney disease)



- Dedna avtosomalna **dominantna** bolezen pri mačkah.
- Prevalenca (pogostost) pri perzijskih mačkah – 38-odstotna.
- Klinična slika:
 - ciste različnih velikosti v skorji ledvic
 - občasno tudi v sredici ledvic, tudi v jetrih in pankreasu
 - odpoved ledvic pri mačkah ≥ 7 letih
 - polidipsija, dehidracija, anoreksija

- Mutacija gena *PKD1* – transverzija C>A na položaju 3284 na eksonu 29 gena *PKD1*, nastane prežgodnji stop kodon, 25-odstotkov proteina manjka.
- Heterozigotne živali so vedno obolele.
- Ni še bila ugotovljena živa homozigotna žival z mutacijo na obeh alelih.
 - Opisana mutacija predstavlja 85 % PKD pri mačkah
 - 15 % mačk z dedno avtosomalno policistično boleznijo ledvic ima drugo obliko mutacije na lokusu *PKD2*.

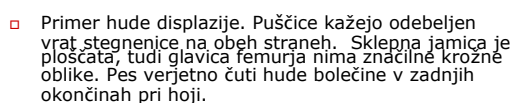
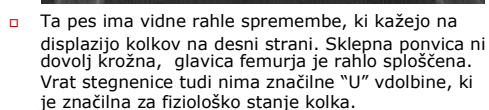
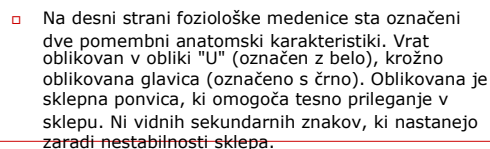
- Diagnostika:
 - klinična slika
 - patohistološka preiskava ledvic
 - ultrazvočna preiskava
 - genetski test (PCR-RFLP)



(a) Prileganje nukleotidnih zaporedij molekul DNA gena za PKD1 v eksonu 29 miši, človeka, psa in mačke (divji in mutirani tip). Simbol v krepki pisavi (**A**) označuje transverzijo, ki se pojavlja pri mačkah s PKD, ki povzroča spremembo v prevajanju aminokislin in nastanku stop kodona.

- ## Displazija kolčkov pri psih

- Razvojna okvara, izražena med 2- 6 mesecih pri velikih in srednje velikih pasmah.
- Pri nekaterih pasmah 40 do 75 % psov prizadetih.
 - labrador
 - zlati prinašalec
 - nemški ovčar
 - bernski planšarski pes
 - in druge pasme.



- Študije pri nemških ovčarjih:
 - križanje dveh prizadetih parov
 - 86-odstotkov potomcev je prizadetih.
- Študije pri prizadetih labradorcih:
 - križanje dveh prizadetih parov
 - 63-odstotkov psov je prizadetih.

529

- Na izražanje displazije kolkov pri psu vpliva:
 - Zanesljivost diagnostike (rentgensko slikanje, palpacija)
 - Način prehranjevanja živali (debelost – močnejša dovzetnost)
 - Obremenitve gibalnega aparata živali v rani mladosti (močnejša dovzetnost).
 - Delovanje genov na drugih lokusih, ki lahko doprinesejo k izražanju bolezenskih znakov
- Kombinirano delovanje več dejavnikov okolja in več genetskih dejavnikov – več genov na različnih lokusih.
 - Primerjava rezultatov rtg in rodovnikov – izboljšan delež živali brez displazije.
- S primernim režimom gibanja in prehranjevanja lahko zmanjšamo možnost nastanka bolezni.

- Analiza rezultatov rtg v primerjavi z rodovniki pri labradorcih od 1970 do 2007.
- Ali poznavanje fenotipa kolkov vpliva na izboljšanje stanja glede displazije kolkov pri psih?
 - Vpliv starosti
 - Ni opazen vpliv spola
 - Vpliv dednosti 0,21
- Izboljšano stanje glede pojavnosti displazije kolkov pri labradorcih.
- 24 % večji delež odličnih kolkov pri psih v zadnji dekadi.

- Selekcija na določeno lastnost.
- Vpliv drugih lastnosti na izbiro psa.
- Vpliv popularnega plemenjaka na izbiro.
- Vpliv metodologije za določanje lastnosti.
- Delež vpliva dednosti na posamezno lastnost.
- Interes zahtevane selekcije.

- Vsaka žival, ki ima dovzetnost nižjo od kritičnega praga, ki določa stopnjo dovzetnosti (ne glede na dejavnike, ki so vključeni), ne bo imela znakov multifaktorske bolezni (npr. displazije kolkov).
 - Bolezen, ki jo preneša en sam gen z nepopolno penetranco?
 - Multifaktorska bolezen?
- Če opazimo dedno bolezen, ki se pojavlja v družini, pa ne opazimo preproste oblike mendlovega dedovanja, potem gre praviloma za multifaktorsko obolenje, redkeje gre za bolezen, ki jo povzroča okvara enega samega gena – z nepopolno penetranco.

533

Stopnja deleža dednosti (v primerjavi z deležem okoljskih dejavnikov) – večina multifaktorskih bolezni ima srednjo stopnjo dednosti – dedni in okoljski dejavniki vplivajo na nastanek bolezni.

- Pogosto primerjamo delež obolevnosti (*obolevnost* – število bolnikov v določeni populaciji v določenem obdobju; *sin. morbiditeta, morbidnost*) v celotni populaciji z obolevnostjo pri posameznih družinskih članih.
 - dva značilna razreda dednih bolezni – tiste, ki se dedujejo po zakonih mendlovega dedovanja (recesivno, dominantno) – bolezen vidna pri potomcih bližnjih sorodnikov.
 - Bolj pogoste so multifaktorske bolezni – enaka pojavnost pri potomcih bližnjih sorodnikov kot v celotni populaciji.

534

- Dednost (heritability) – stopnja dedne determinante pri pojavnosti okvare/lastnosti.
- Primarno omenjena pri ocenjevanju deleža dednosti pri nastanku multifaktorskih obolenj – ocenjujemo delž dednosti nasproti deleža vpliva okolja.
- Vendar o dednosti govorimo tudi takrat, ko govorimo o direktnem prehodu genov od staršev na potomce (npr. fenotipska podobnost staršev in potomcev).

535

- Zakon o ravnanju z gensko spremenjenimi organizmi (ZRGSO)
Ur.l. RS, št. 67/2002
- Spremembe: Ur.l. RS, št. 73/2004, 23/2005-UPB1, 21/2010
- Datum sprejema: 11.07.2002
- Datum objave: 26.07.2002
- Datum začetka veljavnosti: 10.08.2002

Geni v populaciji

Frekvence alelov in genotipov
Hardy-Weinbergov zakon
Selekcija in mutacija
Populacijska genetika
Konzervacijska genetika

537

Frekvence genov in genotipov

- S frekvenco alelov merimo delež (frekvenco) določene oblike gena v primerjavi z drugimi geni (aleli) na določenem lokusu v populaciji. Izražena je kot delež (med 0 in 1) ali kot odstotek (med 0 in 100%).
- Hemoglobin pri ovcah:
 - dve obliki – HbA, HbB,
 - produkta dveh alelov na avtosomalnem lokusu – alel A, alel B,
 - možni so trije genotipi – AA, BB, AB,
 - vsak genotip ima svoj fenotip (kodominanca).

538

- Primer – določanje tipa hemoglobina pri 175 ovcah:
 - 91 primerov AA,
 - 28 primerov AB,
 - 56 primerov BB
- Lahko določimo delež posameznega genotipa v populaciji – določitev *frekvence genotipov*.

539

Izračun frekvence genotipa tipa hemoglobina pri hipotetičnem vzorcu ovac

Genotip	AA	AB	BB	Skupno
Število živali v populaciji	91	28	56	175
Frekvence genotipa (delež)	91/175 =0,52	28/175 =0,16	56/175 =0,32	1,00

Vsota frekvenc vseh genotipov je 1.

Frekvenco genotipov lahko določamo v katerikoli skupini živali. Običajno proučujemo skupino osebkov - populacije, ki imajo skupno lastnost – frekvence genotipa v čredi, pri pasmi, v državi, v pašni skupnosti, v posameznem gnezdu ...

540

Izračun frekvence genov (alelov) tipa hemoglobina pri hipotetičnem vzorcu ovac

Genotip	AA	AB	BB	Skupno
Število živali v populaciji	91	28	56	175

Živali so diploidne. Vsak AA ima dva gena A. Vsak AB ima en gen A in en gen B. Vsak BB ima dva gena B.

Frekvenco genov lahko računamo iz števila živali v populaciji.

Gen	A	B	Skupno
Število genov (alelov)	$91 \times 2 + 28 = 210$	$56 \times 2 + 28 = 140$	350
Frekvence gena (alela)	$210/350 = 0,60$	$140/350 = 0,40$	1,00

541

Frekvence genov lahko računamo iz frekvence (deležev) genotipa.

- Frekvence gena A:
 - frekvence AA + $\frac{1}{2}$ frekvence AB
 - $= 0,52 + \frac{1}{2} (0,16)$
 - $= 0,6$
- Frekvence gena B:
 - Frekvence BB + $\frac{1}{2}$ frekvence AB
 - $= 0,32 + \frac{1}{2} (0,16)$
 - $= 0,4$

542

Barve fižola

Fižolčki:
barve, genotipi, frekvence genotipov

Barva	Genotip	Relativna frekvence genotipov (%)
Bela	aa	9
Pegasta	Aa	42
Rjava	AA	49



543

Naključno parjenje Selektivno parjenje

- Naključno parjenje v populaciji – če ima vsak član te populacije enako možnost parjenja z osebkom drugega spola.
- Parjenje domačih živali je praviloma nadzorovano.
 - Človek pri izbiri partnerjev za parjenje domačih živali gleda le nekatere značilnosti (mlečnost, mesnatost, rastnost), za te značilnosti parjenje ni naključno – je **selektivno**.
 - Za druge lastnosti, ki jih človek praviloma ne pozna (npr. krvne skupine), pa je parjenje tudi pri domačih živalih **naključno**.

544

Hardy – Weinbergov zakon

- Hardy-Weinbergov zakon pravi, da ostajajo frekvence genov in genotipov konstantne (stanovitne) v neskončno velikih populacijah, v katerih je ploditev naključna, če ni ***selekcije**, ***migracije** in ***mutacij**. Razmerje med genotipi lahko izračunamo iz frekvenc genov, če označimo delež dominantnega gena A s "p" in recesivnega alela a s "q", s pomočjo formule: $p^2(AA) : 2pq(Aa) : q^2(aa)$. (Hardy, 1908; Weinberg, 1908).
- Iz kataloga znanj (prof. dr. Franc Ločniškar)
- Godfrey Harold Hardy (britanski matematik; 1877 – 1947) in Wilhelm Weinberg (nemški zdravnik; 1862 – 1937).
- V velikih populacijah se pri naključnem razmnoževanju osebkov enakih sposobnosti razmerja genov ohranjajo.

545

- Dominantni geni ne naredijo svojih nosilcev močnejših, recesivni ne slabših – zato v taki populaciji dominantni geni niso nujno bolj pogosti in recesivni ne bolj redki.
- Barva oči pri človeku (rjava – AA, Aa; modra – aa):
 - noben fenotip ni v prednosti,
 - modrooki imajo enako možnost preživetja kot rjavooki ljudje,
 - spol ne vpliva na izbiro barve,
 - ni naravne selekcije na izbor barve,
 - ni priseljevanja ljudi s specifično barvo (migracija),
 - ni mutacij gena, ki definira barvo oči
- Frekvence genov s takšnimi lastnostmi v dovolj veliki populaciji se ohranja skozi različne generacije.

546

Predpostavke za veljavnost H-W zakona

- Hardy in Weinberg sta postavila svoj zakon enakega deleža genov v populaciji, ki je bila precej **idealizirana**. Značilne lastnosti te populacije so:
 - Neskončno velika populacija
 - Razmnoževanje s spolnim razmnoževanjem
 - Naključno parjenje
 - Enaka oploditvena sposobnost vseh gamet
 - Enaki pogoji za preživetje vseh potomcev
 - Diploidna oblika genetskega materiala
- Brez selekcije
- Brez mutacij
- Brez migracij – brez pretoka genov
- V populaciji, z zgoraj naštetimi značilnostmi, ki ima na določenem lokusu dva alela - A in a , z deležem alela p (za alel A) in q (za alel a), veljajo sledeče enačbe:
 - $p + q = 1$
 - $p^2 + 2pq + q^2 = 1$

547

		Samice	
		$A (p)$	$a (q)$
Samci	$A (p)$	$AA (p^2)$	$Aa (pq)$
	$a (q)$	$aA (qp)$	$aa (q^2)$

Če poznamo deleže alelov, ki se lahko naključno kombinirajo, lahko izračunamo deleže treh možnih genotipov pri potomcih.

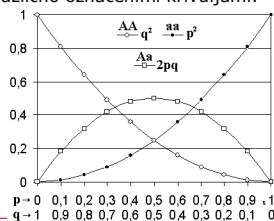
$$p^2 (AA)$$

$$2pq (Aa)$$

$$q^2 (aa)$$

548

- Hardy-Weinbergov princip za dva alela. Horizontalna os prikazuje **frekvenco dveh alelov** p in q , vertikalna os prikazuje **frekvenco genotipov**. Trije možni genotipi so prikazani s tremi različno označenimi krivuljami.



549

Vendar Hardy-Weinbergov zakon ne velja vedno

- Spremembe vseeno nastajajo, prihaja do evolucije/sprememb v populaciji. Pogoji, ki omogočajo spremembo in kjer ne velja H-W zakon:
 - Mutacija gena
 - Pritekanje genov
 - Naključni genetski tok (zdrsr)
 - Nenaključno parjenje
 - Naravni (ali umetni) izbor

550

Mutacije

- Frekvenca gena B in njegovega alela b ne bo v Hardy-Weinbergovem ravnotežju, če se spremeni stopnja mutacije $B \rightarrow b$ (ali obratno).
- Ta oblika verjetno le v manjši meri vpliva na spreminjanje frekvenc genov v populaciji – v fizioloških razmerah, na katere je živ organizem navajen, je stopnja mutacije zelo nizka.
- Vendar pa je evolucija odvisna od nastanka novih mutacij, ki oblikujejo nove oblike alelov. Ko se novi alleli premešajo v različnih kombinacijah z divjimi alleli v populaciji, so osnova za naravno selekcijo.

551

Pretok genov - migracije

- Mnoge vrste oblikujejo lokalne populacije, člani teh populacij se parijo med seboj – znotraj populacije. Vsaka **lokalna populacija** lahko razvije genetski pol, ki se razlikuje od drugih lokalnih populacij.
- Vendar pa se člani populacije lahko parijo z naključnimi/vnešenimi priseljenci iz druge populacije iste vrste. To lahko vnese nove gene v populacijo ali pa spremeni frekvenco obstoječih genov v populaciji.
- Pri mnogih rastlinah in pri nekaterih živalih lahko pretok genov nastopi ne le med isto vrsto ampak tudi med različnimi (vendar sorodnimi) vrstami. Proces se imenuje **hibridizacija**.
- Ce se hibridi potem parijo z vrsto enega izmed staršev, se novi geni prenesajo v genetski pol starševske populacije. Ta proces se imenuje **introgresija**. Gre za pretok genov med vrstami (in med znotraj njih).
- Pretok genov v vseh primerih poveča variabilnost genetskega pola.

552

Naključni genetski tok, zdrs (genetic drift)

- Parjenje je pogosto omejeno na člane znotraj lokalne populacije. Če je takšna populacija majhna, Hardy-Weinbergov zakon pogosto več ne drži. **Ze zaradi naključja se lahko določeni geni izločijo** iz stalnega deleža v populaciji. V taki populaciji frekvenca gena lahko drsi proti višjim ali nižjim vrednostim. Lahko privede tudi do absolutne zastopanosti gena ali pa gen popolnoma izgine iz populacije. Naključni genetski tok lahko privede do evlucijske spremembe. Vendar evolucija zaradi genetskega toka ni adaptivna, je precej brezciljna.

553

Nenaključno parjenje

- Osnova za Hardy-Weinbergovo ravnovesje frekvenc genov v populaciji je postavka, da je parjenje v populaciji naključno. Če so osebk v populaciji (običajno samice) izbirčni pri izbiri partner/ja/ke, se lahko frekvenca genov spremeni. Darwin je to imenoval spolna selekcija.
- Nenaključno parjenje je precej običajen pojav pri živalih, velja zakon najmočnejšega, teritorialno parjenje, zakonitosti dvorjenja – vse to vodi do nenaključnega parjenja. Nekateri osebk nimajo možnosti prenosa svojih genov na naslednjo generacijo.
- Parjenje pri domačih živalih je v veliki meri odvisno od strani človeka izbranih kombinacij – nenaključno parjenje.

554

Izborno parjenje

- Ljudje se redko pariyo naključno – izbirajo sorodne, vsečne fenotipe (glede na velikost, starost, narodno pripadnost). To imenujemo izborno parjenje.
- Parjenje znotraj sorodstva predstavlja posebno obliko izbornega parjenja. Čim bližje je sorodstvo, več alelov je enakih, večja je stopnja **inbridginga (sokrvnosti)**. Sokrvnost lahko spremeni genetski pol, zaradi večje stopnje homozigotnosti v populaciji pride tudi do homozigotnosti škodljivih recesivnih alelov – izraženo pri potomcih.
- Mnoge vrste imajo mehanizme, ki onemogočajo sokrvo parjenje. Pri rastlinah obstaja pojav lastna-nekompatibilnost, kjer rastlina ne more oploditi sama sebe, tudi če ima moške in ženske zasno ve.
- Mišji samec uporablja vonjave za ločevanje sorodnikov pri izbiri partnerjev.
 - Pri miši te vonjave kontrolira alel **MHC** (major histocompatibility complex);
 - Detektira ga **vomerona zalni organ (VNO)**.

555

Naravna selekcija

- Če imajo posamezniki določene gene, ki določajo boljšo možnost preživetja zrelih potomcev, kot tistih potomcev, ki tega gena nimajo, potem naraste frekvenca tega gena v populaciji. To pojasnjuje teorijo Darwinovega naravnega izbora – glede na spremembo frekvenc genov v populaciji.
- Naravna selekcija nastane zaradi:
 - Razlik v smrtnosti in/ali
 - Razlik v povečani reproduktivni sposobnosti.

556

Selekcija zaradi mortalnosti (umrljivosti)

- Nekateri genotipi so manj uspešni v primerjavi z drugimi pri preživetju skozi reproduktivno obdobje do konca reproduktivnega obdobja.
- Evolucijski vpliv selekcije zaradi umrljivosti je opazen kadarkoli – od oblikovanje nove zigote do konca reproduktivnega obdobja.
- Umrljivost / Preživetje.
- Praskavec pri ovcah, osebek z genotipom **VRQ/VRQ** gena za prionski protein (*Prnp*) je bolj dovzeten na obolenje, kot genotip **ARR/ARR**. Z naravno in umetno selekcijo izbiramo **ARR/ARR** genotip.

557

Selekcija zaradi rodovitnosti

- Nekateri fenotipi (torej genotipi) lahko naredijo večji prispevek k deležu genov v populaciji zaradi izredno povečane rodnosti – več osebkov z določenimi geni.
- Velikost gnezda/potomstva/družine.
- Po Darwinovi teoriji so taki osebk bolj primerni za preživetje, doprineajo večji delež genov k populaciji – posledično – postopno spreminjanje frekvence genov.

558

Razmerje med gostiteljem, parazitom, patogenom

Interakcije
Rezistenca

559

- Paraziti, patogeni organizmi – povzročajo velike gospodarske škode
- Pomembno je poznavanje delovanja parazitov in gostiteljev ter njihove interakcije.
- Posledice človekovega vmešavanja v odnos med gostiteljem in parazitom

560

Miksomatoza pri kuncih

- 1859 je Anglež, ki je živel v Avstraliji, uvozil kunce iz Anglije v Avstralijo (24 divjih kuncev), da bi s tem popestril lovske pogoje v Avstraliji.
- Kunci so se zelo razmnožili v Avstraliji,
 - ogrozili pašno idilo Avstralije
 - Škode na rastlinah
 - izpodrinili mnogo avtohtonih vrst živali
 - Erozija površin
 - Škode pri poljedelskih pridelkih

561

- Organizirani začetki zatiranja kuncev v Avstraliji – 1901 leta
 - Noben poskus zmanjševanja populacije kuncev ni trajno rešil problema
 - 1918 je Aragao predlagal uporabo miksoma virusa v okolje
 - 1950 - CSIRO (Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation) je sprostil v okolje virulentni miksoma virus, ki povzroča miksomatozo pri evropskih kuncih.
 - virulenca - stopnja patogenosti mikroorganizma:
 - virulenca mikroorganizma - zmožnost mikroorganizma povzročiti nalezljivo bolezen

Miksoma virus (MV)

- Prvič opisan 1896 v Južni Ameriki kot povzročitelj letalne infekcije uvoženih evropskih kuncev (*Oryctolagus cuniculus*).
- Kasneje ugotovljeno, da je naravni patogen brazilskega kunca (*Sylvilagus brasiliensis*), pri katerih povzroča le benigno infekcijo – kožni fibrom omejen le na mesto inokulacije.
- Pri evropskih kuncih – skoraj 100-odstotna smrtnost. Okvara različnih organov, oslabljen imunski sistem in sekundarne bakterijske infekcije respiratornega trakta. Zgodnji klinični znaki – otekanje smrčka, anogenitalne regije, blefarokonjunktivitis.
- Dovzetni tudi evropski zajec (*Lepus europeus*).

- a) 10 dni po infekciji z virusom SLS (standardni laboratorijski sev9 (evropski kunec)
- b) tri tedne po infekciji (brazilski kunec)



Genom MV

- Družina poksvirusov
- Linearna dvoverižna molekula DNA, zanke lasnice na koncih kromosoma,
- DNA se ne vgradi v genom gostitelja
- Veliki virus, viden s svetlobnim mikroskopom
- Velikost genoma 161,8 kpb
- Kodira 171 genov,
- produkti genov modulirajo imunski sistem gostitelja, omogočajo preživetje virusa v gostitelju – inhibitorji protivirusnega sistema gostiteljske celice, produkti preprečujejo smrt inficirane celice, zavirajo vnetne procese v gostitelju.

MV in kunci v Avstraliji 1950

- Kunci, ki do takrat še nikoli niso prišli v kontakt z miksoma virusom, so bili zelo dovzetni za miksomatozo.
- Skoraj 100-odstotna smrtnost obolelih kuncev
- Kombinacija visoko dovzetnih kuncev in visoko virulentnega virusa je na začetku dala dobre rezultate glede zniževanja populacije kuncev.

Vendar

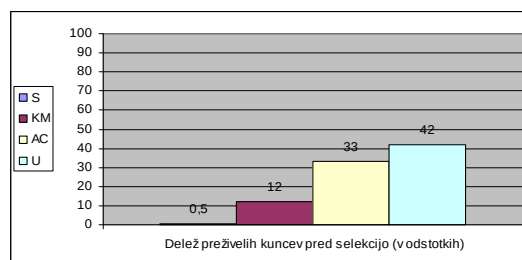
- Smrt velikega števila kuncev – zelo močna selekcija na odporne kunce
- Različni genotipi so različno dovzetni na miksomatozo.
- Živali z nižjo dovzetnostjo so v času miksomatoze imele možnost preživetja in razmnoževanja – prenašanja in širjenja genov "odpornosti" na miksomatozo.
- Pri kuncih – **selekcija manj dovzetnih kuncev.**

566

- Enako pri virusu.
 - Različni genotipi so bili različno virulentni.
 - Ali pa so se z mutacijo razvili manj virulentni virusi.
 - Kunci s slabše virulentnimi virusi so preživel dalj časa – večja možnost preživetja in razmnoževanja manj virulentnih virusov v organizmih kuncev – **selekcija na manj virulentne viruse.**
- Razvile so se vrste različno dovzetnih kuncev in vrste (sevi) različno virulentnih virusov.
- Hiter padec populacije kuncev iz ocenjenih 600.000 živali na 100.000 v dveh letih.

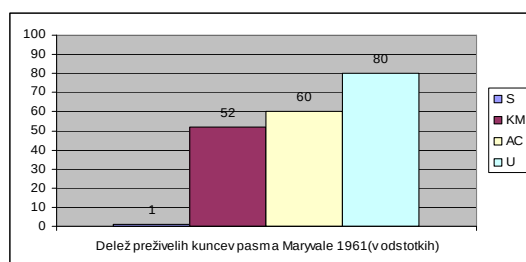
567

Delež preživetja kuncev ob prvem srečanju z infektom - pri izpostavljenosti različnim sevom virusa (različna virulenca virusa)



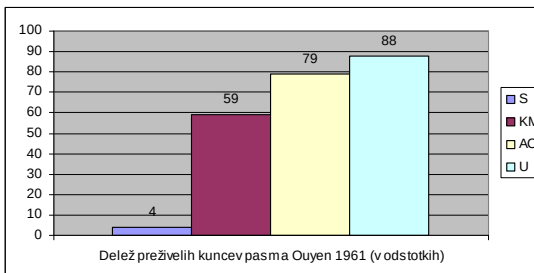
568

Delež preživetja kuncev pasme Maryvale leta 1961 pri izpostavljenosti različnim sevom virusa



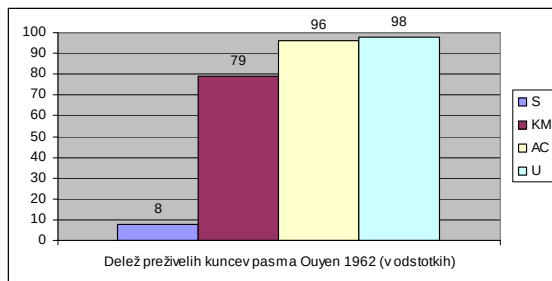
569

Delež preživetja kuncev pasme Ouyen leta 1961 pri izpostavljenosti različnim sevom virusa



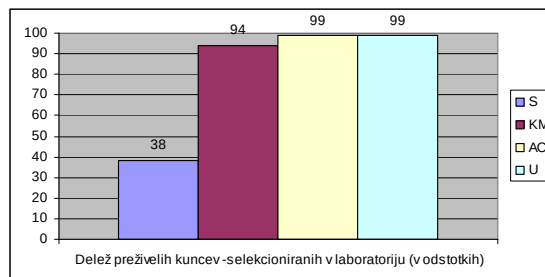
570

Delež preživetja kuncev pasme Ouyen leta 1962 pri izpostavljenosti različnim sevom virusa



571

Delež preživetja kuncev, selekcioniranih v laboratoriju pri izpostavljenosti različnim sevom virusa



572

- 1952 se je mixoma virus zaradi naključnega/nelegalnega prenosa iz laboratorijsko okuženih živali prenesel v naravo v Franciji
- 1954 – populacija divjih kuncev v Franciji se je zmanjšala za 90-odstotkov.
- Širjenje po Evropi
- 1955 – 95-odstotkov populacije kuncev v GB okužene.

- Razvoj novih – virulentnih virusov v laboratoriju
- Sproščanje novih virusov v okolje – kalicivirusov, – kmalu se je razvila rezistenca na nove viruse – enak proces, kot se pri sproščanju naravnega virusa, ki povzroča hemoragično diarejo kuncev.
- Dinamična interakcija med gostiteljem in parazitom – vzpostavlja se uravnovešeno razmerje med obema.
- Človek s posegom v naravo ta razmerja lahko poruši – običajno se po začetnem dramatičnem učinku ponovno vzpostavi razmerje.

574

- Raziskovalci ocenjujejo, da je bil program preprečevanja prevelike populacije kuncev v Avstraliji uspešen in se še vedno odvija – mora biti pod nadzorom.
- Raziskovalci CSIR so pripravili nov rekombinantni virus, ki vsebuje gene za sterilizacijo kuncev.
- 1995 je virus pobegnil iz zaprtih sistemov v okolje.
- Nekaj kmetov iz Nove Zelandije je prepeljalo miksoma virus v Novo Zelandijo – bolezen se širi.
- Pred začetkom izvedbe vnosa neke populacije v za ta organizem tuje okolje, se je potrebno zavedati mnogih predvidljivih posledic in vedeti, da bo prišlo tudi do nepredvidljivih posledic.

575

Praskavec (praskavica) pri ovcah

- Praskavec – bolezen pri ovcah, spada v skupino prenosljivih spongiformnih encefalopatij (BSE pri govedu, kuru pri človeku).
- Klinični znaki bolezni:
 - Nekoordinirana hoja,
 - Škripanje z zobmi
 - Drgnjenje ob trde predmete – praskanje
 - Smrt nekaj tednov po začetku kliničnih znakov.
- Povzročitelj – prionski protein. Prenosljiva bolezen – prenos infekta – priona z živali na žival.
 - Prioni so zelo odporni na fizikalne in kemijske agense,
 - zelo dolga inkubacijska doba.

576

Poskus – določanje inkubacijske dobe praskavca pri ovcah

- Injiciranje homogenata možganov obolelih ovc v 294 zdravih ovc
- Opazovanje kliničnih znakov
 - Prve živali so obolele po 93 dnevih
 - 123 živali je zbolelo do 356 dneva
 - 156 živali je zbolelo do 495 dneva
 - Med 870. in 1049. dnevom je zbolelo še 30 živali.
- Ovce lahko razdelimo na:
 - skupino živali s kratko inkubacijsko dobo (od 93 do 356 dneva)
 - in skupino živali z dolgo inkubacijsko dobo (od 870 dni do 1049 dni)
- Nekaj živali sploh ni obolelo –
 - mogoče so te živali odporne
 - ali pa je inkubacija daljša od življenjske dobe živali (vprašanje karanten pri uvozu živali)

577

- Dovzetnost na praskavec je določena z genotipom.
 - Poznani so trije najpomembnejši polimorfizmi gena za prionski protein (*PrnP*), ki modulirajo dovzetnost ovc na praskavec.
 - Nahajajo se na kodonih 136, 154 in 171.
 - Najbolj dovzetne na praskavec so živali z genotipom VRQ/VRQ, odporne naj bi bile ARR/ARR živali.
- Pojavljajo se vedno nove oblike bolezni in novi polimorfizmi *Prnp*.
- Atipična oblika praskavca se pojavlja tudi pri ovcah z genotipom ARR/ARR.

578

Odpornost (rezistenca) gostiteljev na parazite

Parazit	Gostitelj	Parazit	Gostitelj	Parazit	Gostitelj
Protozoi		Trkulje		Valjasti črvi	
<i>Trypanosoma vivax</i>	Govedo	<i>Echinococcus multilocularis</i>	Miš	<i>Ascaridia galli</i>	Perutnina
<i>Trypanosoma brucei</i>	Miš	<i>Taenia taeniaeformis</i>	Miš, podgana	<i>Cooperia oncophora</i>	Ovca
<i>Eimeria tenella</i>	Perutnina	<i>Hymenolepis nana</i>	Miš	<i>Haemoncus contortus</i>	Ovca, koza
<i>Plasmodium vivax</i>	Človek			<i>Ascaris suum</i>	Prašič
<i>Trypanosoma congolense</i>	Govedo			<i>Trichostrongylus axei</i>	Miš

579

Odpornost na neonatalno diarejo pri pujskih

- Najpogostejši povzročitelj neonatalne diareje pri pujskih je sev *E. coli*, ki ima na površini celice antigen K88.
 - diareja - pogosto iztrebljanje tekočega fecesa; sin. diarrhoea, driska
- Obolijo pujski, ki imajo v steni črevesja specifični receptor, ki veže nase antigen K88 in s tem bakterijo *E. coli*. Ko se bakterija pripne na steno črevesja, proliferira in proizvaja enterotoksin, ki povzroča driskavost – do 90-odstotna smrtnost pri pujskih.

580

- Odpornost na neonatalno diarejo je torej definirana z navzočnostjo proteina (receptorja) v steni črevesja. Ta protein kodira dominantni avtosomalni gen.
- Gen se pojavlja v dveh alelih,
 - en določa navzočnost proteina – dovzetnost (homozigotni ali heterozigoti za gen *S*),
 - pri drugem alelu (recesivnem) tega proteina ni – odpornost na neonatalno diarejo pri pujskih (homozigot za gen *s*).
- Nekateri sevi *E. coli* nimajo antigena K88 – se ne morejo pripeti na steno črevesja – tudi ne povzročajo bolezni (ne-virulentni sevi).

581

Odpornost na valjaste črve pri ovcah

- Obstajajo precejšnje razlike v odpornosti različnih pasem na valjaste črve.
- Verjetno gre za razlike v genetski zasnovi.
- Mogoče gre za neko obliko hemoglobina – ki povzroča odpornost na valjaste črve. Črvi se hranijo s krvjo, ki jo sesajo v steni črevesa.
- Lahko uporabljamo za selekcijske programe.

582

Odpornost na klope pri govedu

- *Bos indicus* (zebu govedo) je bolj odporno na klope kot *Bos taurus*, kadar jih gojimo pod enakimi pogoji.
- Križanci med zebu govedom in britanskimi pasmami so 40-odstotno manj dovzetni na klope kot čiste britanske pasme.
- Dednost odpornosti na klope je visoka (80-odstotna), zato je upravičena selekcija na nedovzetne živali.
- S selekcijo so pripravili križance – nove pasme, primerne za tropske razmere.

583

Rezistenca pri parazitih in patogenih organizmih

584

Rezistenca na insekticide pri mesarski muhi

- Avstralska mesarska muha (*Lucilia cuprina*) pri ovcah
- Izvira v Afriki, razširila se je na Azijo in Avstralijo, kjer predstavlja enega izmed najpomembnejših škodljivcev izmed vrst insektov.
- Povzroča ekonomske škode zaradi izgub pri proizvodnji volne.



585

Mesarska muha in ovce

- Samica leže jajčeca na ovce v zaščitena območja, onesnažena s fecesom in urinom (pod rep).
- Jajčeca leže na žive živali (evropska domača muha leže jajčeca praviloma na ne-živ material).
- Razvoj od jajčeca do muhe traja 7 dni.
- Larve natrgajo volno, poškodujejo kožo (laceracija – natrganje).
- Na poškodovano tkivo se lahko naselijo bakterije – gnitje, možna bakterijska infekcija, sepsa. Poleg poškodb volne so možne tudi različne oblike oslavitve živali, tudi smrt živali.
- Prenašalec (vektor) povzročiteljev bolezni
 - antraksa – vranični prisad (*Bacillus anthracis*)
 - povzročiteljev gastroenteritisa – predvsem v okoljih z neurejenimi sanitarnimi pogoji

586

Zatiranje muh z insekticidi

Predvidljiv odziv insektov na insekticide.

- 1955 – uporaba organoklorina **dieldrina** – na začetku zelo učinkovit insekticid
 - po treh letih se je razvila rezistenca.
- 1955 – uporaba organoklorina **aldrina** – na začetku zelo učinkovit insekticid
 - po treh letih se je razvila rezistenca.
- 1958 – uporaba organofosfata **diazinona**
 - po sedmih letih se je razvila rezistenca.
- 1967 – uporaba snovi s podobnim delovanjem, kot ga imajo organofosfati – **butakarb**
 - po nekaj mesecih se je razvila rezistenca.
- Uporabili so še več različnih insekticidov, vedno se je pojavljal podoben učinek, na začetku dobra učinkovitost insekticida, kasneje se je razvila rezistenca muh na insekticid.

587

- Insekti postanejo odporni na kemikalije zaradi **močne naravne selekcije, ki favorizira razmnoževanje genov, ki določajo odpornost na kemikalije** vsaj na enem lokusu.
- Ti aleli za odpornost običajno kodirajo
 - nek encim, ki je v organizmu sposoben detoksicirati insekticid
 - ali pa variantno obliko encima, na katerega deluje insekticid, ki deluje tudi v prisotnosti insekticida
 - neko črpalko, ki insekticid izloči iz organizma
 - ali drug mehanizem, na katerega insekticid ne deluje.
- Pred vnosa insekticida so ti aleli prisotni v populaciji le v manjšem deležu. Vnos insekticida vpliva na preživetje rezistentnih insektov
 - razmerje alelov SS, SR, RR v prid RR.

588

- Raziskovalci so ugotovili položaj dveh lokusov pri mesarski muhi, ki nosita gene (alele) za rezistenco na organofosfate,
 - en na kromosomu 4, drug na kromosomu 6
 - zelo visoka frekvenca alelov za rezistenco v populaciji muh – 0,98 do 1.
- Poleg genov (alelov) za rezistenco sodelujejo pri razvoju mehanizma odpornosti na insekticid tudi drugi geni, ki rahlo modificirajo delovanje encimov v organizmu. Tudi frekvenca teh genov se premika z uporabo insekticidov – s selekcijo, z razvojem rezistence na insekticid.
- Lep primer osnov, ki veljajo v populacijski genetiki.

589

- Posledica široke uporabe insekticidov je, da se selekcionirajo insekti, odporni na insekticide v uporabi.
- Bolj učinkovit je insekticid, hitreje se razvije odpornost – z močno selekcijo na odporne insekte.

590

- Razvoj stranske odpornosti – kadar je organizem odporen na več sorodnih skupin insekticidov
- Enako velja za razvoj odpornosti na druge insekte/parazite:
 - Raziskave odpornosti na klope
 - Raziskave odpornosti na valjaste gliste

591

Odpornost na antibiotike pri bakterijah

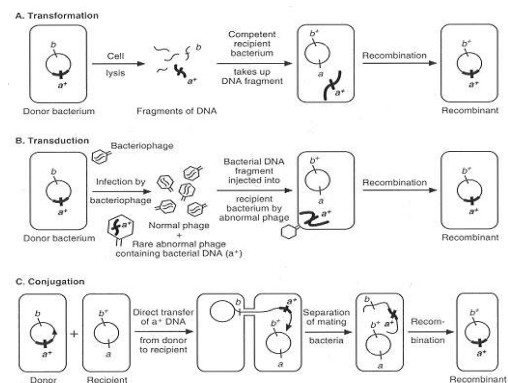
- **antibiotik** - naravni produkt mikroorganizmov ali naravnemu produktu enaka sintetična ali podobna polysintetična spojina, ki zavira razmnoževanje drugih mikroorganizmov ali jih ubija in se uporablja za zdravljenje;
- Široka uporaba penicilina – razširili so se sevi odpornih bakterij
- Uporaba več antibiotikov – razširili so se sevi bakterij, odpornih na več različnih antibiotikov
- Odpornost na antibiotike se je razširila še hitreje in obsegala je še večja področja, kot bi lahko predvidevali glede na mehanizem premika frekvence genov za rezistenco, ki nastane zaradi **selekcije – vertikalni prenos rezistentnih** genov od staršev na potomce.
- Pri prokariotih se pojavlja tudi **horizontalni prenos genov**, ki določajo odpornost na antibiotike (znotraj generacije – med osebki).

592

Horizontalni prenos genov pri prokariotih

- Transformacija – molekula DNA se sprosti iz bakterijske celice, druga bakterijska celica jo prevzame v svojo celico in jo vgradi v genom.
- Transdukcija – prehod molekule DNA v drugo bakterijsko celico z bakteriofagom
- Konjugacija – prenos molekule DNA po konjugacijski cevki iz ene bakterijske celice v drugo – prenos plazmida. Geni za rezistenco (faktor, alel R) so običajno na plazmidih.
- Vsi trije postopki so možni pri prenosu genov (za rezistenco) iz ene bakterije v drugo – najpogostejše verjetno nastane zaradi procesa konjugacije.

593



594

Raziskava (Smith et al): prenos rezistence (alela R) pri piščancih

- V vodo za pitje so dodali donatorske
 - celice *E. coli*, ki so imele alel R,
 - sev celic *E. coli* brez alela R,
 - sev celic *Salmonella typhimurium* brez alela R.
- Pri piščancih, ki so pili to vodo, so čez čas našli vse tri bakterijske seve z alelom R.
- Če je bil v krmi piščancev uporabljen tudi antibiotik, se je rezistenca pojavila še hitreje in v močnejši obliki – dodatni vpliv selekcije.

595

- Pomen horizontalnega prenosa odpornosti – v naravi so lahko rezervoarji bakterijskih celic s plazmidom za rezistenco – prenos na druge bakterije (patogene).

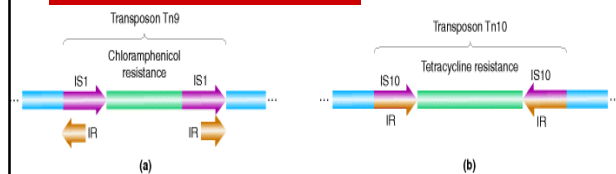
596

Primerjava plazmidov, izoliranih iz ljudi in govedi na isti kmetiji

- **Horizontal Transfer of a Multi-Drug Resistance Plasmid between Coliform Bacteria of Human and Bovine Origin in a Farm Environment**
- **Hanne Oppegaard, Terje M. Steinum, and Yngvild Wasteson** Department of Pharmacology, Microbiology, and Food Hygiene, The Norwegian School of Veterinary Science, N-0033 Oslo, Norway
- Applied and Environmental Microbiology, August 2001, p. 3732-3734, Vol. 67, No. 8

597

Plazmidi, ki nosijo gene, ki določajo odpornost na več antibiotikov – običajno se prenašajo s transpozoni



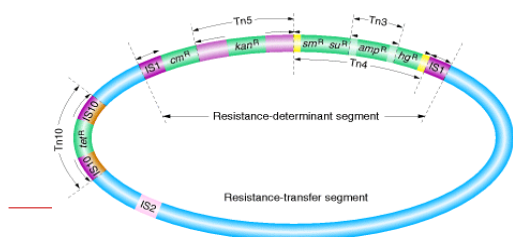
598

Transpozicija

- Prenos delca kromosoma iz enega položaja genoma na drug položaj.
- Prenese se del gena, en gen, skupek vezanih genov – genetski element.
- **transpozicijski genetski elementi** (kasete, skakajoči geni, potepuški geni, mobilni geni, mobilni genetski elementi, transpozoni) – odsek molekule DNA, ki se premika iz enega mesta v genomu na drugo mesto znotraj istega kromosoma ali med različnimi kromosomi

599

Vloga transpozicijskih elementov pri evoluciji plazmidov, ki nosijo rezistenco na več antibiotikov – shematska slika plazmida z več geni za rezistenco. Plazmid je nastal z združevanjem segmentov genoma, ki determinirajo rezistenco in segmentov genoma, ki determinirajo prenašanje genov znotraj genoma (insercijski elementi - IS). Geni, ki kodirajo odpornost na antibiotike kloramfenikol (*cmR*), kanamicin (*kanR*), streptomycin (*smR*), sulfonamid (*suR*), ampicilin (*ampR*) in živo srebro (*HgR*). Transpozon Tn3 je znotraj transpozona Tn4. Vsak transpozon lahko neodvisno preskakuje v drug kromosom (genom). Ali pa skupaj.



500

- Transpozoni lahko preskakujejo:
 - znotraj genoma,
 - med bakteriofagi.
- Plazmid, ki nosi rezistenco na več antibiotikov je le plazmid, ki ima več transpozonov z insercijskimi sekvencami in znotraj teh zaporedje gena, ki kodira rezistenco.

601

- **Transpozicija** – nastajanje plazmidov, ki nosijo rezistenco na več antibiotikov
- in **prenosi plazmidov** med bakterijami (transformacija, transdukcija, konjugacija)
- ter **široka uporaba antibiotikov** in s tem selekcija rezistentnih bakterij,
- predstavljajo veliko nevarnost pri širjenju rezistence med različnimi bakterijami.
- Potrebna racionalna uporaba antibiotikov.

602

- Rezistenca na antibiotike predstavlja problem v:
 - humani medicini
 - veterinarski medicini
 - bolj upravičena uporaba antibiotikov pri farskih živalih
 - bolj učinkovito preventivno zdravljenje pri farskih živalih
 - živinoreji

603

- Nekateri sevi patogenih bakterij, ki trenutno predstavljajo problem zaradi rezistence na antibiotike v svetovnem merilu:
- Na vancomycin-rezistentni *Enterococcus*.
- na več antibiotikov-rezistentna bakterija *Mycobacterium tuberculosis* (MDR-TB).
- na več antibiotikov-rezistentna bakterija *Pseudomonas aeruginosa*.
- Na meticilin odporni *Staphylococcus aureus*(MRSA).

604

Rekombinantna genetika

Osnove
Metodologija
Uporabnost

605

- 1869 **Miescher** izolira DNA iz belih krvničk iz pivojev, s katerimi so bile povite gnojne rane.
- 1944 **Avery** zagotovi dokaz, da je molekula DNA tista, ki nosi dedno informacijo med procesom transformacije bakterij.
- 1953 **Watson in Crick** na osnovi rezultatov x-žarkov Franklinove in Wilkinsona predlagata model strukture molekule DNA v obliki dvojne vijalice.
- 1955 **Kornberg** odkrije encim polimerazo DNA, ki ga uporabljamo za proizvodnjo označenih sond DNA.

606

-
- 1961 **Marmur in Doty** odkrijeta sposobnost renaturacije DNA, kar omogoča specifično reakcijo hibridizacije nukleinskih kislin.
- 1962 **Arber** zagotovi prve dokaze za obstoj restrikcijskih DNA-nukleaz, kar **Nathansu** in **Smithu** omogoči njihovo izolacijo in uporabo za ugotavljanje zaporedij DNA.
- 1966 **Nirenberg, Ochoa** in **Khorana** razvozljajo genetski kod.
- 1967 **Gellert** odkrije encim ligazo DNA, ki združuje fragmente DNA.
-

-
- 1972-1973 raziskovalci **Boyer, Cohen, Berg s sodelavci** razvijejo tehnike kloniranja DNA v laboratorijih (Stanford University in University of California v San Franciscu).
- 1975 **Southern** razvije hibridizacijo nukleinskih kislin, osnovano na prenosu z gela na membrano in označevanje s specifičnimi sondami – za ugotavljanje specifičnih zaporedij DNA.
- 1975-1977 **Sanger** in **Barrell** ter **Maxam** in **Gilbert** razvijejo metode za hitro ugotavljanje nukleotidnih zaporedij DNA.
- 1981-1982 **Palmiter** in **Brinster** izdelata transgeno miš; **Spradling** in **Rubin** izdelata transgeno vinsko mušico.
-

-
- 1982 Los Alamos National Laboratory ustanovi javno bazo zaporedij genov - **GenBank** - javna baza podatkov NIH.
- 1985 **Mullis** in sodelavci razvijejo verižno reakcijo s polimerazo (polymerase chain reaction (PCR)).
- 1987 **Capecchi** in **Smithies** vpeljeta metode za izvajanje ciljane zamenjave genov v zarodnih celicah miši.
- 1989 **Olson** s sodelavci opiše z zaporedji označena mesta (sequence-tagged sites), edinstvene pasove DNA, ki se uporabljajo za izdelavo fizičnih kart humanega kromosoma.
-

-
- 1990 **Lipman** in sodelavci razvijejo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), algoritem, ki se uporablja za iskanje homologij med zaporedji DNA in med zaporedji proteinov.
- 1990 **Simon** in sodelavci ugotovijo, kako učinkovito uporabiti bakterijski umetni kromosom (artificial chromosome - BAC) za prenos velikih fragmentov kloniranih humanih DNA za ugotavljanje nukleotidnih zaporedij.
- 1991 **Hood** in **Hunkapillar** uvedeta novo metodo avtomatizirane tehnologije določanja nukleotidnih zaporedij DNA.
- 1995 **Venter** in sodelavci sekvenirajo prvi celotni genom organizma – genom bakterije *Haemophilus influenzae*.
-

610

-
- 1996 **Goffeau** in mednarodni konzorcij razglasijo sekveniranje prvega genoma evkariontskega organizma – kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*.
- 1996-1997 **Lockhart** s sodelavci in **Brown** in **DeRisi** izdelajo DNA-mikročipe, ki omogočajo simultano sledenje tisočeri genov.
- 1998 **Sulston** in **Waterston** s sodelavci izdelajo prvo celotno nukleotidno zaporedje večceličnega organizma - nematode črva *Caenorhabditis elegans*.
- 2001 Konzorcij raziskovalcev razglasi zaključen osnutek zaporedij genoma človeka.
-

Funkcije nukleinskih kislin

- **Replikacija**, podvojevanje DNA
 - Potrebujemo: vzorec sinteze, oligonukleotidni začetnik sinteze, gradbene elemente, polimerazo DNA in primerno okolje
 - **Transkripcija**, prepis RNA
 - Potrebujemo: vzorec prepisovanja, promotor prepisovanja, gradbene elemente, polimerazo RNA, primerno okolje
 - **Translacija**- prevod v proteine
 - **Regulacija transkripcije**
 - Potrebujemo: *cis*- in *trans*- regulatorne elemente in sistem za transkripcijo
-

612

Manipuliranje z nukleinskimi kislinami

- DNA bakterij je enak kot DNA virusov, evkariontov.
- Katerokoli zaporedje DNA lahko prenesemo v genetski material drugega organizma (rekombinacija).
- Skoraj vse, kar naredi celica, lahko naredimo v laboratoriju v epruveti.
- Molekularno kloniranje – kloniranje genov (zaporedij DNA): tvorba velikega števila identičnih kopij enega gena, ki nastanejo s podvojevanjem tega gena, ko smo ga vnesli v gostiteljsko celico.
- Potrebujemo:
 - nukleinsko kislino
 - izolacija DNA
 - izolacija RNA
 - vektor
 - modifikacijske encime

613

Osnovni elementi za rekombinacijo DNA

- Zaporedje DNA, ki ga želimo pomnožiti ali rekombinirati.
- Modifikacijske encime – za modificiranje nukleinskih kislin.
- Vektor – prenašalec tega zaporedja z regulatornimi elementi za replikacijo in transkripcijo (replikon).
- Gostiteljska celica, v kateri se bo rekombinantni vektor pomnoževal in omogočal prepis in prevod vstavljenega delca DNA.

614

Izolacija nukleinskih kislin

- DNA
 - Relativno stabilna
 - Občutljiva na strižne sile
 - Občutljiva na razgradnjo z encimom deoksiribonukleazo (DNazo)
- Izolacija DNA
 - Sterilni odvzem vzorca
 - Encimatska razgradnja celic s proteinazo K
 - Raztapljanje celične membrane z detergenti
 - Razgradnja RNA z ribonukleazo (RNazo)
 - Tretiranje s fenolom, ki denaturira proteine
 - Centrifugiranje: vodna faza vsebuje DNA, fenol vsebuje proteine
 - Ob dodatku alkohola in amonijevega acetata DNA precipitira
 - Centrifugiramo, supernatant odlijemo, dobimo DNA
 - Rastopimo v vodi, hranimo pri 4°C ali -20°C.

615

Izolacija RNA

- RNA je krajša molekula, manj občutljiva na strižne sile
- Zelo občutljiva RNaze
- Postopek za izolacijo celotne RNA (tRNA, rRNA, mRNA)
 - Zelo podoben kot za izolacijo DNA
 - DNA razgradimo z DNazo.

616

Modifikacijski encimi

- Encimi, ki jih uporabljamo za spreminjanje DNA ali RNA v postopkih genske tehnologije
 - Restriksijske endonukleaze
 - Ribonukleaze - RNaze
 - Dezoksiribonukleaze – Dnaze
 - Polimeraza DNA
 - Polimeraza RNA
 - Ligaza
 - Reverzna transkriptaza
 - Ipd.

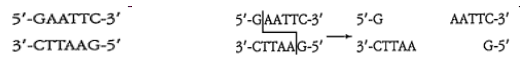
617

Restriksijski encimi – restriksijske endonukleaze

- Sintetizirajo jih bakterije
- Obrambni mehanizem bakterij
- Razpoznajo specifična nukleotidna zaporedja pri tuji molekuli DNA in znotraj tega zaporedja režejo molekulo DNA
- Endonukleaza razcepi fosfodiesterko vez v dvoverižni molekuli DNA
- Dvojno verigo DNA režejo na dveh mestih, na koncu molekule DNA tvorijo enoverižne repe iz 2 – 5 baz, ki se prilegajo (kohezivni, lepljivi, štrleči konci)
- Nekateri režejo dvojno verigo DNA ravno – nastanejo topi konci
- Poznamo okoli 1000 različnih restriksijskih endonukleaz

- Mnogo restrikcijskih encimov je komercialno dostopnih
- Zelo pomembne za rekombinacijo različnih fragmentov DNA, za diagnostiko mutacij
- Ta nukleotidna zaporedja so pri domači celici zaščitena – metilirana.
- Specifična nukleotidna zaporedja so postavljena v palindrom

■ Primer: *EcoRI*



619

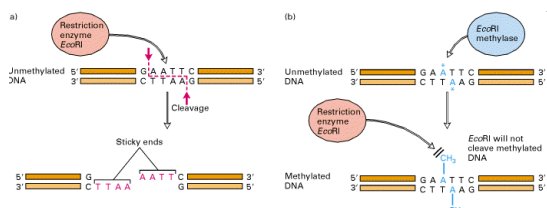
Specifično razpoznavanje, rezanje in modifikacija položajev nukleotidnih zaporedij za posamezne restrikcijske endonukleaze

Enzyme	Source organism	Restriction site in double-stranded DNA
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i>	$ \begin{array}{c} \text{5' } \text{G} \text{A} \text{A} \text{T} \text{T} \text{C} \text{ } \text{3' } \\ \text{3' } \text{C} \text{T} \text{T} \text{A} \text{A} \text{G} \text{ } \text{5' } \end{array} $
<i>EcoRII</i>	<i>E. coli</i>	$ \begin{array}{c} \text{5' } \text{G} \text{A} \text{A} \text{T} \text{T} \text{C} \text{ } \text{3' } \\ \text{3' } \text{C} \text{T} \text{T} \text{A} \text{A} \text{G} \text{ } \text{5' } \end{array} $
<i>HindIII</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	$ \begin{array}{c} \text{5' } \text{G} \text{A} \text{A} \text{T} \text{T} \text{C} \text{ } \text{3' } \\ \text{3' } \text{C} \text{T} \text{T} \text{A} \text{A} \text{G} \text{ } \text{5' } \end{array} $
<i>HindIII</i>	<i>H. influenzae</i>	$ \begin{array}{c} \text{5' } \text{G} \text{A} \text{A} \text{T} \text{T} \text{C} \text{ } \text{3' } \\ \text{3' } \text{C} \text{T} \text{T} \text{A} \text{A} \text{G} \text{ } \text{5' } \end{array} $
<i>HaeIII</i>	<i>H. aegyptius</i>	$ \begin{array}{c} \text{5' } \text{G} \text{A} \text{A} \text{T} \text{T} \text{C} \text{ } \text{3' } \\ \text{3' } \text{C} \text{T} \text{T} \text{A} \text{A} \text{G} \text{ } \text{5' } \end{array} $
<i>HpaII</i>	<i>H. parainfluenzae</i>	$ \begin{array}{c} \text{5' } \text{G} \text{A} \text{A} \text{T} \text{T} \text{C} \text{ } \text{3' } \\ \text{3' } \text{C} \text{T} \text{T} \text{A} \text{A} \text{G} \text{ } \text{5' } \end{array} $
<i>PstI</i>	<i>Providencia stuartii</i>	$ \begin{array}{c} \text{5' } \text{G} \text{A} \text{A} \text{T} \text{T} \text{C} \text{ } \text{3' } \\ \text{3' } \text{C} \text{T} \text{T} \text{A} \text{A} \text{G} \text{ } \text{5' } \end{array} $
<i>SmaI</i>	<i>Serratia marcescens</i>	$ \begin{array}{c} \text{5' } \text{G} \text{A} \text{A} \text{T} \text{T} \text{C} \text{ } \text{3' } \\ \text{3' } \text{C} \text{T} \text{T} \text{A} \text{A} \text{G} \text{ } \text{5' } \end{array} $
<i>BamI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	$ \begin{array}{c} \text{5' } \text{G} \text{A} \text{A} \text{T} \text{T} \text{C} \text{ } \text{3' } \\ \text{3' } \text{C} \text{T} \text{T} \text{A} \text{A} \text{G} \text{ } \text{5' } \end{array} $
<i>BglII</i>	<i>B. globigii</i>	$ \begin{array}{c} \text{5' } \text{G} \text{A} \text{A} \text{T} \text{T} \text{C} \text{ } \text{3' } \\ \text{3' } \text{C} \text{T} \text{T} \text{A} \text{A} \text{G} \text{ } \text{5' } \end{array} $

NOTE: An asterisk (*) is commonly used to indicate methylation sites. But an "m" is used here to prevent confusion with radioactive labeling.

Razpoznavna mesta restrikcije so kratka zaporedja DNA, ki jih specifično razpoznajo restrikcijske endonukleaze

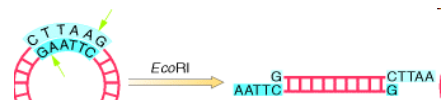
- (a) *EcoRI*, restrikcijski encim bakterije *E. coli*, naredi reze v 6 bp invertnem zaporedju nukleotidnih zaporedij. Nastanejo kratki enoverzni lepljivi konci.
- (b) Bakterijske celice imajo odgovarjajoča zaporedja metilirana na teh specifičnih razpoznavnih mestih (specifični encimi – metilaze – specifično metilira ta specifična zaporedja v genomu domače celice).



621

Linearizacija molekule z restrikcijsko endonukleazo

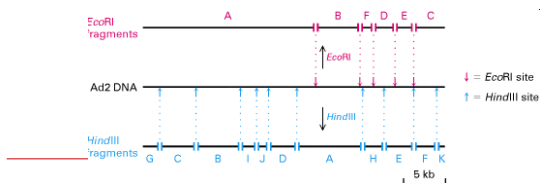
- Restrikcijska endonukleaza *EcoRI* reže krožno molekulo DNA, ki ima razpoznavno nukleotidno zaporedje na enem mestu v genomu – ga linearizira.



622

Izdelava restrikcijskih kart genoma

- Fragmenti, ki jih dobimo z rezanjem ≈36-kb DNA genoma adenovirusa 2 (Ad2) z restrikcijskimi encimi *EcoRI* in *HindIII* od bakterije *Haemophilus influenzae*.
- Digestija z *EcoRI* – dobimo 6 *EcoRI* fragmentov (6 x GAATTC v genomu)
- Digestija s *HindIII* – dobimo 11 fragmentov (AAGCTT) – vsi so drugačni kot pri *EcoRI*.
- Tehnika za ugotavljanje zaporedij DNA – za pripravo grobe karte nukleotidnih zaporedij. Takšne restrikcijske karte so enkratne za posamezne živalske vrste, tudi za posamezne organizme.

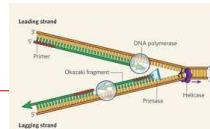


Modifikacijski encimi

- Eksonukleaze
 - RNaze – za razgradnjo verige RNA
 - DNaze – za razgradnjo verige DNA
- Nespecifične endoribonukleaze
 - RNaza H: reže hibride DNA : RNA
 - RNaza III: reže hibrid RNA : RNA

Modifikacijski encim

- Polimeraza DNA
 - polimerizacija:
 - oligonukleotidni začetnik sinteze,
 - gradbeni elementi – dATP-ji, dGTP-ji, dCTP-ji, TTP-ji
 - matrica DNA,
 - primeren pufer,
 - primerna temperatura = nova veriga DNA



Modifikacijski encim

- DNA-polimeraza *Taq*
 - Termostabilna polimeraza DNA

Modifikacijski encim

- RNA-polimeraze (T7, T3, SP6)
 - Spoznajo specifični promotor in sintetizirajo komplementarno RNA po matrici DNA
 - promotor sinteze,
 - gradbeni elementi - ATPji, GTPji, CTPji, UTPji
 - matrica DNA,
 - primeren pufer,
 - primerna temperatura = nova veriga DNA

627

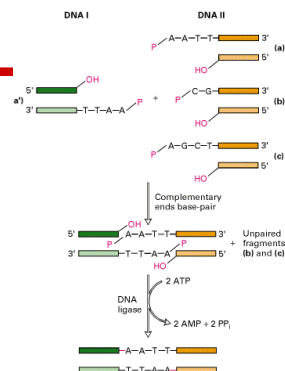
Modifikacijski encim

- Ligaza DNA T4
 - Katalizira nastanek fosfodiesterne vezi med sosednjima 3-hidroksilnim in 5-fosfatnim koncem verige DNA

Delovanje ligaze

Ligacija (vezanje) restrikcijskih fragmentov s komplementarnimi lepljivimi konci.

- *EcoRI* fragmenti molekule DNA I (levo) so pomešani z različnimi fragmenti, med njimi tudi z *EcoRI* iz molekule DNA II (desno)
- Komplementarni lepjivi konci se priležejo – vežejo jih vodikove vezi
- Sosednje 3-hidroksi in 5-fosfatne skupine prilegaajočih koncev kovalentno poveže DNA-ligaza T4. Uporabi se energija 1 molekule ATP.



Modifikacijski encim

- Reverzna transkriptaza
 - RNA prepisuje (nazaj) v DNA (komplementarna cDNA)
- Med delovanjem reverzne transkriptaze (RT) med prepisovanjem RNA v DNA pride do mnogo napak – nima sposobnosti preverjanja prepisovanja.
- To dopušča akumulacijo mutacij.
- Komercialno dosegljiva RT (proizvajalec Promega) ima stopnjo napak
 - ena na 17.000 bp za RT-AMV (aviarni virus mieloblastoze)
 - in ena na 30.000 za RT-M-MLV (Moloney-ev virus levkemije miši).

Klonirana Super Reverzna transkriptaza™ (Cloned AMV Reverse Transcriptase)

- Encim je prečiščen iz rekombinantnega vira.
- Klon izvira iz virusa aviarnе mieloblastoze (AMV).
- Dejavnost je primerljiva z naravno RT-AMV.
- Ima od RNA in DNA odvisno polimerazno delovanje in delovanje RNaze H.
- Njeno delovanje RNaze H zlično pri različnih temperaturah.
- Zelo stabilen, robusten in zelo aktiven encim.
- Deluje pri različnih temperaturah.

<http://www.youtube.com/watch?v=RO8MP3wMvqg>

- Od 1.45 min do 3 min

http://www.youtube.com/watch?v=h7V1eVwxV_c&feature=related

- Do 1.14 min

Vektorji za kloniranje

- Plazmid
 - molekula DNA, ki se v specifičnem gostitelju avtonomno pomnožuje, vsebuje mesto replikacije, mesta selekcije, mesto kloniranja – "polilinker". Velik 1,5 do 300 kbp.
- Fagni vektorji
 - Večinoma derivati faga λ , ki inficira *E. coli*
- Kozmidni vektorji
 - Sestavljeni iz dela plazmida (geni za replikacijo in selekcijo) in iz kohezivnih končev faga λ , ki omogočajo pakiranje v fagovo glavo. Vstop kozmida v celico – lastnosti faga, v celici se obnaša kot plazmid.
- Evkariontski ekspresivni vektor
 - Omogoča prepis vstavljenе DNA v evkariontski celici.
- Dvojni vektor (shuttle)
 - Replikacija v dveh taksonomsko oddaljenih gostiteljih.

633

Vektor za kloniranje - plazmid

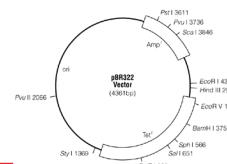
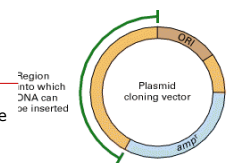
Diagram preprostega vektorja za kloniranje, izvira iz plazmida, krožne dvoveržne molekule DNA, ki se lahko replicira v bakteriji *E.coli*.

Plazmid je velik približno $\approx 1,2 \times 10^3$ kb in vsebuje **začetno mesto replikacije** (replication origin - ORI)

in **gen, ki omogoča selekcijo** – rezistenca na ampicilin (amp^r ; gen kodira encim β -laktamazo, ki inaktivira antibiotik ampicilin).

Vsebovati mora tudi **mesto, kamor vstavimo fragment DNA (polilinker)**. Fragment DNA je lahko kloniran v označen del plazmida, s tem ne inaktivira delovanja plazmida.

1977 – pBR322 (avtorja Bolivar in Rodriguez)

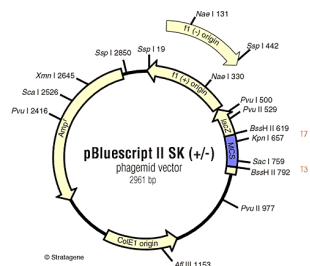


634

Plazmid pBluescript II

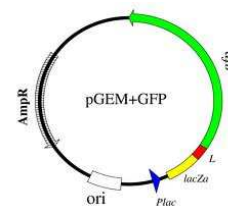
Vektor vsebuje

- začetno mesto replikacije (ColE1 origin) za replikacijo v celicah *E. coli* in f1 ori za proizvodnjo enoveržne DNA.
- fragment gena za β -galaktozidazo
- Mesto kloniranja
- ORF za odpornost na ampicilin
- Promotorja T7 in T3.
- Omogoča tudi prepisovanje "in vitro"

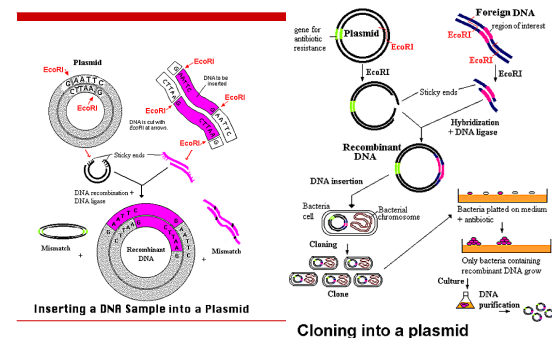


© Stratagene

- Plazmid, ki omogoča sledenje mesta, kjer se nahaja izražen protein – izražanje zelenega fluorescentnega proteina (green fluorescent protein-GFP)

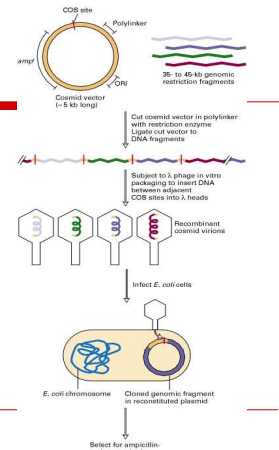


Vstavljanje vzorca DNA v plazmid



Kozmid

- Sestavljeni iz dela plazmida (geni za replikacijo in selekcijo) in iz kohezivnih koncev faga λ , ki omogočajo pakiranje v fagovo glavo (mesto COS).
- Vstop kozmida v celico – lastnosti faga – **dobra infektivnost**, v celici se obnaša kot plazmid.

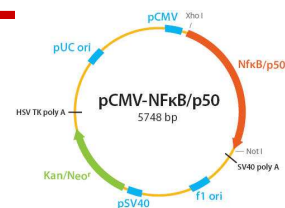


Kloniranje s plazmidi

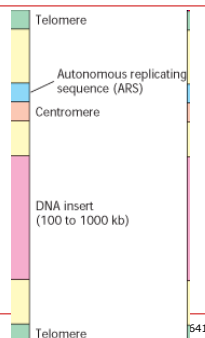
- <http://www.youtube.com/watch?v=ackWdNj936o>

Evkariontski ekspresivni vektor

- Izražanje vstavljenega gena omogoča **promotor CMV** (citomegalovirus).
- Zaporedja poliA SV40 omogočajo pravilno procesiranje 3' konca mRNA.
- Vektor vsebuje začetek replikacije virusa SV40 (Simian virus) v celicah sesalcev.
- Vsebuje mesto poliadenilacije prepisane RNA.
- Gen za odpornost na neomicin – omogoča selekcijo s kanamicinom v *E. coli* in z neomicinom v celicah sesalcev.
- Vektor vsebuje začetno mesto replikacije pUC za replikacijo v celicah *E. coli* in f1 ori za proizvodnjo enoverižne DNA.

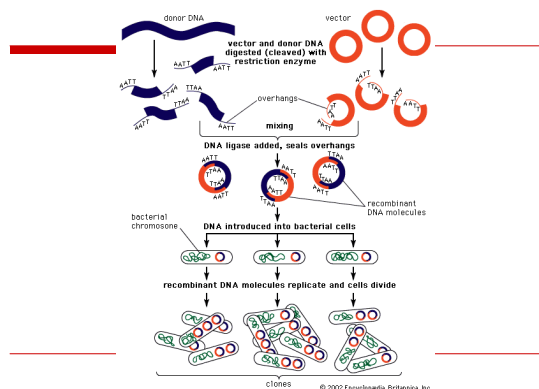


- Umetni kromosom kvasovke - Yeast Artificial Chromosome (YAC). Lahko vstavimo velike inserte DNA do 1000 kb.



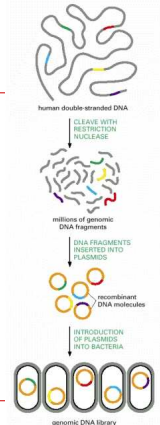
- <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/493667/recombinant-DNA-technology>

Izdelava rekombinantnega plazmida

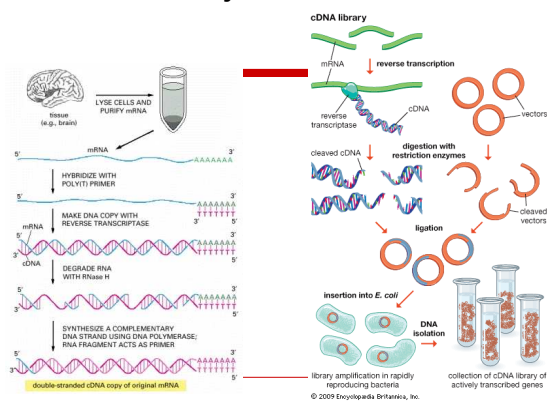


Izdelava genske (genomske) knjižnice (library) DNA

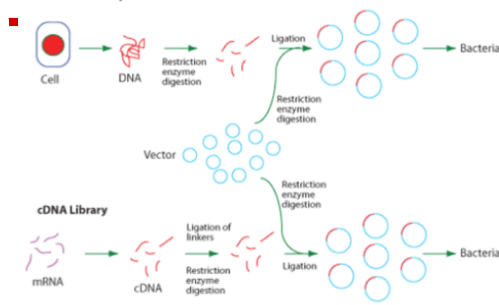
genska knjižnica ~ celoten genom kakega organizma, razgrajen z restrikcijskimi encimi na fragmente in vgrajen v ustrezne vektorje (npr. bakteriofage, plazmide ali kozmide);



Izdelava cDNA knjižnice

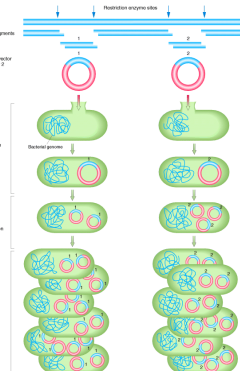


Genomic Library



Proizvodnja več kopij posameznega gena

- Obdelovanje delca DNA in vektorja z restrikcijsko endonukleazo
- Prileganje in ligiranje delcev DNA s kohezivnimi konci prokariotskega ekspresivnega vektorja
- Transformacija bakterijskih celic z rekombinantnim plazmidom
- V celicah pride do replikacije plazmida – kopiranje – kloniranje rekombinantnega plazmida.
- Dobimo veliko število klonov
- Z metodo izolacije DNA izoliramo veliko količino klonov rekombinantnega plazmida.



Polimerazna verižna reakcija – (polymerase chain reaction – PCR), verižna reakcija s polimerazo

- Namen PCR – naredimo veliko število kopij delca molekule DNA. Dobimo dovolj materiala, ki ga lahko uporabimo za proučevanje, za kloniranje, za diagnostiko....

PCR

- V tkivu se nahaja relativno malo nukleinskih kislin, nevidnih s prostim očesom
- Reakcija PCR omogoča pomnoževanje določenega segmenta DNA v epruveti
- Zelo preprosta in hitra metoda
- Zelo občutljiva metoda, ena sama molekula DNA je (vsaj teoretično) dovolj za uspešno reakcijo.

649

Postopek reakcije PCR

- v 0,5 ml epruveti zmešamo:
- tarčno verigo DNA, ki jo želimo pomnoževati
- začetne oligonukleotide, ki na verigi DNA omejujejo delec, ki ga želimo pomnožiti
- sestavne elemente novih verig DNA (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- pufer, ki zagotovi ustrezno reakcijsko okolje.
- encim DNA-polimerazo *Taq*

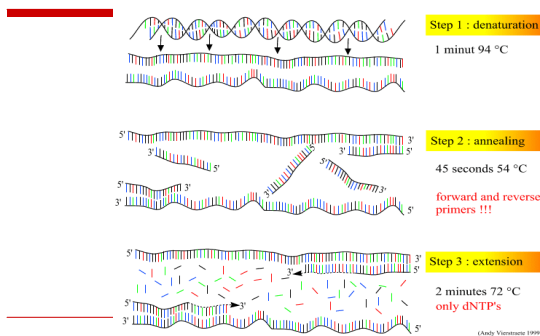
Epruveto vstavimo v termoblok, ki omogoča natančno vzdrževanje določene temperature in hitro prehajanje iz ene temperature v drugo.



650

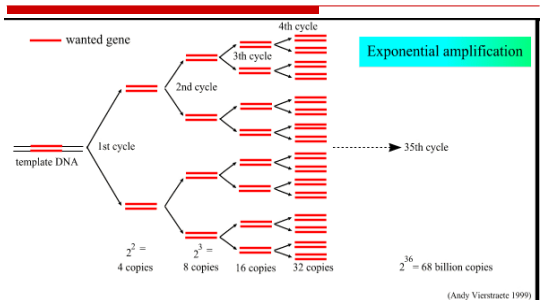
PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :



- Ker se med reakcijo PCR kopirata obe strani, pride do eksponentnega povečevanja števila kopij fragmenta DNA.
- Če začnemo reakcijo PCR z eno samo kopijo želenega fragmenta, imamo po enem ciklusu 2 kopiji, po dveh ciklih 4, nato 8, 16, 32.

652



653

- <http://www.molecularstation.com/science-videos/video/15/pcr-polymerase-chain-reaction/>

Napake pri reakciji PCR

- nevarnost kontaminacije s tujo molekulo DNA
- pomembna izbira specifičnih začetnikov sinteze
- pomembna izbira temperature prileganja začetnikov sinteze
- polimeraza *Taq* lahko vgradi napačen nukleotid

655

Uporabnost reakcije PCR

- Odkrivanje mutacij
- Odkrivanje polimorfizmov
- Odkrivanje evolucijskih sprememb
- Forenzika
- Antropologija
- Določanje spola v prenatalnem razvoju
- Za ugotavljanje patogenih agensov
- Analiza izražanja genov
- Za ugotavljanje izvora mesa in mesnih izdelkov

656

Uporabnost metod rekombinantne genetike

Biotehnologija – definicija – manipulacija bioloških procesov/organizmov za koristno uporabo v različnih tehnoloških procesih – za človekovo dobro)

- Znanstvena odkritja:
 - za razumevanje mehanizmov dedovanja in izražanja genov,
 - za razumevanje zdravljenja dednih in drugih bolezni
- Ugotavljanje genetskih obolenj - diagnostika
- Selekcija
- Ugotavljanje navzočnosti povzročiteljev kužnih obolenj
- Za ekonomske dobičke – gensko modificirane rastline in živali, proizvodnja dragocenih bioloških molekul
- Genska terapija
- Modeli za proučevanje humanih bolezni:
 - knockout živali
 - transgene živali

657

Pogoji za ugotavljanje vzrokov dednih bolezni z genskim testiranjem

- Gen, kjer želimo ugotavljati mutacije, mora biti poznan, poznana morajo biti nukleotidna zaporedja
 - sekvenciranje genov – določanje nukleotidnih zaporedij genov.

658

Sprememba restrikcijskega mesta zaradi mutacije – ugotavljanje mutacije z RFLP

- Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) – polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (polimorfizem fragmentov DNA, ki jih dobimo po restrikcijski digestiji molekule DNA).
- RFLP je tehnika, s katero lahko ločujemo organizme z diferencialno analizo vzorcev DNA, ki jih dobimo po digestiji izolirane DNA. Če je razdalja med razpoznavnima mestoma restrikcijskega encima pri dveh organizmih različna, lahko to ugotavljamo z RFLP.

659

Zaporedja molekule DNA fiziološkega alela za gen za β -hemoglobin (A) in za gen S, ki povzroča srpasto anemijo

β -Globin

Hb-A

DNA 5' GTG CAC CTG ACT CCG TGA GGA G 3' DdeI
 CAG GTG GAG TCA GGG AC C TC C

mRNA 5' 1 2 3 4 5 6 7 3'
 GUG CACC UGAC UCC UG AGG AG

Polypeptide Val His Leu Thr Pro Glu Glu ...

Hb-S

DNA 5' GTG CAC CTG ACT CCG TGA GGA G 3'
 CAG GTG GAG TCA GGG AC C TC C

mRNA 5' 1 2 3 4 5 6 7 3'
 GUG CACC UGAC UCC UG UGG AG

Polypeptide Val His Leu Thr Pro Val Glu ...

660





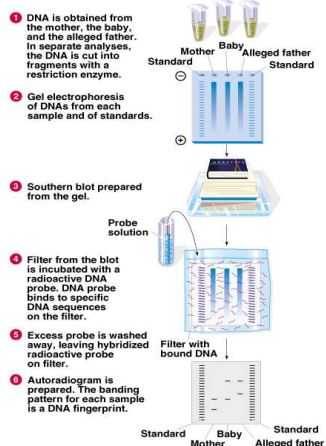
- 664

Homologous	Individual A	Individual B
1	1	1
2	2	2
3	3	3
4	4	4
5	5	5
6	6	6
7	7	7
8	8	8
9	9	9
10	10	10
11	11	11
12	12	12
13	13	13
14	14	14
15	15	15
16	16	16
17	17	17
18	18	18
19	19	19
20	20	20
21	21	21
22	22	22
23	23	23
24	24	24
25	25	25
26	26	26
27	27	27
28	28	28
29	29	29
30	30	30
31	31	31
32	32	32
33	33	33
34	34	34
35	35	35
36	36	36
37	37	37
38	38	38
39	39	39
40	40	40
41	41	41
42	42	42
43	43	43
44	44	44
45	45	45
46	46	46
47	47	47
48	48	48
49	49	49
50	50	50
51	51	51
52	52	52
53	53	53
54	54	54
55	55	55
56	56	56
57	57	57
58	58	58
59	59	59
60	60	60
61	61	61
62	62	62
63	63	63
64	64	64
65	65	65
66	66	66
67	67	67
68	68	68
69	69	69
70	70	70
71	71	71
72	72	72
73	73	73
74	74	74
75	75	75
76	76	76
77	77	77
78	78	78
79	79	79
80	80	80
81	81	81
82	82	82
83	83	83
84	84	84
85	85	85
86	86	86
87	87	87
88	88	88
89	89	89
90	90	90
91	91	91
92	92	92
93	93	93
94	94	94
95	95	95
96	96	96
97	97	97
98	98	98
99	99	99
100	100	100



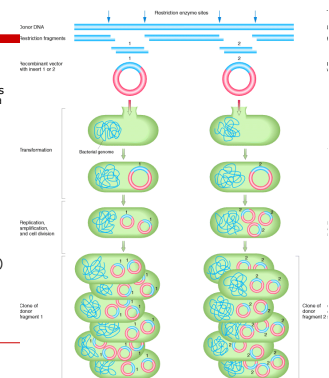
- 666

Tipiziranje DNA



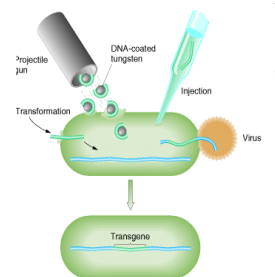
Proizvodnja rekombinantnih proteinov v prokariotskih celicah

- Obdelovanje DNA inserta in vektorja z restrikcijsko endonukleazo
- Prileganje in ligiranje fragmentov s kohezivnimi konci prokariotskega ekspresivnega vektorja
- Transformacija bakterijskih celic z rekombinantnim plazmidom
- V celicah pride do replikacije plazmida – kopiranje – kloniranje rekombinantnega plazmida. Dobimo veliko količino klonov
- Z metodo izolacije DNA izoliramo veliko količino klonov rekombinantnega plazmida.
- Z metodo izolacij eproteina dobimo veliko količino rekombinantnega proteina (vaccine, rastni hormoni, insulin...)



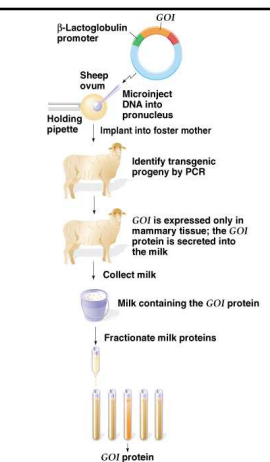
Postopki vnašanja tuje molekule DNA v celico

- Z električnim tokom
- Z virusnimi delci
- Z injiciranjem z mikromanipulatorjem
- Z različnimi kemijskimi metodami vnosa DNA



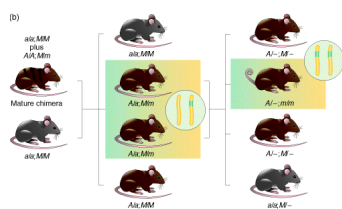
669

Proizvodnja rekombinantnih proteinov v transgenih živalih



Proizvodnja transgenih živali

- Vnos tujega gena v zarodno celico živali – transgena žival
- Blokada obstoječega gena v živali – "knockout" žival
- Za proučevanje delovanja posameznega gena
- Kot model za proučevanje fiziologije in bolezni, ki so pomembne za ljudi.



671

Genska terapija

672

-
- Etičnost in varnost rekombinantne tehnologije DNA
 - Dolgotrajne posledice genske tehnologije
 - Kjerkoli se izvajajo genske manipulacije, je potrebno nadzorovano standardizirano delo
 - Možna izdelava biološkega orožja
 - Možna ciljana proizvodnja rekombinantnih proizvodov